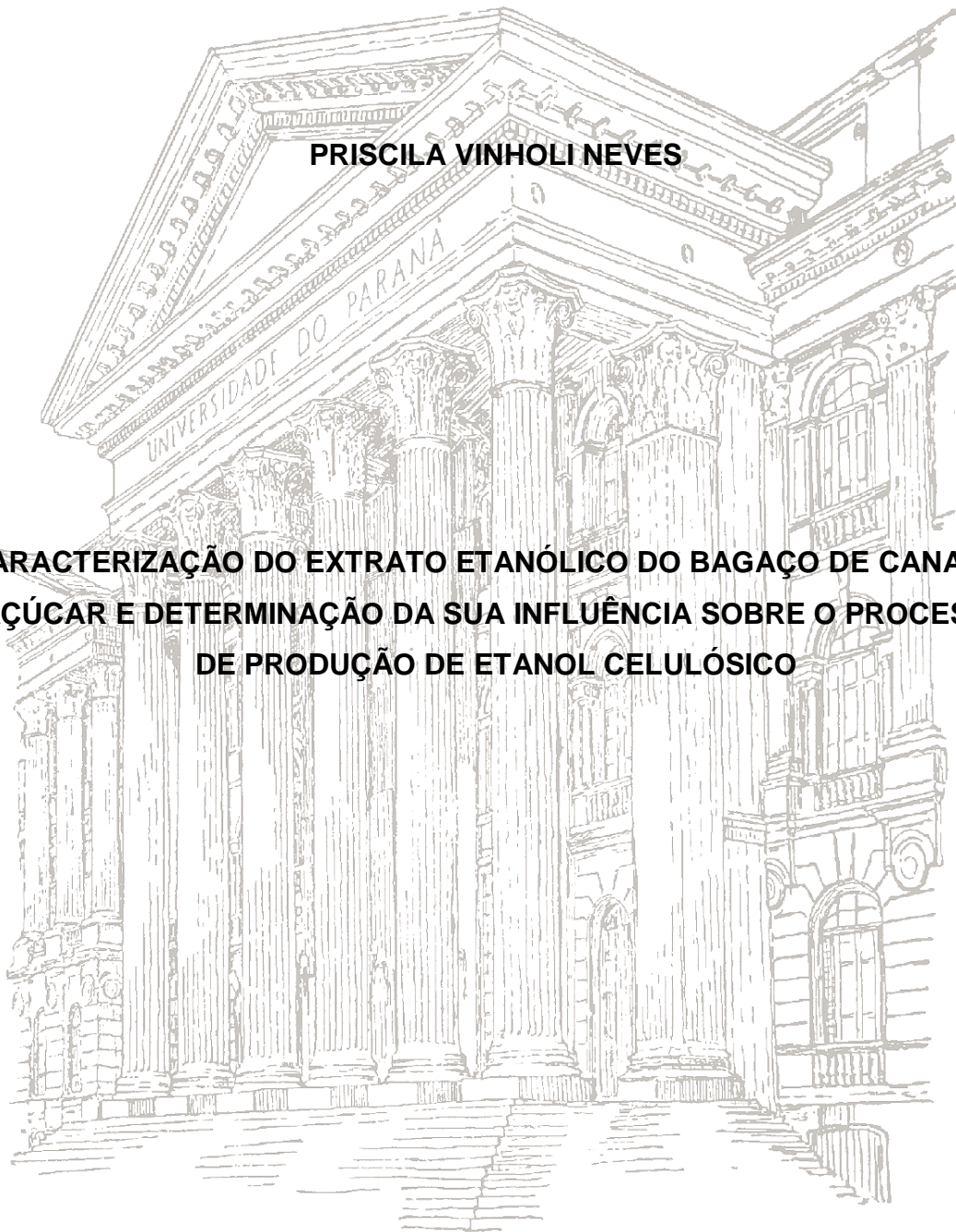


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA VINHOLI NEVES

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E DETERMINAÇÃO DA SUA INFLUÊNCIA SOBRE O PROCESSO
DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**



CURITIBA

2014

PRISCILA VINHOLI NEVES

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR E DETERMINAÇÃO DA SUA INFLUÊNCIA SOBRE O PROCESSO
DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, Sub-Área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2014

N513c

Neves, Priscila Vinholi

Caracterização do extrato etanólico do bagaço de cana-de-açúcar e determinação da sua influência sobre o processo de produção de etanol celulósico/ Priscila Vinholi Neves. – Curitiba, 2014.
104f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Luiz Pereira Ramos .

Bibliografia: p. 92-104.

1. Bagaço de cana. 2. Máquinas a vapor. 3. Catálise. 4. Etanol. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.

CDD: 662.88

TERMO DE APROVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
E DETERMINAÇÃO DE SUA INFLUÊNCIA SOBRE O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
ETANOL CELULÓSICO**

por

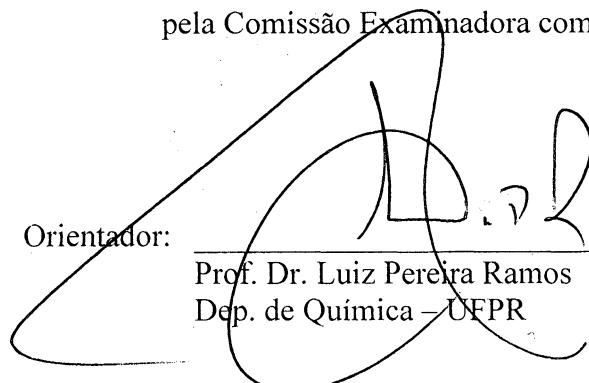
PRISCILA VINHOLI NEVES

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Elba Pinto da Silva Bon
Instituto de Química – UFRJ



Prof.ª Dr.ª Ana Luísa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 25 de setembro de 2014.

A vitalidade é demonstrada não apenas pela persistência,
mas pela capacidade de começar de novo.

Scott Fitzgerald

“Tudo posso, naquele que me fortalece.”

Filipenses 4: 10-20.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e iluminar durante estes dois anos.

Aos meus pais, por mesmo longe estarem sempre presentes, me incentivando e por compreender a necessidade desta etapa em minha vida.

Ao meu irmão Vitor Hugo e aos meus primos Allan e Ivo Raphael (irmãos adotivos) por me proporcionarem momentos de descontração.

Aos meus primos Danielle e Evandro que me acolheram na sua casa, dividindo o dia a dia deles comigo, e ao Vicente Kupfer pela parceira durante o mestrado.

Ao meu orientador Luiz Pereira Ramos por disponibilizar seu tempo e conhecimento para me ensinar; obrigada por não desistir de mim.

A professora Dra. Elina Bastos Caramão pela disponibilidade e por me auxiliar nas análises e no tratamento dos dados de GCxGC/TOFMS que foram necessários para a conclusão da dissertação.

A minha “co-orientadora” Ana Paula Pitarelo por me auxiliar principalmente no início do mestrado e que me ajuda quando preciso, mesmo estando super ocupada.

Aos amigos do CEPESQ, em especial Luana, Marcos, Vinícius, Alígia, Mateus, Edilson, Leyanis, Gustavo e Douglas, por me auxiliarem em algumas etapas deste trabalho, por me proporcionarem momentos de descontração e por aguentarem meus momentos explosivos.

Agradecimento em especial ao Bruno Vanelli, nós iniciamos o mestrado juntos, fizemos experimentos juntos, brigamos como irmãos, mas sempre estávamos ali um pra ajudar o outro, e vamos terminar isso juntos.

Aos meus amigos Ana Claudia, Ana Karina, Wagner Camacho e Aline Oliveira, e aos amigos da UFPR, Agne, Aline, May, Fran, Andrea, Prof^a Cida e Juliana pela amizade e palavras de incentivo.

RESUMO

Com o intuito de avaliar a possível influência que os extraíveis do bagaço de cana-de-açúcar poderiam provocar sobre as etapas de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação para a produção de etanol celulósico, duas amostras foram utilizadas, o bagaço *in natura* (BIN) e o bagaço submetido a uma extração em Soxhlet com etanol 95%, denominado bagaço lavado com etanol (BLE). O BIN e o BLE foram caracterizados e pré-tratados por explosão a vapor (195 °C, 7,5 min) na ausência e na presença dos ácidos fosfórico e sulfúrico (9,5 mg g⁻¹) como catalisadores. O extrato etanólico foi caracterizado por GCxGC/TOFMS, onde foram identificados hidrocarbonetos, ésteres e ácidos graxos, compostos fenólicos, cetonas e aldeídos comumente encontrados em plantas. A composição química do BIN apresentou 33,9% de anidroglicose, 17,9% de anidroxilose, 2,38% de grupos acetila, 1,92% de anidroarabinose, 21,9% de lignina total, 4,5% de cinzas e 4,7% de extraíveis totais, enquanto que o BLE apresentou 39,3%, 21,3%, 2,93%, 2,0%, 20,4%, 3,7% e 2,1% destes mesmos componentes, respectivamente. O material pré-tratado por auto-hidrólise foi o que apresentou melhores rendimentos de recuperação mássica (62%) e composição química com 60,4% de glucanas para o BLE e 54,9% para o BIN. Entre os materiais pré-tratados na presença de um ácido, a catálise fosfórica apresentou melhores resultados com 51,8% de glucanas para BLE e 53,4% para o BIN, e recuperação mássica de 62 e 51%, respectivamente. Já o material pré-tratado por catálise sulfúrica apresentou menores rendimentos de recuperação (55% para BLE e 49% para BIN) e uma composição química com 48% de glucanas. As amostras pré-tratadas foram submetidas aos ensaios de hidrólise enzimática e fermentação, seja em separado (SHF) ou simultaneamente (SSF). Nos ensaios de hidrólise enzimática, a conversão variou entre 90-100% entre as amostras pré-tratadas, demonstrando que o pré-tratamento foi eficiente em relação ao acesso das enzimas ao substrato. Os ensaios de SHF apresentaram melhores resultados que os ensaios SSF, sendo que a auto-hidrólise se sobressaiu dentre os pré-tratamentos com uma produção de etanol de 27 e 25 g L⁻¹ para BLE e BIN, respectivamente. Entre os outros experimentos, a catálise fosfórica alcançou uma produção de 24 g L⁻¹ para BIN e BLE, enquanto que a catálise sulfúrica produziu 21 a 23 g L⁻¹ de etanol, respectivamente. Nos ensaios de SSF, as amostras de bagaço autohidrolisado apresentaram uma produção de etanol de 18 g L⁻¹ para BIN e BLE, sendo que os demais resultados foram iguais ou um pouco inferiores a este valor. Considerando as perdas constatadas durante todo o processo, os materiais pré-tratados por auto-hidrólise e por catálise fosfórica apresentaram eficiências de 75-76% na fermentação, embora o SHF do BIN pré-tratado por auto-hidrólise tenha gerado resultados um pouco superiores (79%); já o material obtido por catálise sulfúrica gerou eficiência 30% menor devido às perdas de processo. Nos ensaios de SSF, o BIN autohidrolisado novamente atingiu a maior eficiência (52%), enquanto que o BLE autohidrolisado e os substratos derivados da catálise fosfórica geraram eficiências em torno de 45%. Em suma, os resultados de auto-hidrólise foram aparentemente equivalentes aos de catálise fosfórica e muito superiores aos de catálise sulfúrica, mas a remoção dos extraíveis em etanol não gerou aumento significativo na produção de etanol nas condições utilizadas nestes ensaios.

Palavras-chave: bagaço de cana, extraíveis, explosão a vapor, catálise ácida, etanol celulósico

ABSTRACT

The possible influence of biomass extractives on the pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation from sugarcane bagasse was evaluated for the production of cellulosic ethanol. Two samples were used for this purpose: native cane bagasse (BIN) and bagasse subjected to a Soxhlet extraction with 95% ethanol, named ethanol-extracted cane bagasse (BLE). Both BIN and BLE were characterized and pretreated by steam explosion (195 °C, 7.5 min) in the absence and presence of either phosphoric acid or sulfuric acid (9.5 mg g⁻¹) as the pretreatment catalyst. The ethanol extract was characterized by bidimensional gas chromatography detection by time-of-flight mass spectrometry (GCxGC/TOFMS) and the following families of chemicals were identified: hydrocarbons, esters and fatty acids, phenolic compounds, ketones and aldehydes, among others. The chemical composition of BIN showed 33.9% of anhydroglucose, 17.9% of anidroxilose, 2.38% of acetyl groups, 1.92% of anidroarabinose, 21.9% of total lignin, 4.5% of ash and 4.7% of total ethanol extractable material, while the BLE showed 39.3%, 21.3%, 2.93%, 2.0%, 20.4%, 3.7% and 2.1% of these same components, respectively. Pretreatment by autohydrolysis showed the best mass recoveries (62%). BLE contained 60.4% of glucan while BIN had 54.9% of this same component. Among the materials pretreated in the presence of an acid catalyst, phosphoric acid showed the best results with 51.8% of glucan for BLE and 53.4% for the BIN and mass recovery of 62 and 51%, respectively. The material pre-treated with sulfuric acid showed lower recovery yields (55% to BLE and 49% for BIN) and a chemical composition with 48% of glucans. The pre-treated samples were subjected to enzymatic hydrolysis and fermentation, either separately (SHF) or simultaneously (SSF). In tests of enzymatic hydrolysis, the conversion of glucans to glucose ranged from 90 to 100%, demonstrating that the pretreatments were efficient in relation to the development of substrate accessibility. The SHF tests showed better results than the SSF tests but autohydrolysis was even better, with an ethanol production of 27 and 25 g L⁻¹ for BLE and BIN, respectively. Among other experiments, the use of phosphoric acid gave a production of 24 g L⁻¹ of ethanol for BLE and BIN, while the use of sulfuric acid produced 21 to 23 g L⁻¹, respectively. In SSF tests, both autohydrolysed cane bagasse showed an ethanol production of 18 g L⁻¹, and the other results were either equal to or slightly lower than this amount. Considering the mass losses that were observed during the processes, the materials derived from autohydrolysis and phosphoric acid catalysis exhibited efficiencies of 75-76% in fermentation. The SHF of the autohydrolysed BIN generated slightly higher numbers (79%) while the material derived from sulfuric acid catalysis had yields 30% lower due to process losses. In SSF tests, the autohydrolysed BIN reached the maximum efficiency (52%) once again, while the autohydrolysed BLE and substrates derived from phosphoric catalysis generated efficiencies around 45%. In summary, autohydrolysis of cane bagasse was apparently equivalent to phosphoric acid catalysis but much better than sulfuric acid catalysis. However, extractives removal by ethanol washing did not influence the cellulosic ethanol production from cane bagasse under the conditions used in these tests.

Keywords: sugarcane bagasse, extractives, steam explosion, acid catalysis, cellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO (1G) (ADAPTADO DE GOLDEMBERG, 2009).....	15
FIGURA 2 – DIAGRAMA GLOBAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA (PITARELO <i>et al.</i> , 2010).	16
FIGURA 3 – ESTRUTURA DA CELULOSE. (A) CELOBIOSE, UNIDADE CONFORMACIONAL; (B) CELULOSE (SILVEIRA <i>et al.</i> , 2014).	19
FIGURA 4 – UNIDADES DE MONOSSACARÍDEOS QUE COMPÕEM AS HEMICELULOSES. (1) D-GLUCOSE; (2) D-GALACTOSE; (3) L-ARABINOSE; (4) D-XILOSE; (5) D-MANOSE; (6) 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO; (7) L-RAMNOSE (SJÖSTRÖM E WESTERNARK, 1999).....	20
FIGURA 5 – MODELO ESTRUTURAL DE HEMICELULOSES DE GRAMÍNEA – ARABINO-O-METILGLUCURONOXILANA – PRETO: UNIDADES DE ANIDRO-D-XILOPIRANOSE; AZUL: UNIDADES DE O-ACETIL; VERMELHO: UNIDADES DE ARABINOFURANOSIL; VERDE: UNIDADES DE α -D-4-O-METILGLUCURONIL (SILVEIRA <i>et al.</i> , 2014).	21
FIGURA 6 – ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA: (A) ÁLCOOL CONIFERÍLICO (GRUPO GUAIACILA); (B) ÁLCOOL SINAPÍLICO (GRUPO SIRINGILA); (C) ÁLCOOL <i>p</i> -CUMARÍLICO (GRUPO <i>P</i> -HIDROXIFENILA).....	22
FIGURA 7 – MODELO ESTRUTURAL DA LIGNINA DERIVADA DA ESPÉCIE <i>Picea abies</i> (GIMNOSPERMA) (HIGUCHI, 1985).	23
FIGURA 8 – POSSÍVEIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRAÍVEIS DE BIOMASSAS VEGETAIS (BARBOSA <i>et al.</i> , 2005; MORAIS <i>et al.</i> , 2012; SILVÉRIO, 2008).	24
FIGURA 9 – COMPOSTOS FORMADOS DURANTE A EXPLOSÃO A VAPOR A PARTIR DA CELULOSE E DAS HEMICELULOSES (4-O-METILGLUCURONOXILANA) (RAMOS, 2003).	27

FIGURA 10 – COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS A PARTIR DA LIGNINA DURANTE A EXPLOSÃO A VAPOR (RAMOS, 2003).....	28
FIGURA 11 – SINERGISMO ENTRE AS CELULASES E PROTEÍNAS ACESSÓRIAS DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MATERIAL CELULÓSICO (SILVEIRA <i>et al.</i> , 2014).....	34
FIGURA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE ESTUDOS RELATIVOS AO PERCENTUAL DE EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO DE CANA.....	50
FIGURA 13 – ESPECTRO DE FT-IR DOS EXTRATIVOS EM ETANOL 95% DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	51
FIGURA 14 – DIAGRAMA DE CORES E DIAGRAMA 3D DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA A PARTIR DA ANALISE POR GCXGC/TOFMS.....	52
FIGURA 15 – CLASSES DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.	53
FIGURA 16 – GRÁFICO DE DISPERSÃO DOS COMPONENTES IDENTIFICADOS POR GCXGC/TOFMS NO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.	54
FIGURA 17– ESPECTROS DE MASSAS DO 4-VINILFENOL EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA BIBLIOTECA NIST.	55
FIGURA 18 – DIAGRAMA DE CORES E DIAGRAMA 3D DO PADRÃO DE ÁCIDO <i>p</i> -CUMÁRICO.	56
FIGURA 19 – DIAGRAMA DE CORES PARA OS CROMATOGRAMAS DE (A) ÍONS TOTAIS E DE (B) ÍONS SELETIVOS, EM COMPARAÇÃO AO (C) CROMATOGRAMA TRIDIMENSIONAL DOS COMPOSTOS SEPARADOS POR GCXGC/TOF NA SEGUNDA DIMENSÃO.	64
FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS DE COMPOSTOS SEPARADOS NA SEGUNDA DIMENSÃO POR GCXGC/TOFMS A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.	65

FIGURA 21 – ESPECTROS DE FT-IR DOS EXTRAÍVEIS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i>	69
FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DERIVADA DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOÇÃO A VAPOR – AH, AUTO-HIDRÓLISE; H ₃ PO ₄ , CATÁLISE FOSFÓRICA; H ₂ SO ₄ , CATÁLISE SULFÚRICA.	76
FIGURA 23 – CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FURÂNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DERIVADA DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOÇÃO A VAPOR – AH, AUTO-HIDRÓLISE; H ₃ PO ₄ , CATÁLISE FOSFÓRICA; H ₂ SO ₄ , CATÁLISE SULFÚRICA.	77
FIGURA 24 – GRÁFICO DE CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO BT _{FIL} DO BLE E BIN PRÉ-TRATADOS A VAPOR.	79
FIGURA 25 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL PARA O BLE (A) E BIN (B) NO ENSAIO DE SHF. AH – AUTO-HIDRÓLISE; H ₃ PO ₄ – CATÁLISE FOSFÓRICA; H ₂ SO ₄ – CATÁLISE SULFÚRICA.	82
FIGURA 26 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL PARA O BLE (A) E BIN (B) NO ENSAIO DE SSF. AH – AUTO-HIDRÓLISE; H ₃ PO ₄ – CATÁLISE FOSFÓRICA; H ₂ SO ₄ – CATÁLISE SULFÚRICA.	85
FIGURA 27 – EFICIÊNCIA GLOBAL PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO CONSIDERANDO AS PERDAS DE GLUCOSE.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTOS UTILIZADOS EM BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	30
TABELA 2 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GCXGC/TOFMS DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.	57
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i> (BIN) E PARA O BAGAÇO LAVADO COM ETANOL (BLE).....	67
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO <i>IN NAURA</i> E LAVADO COM ETANOL FRENTE AOS DADOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA.	70
TABELA 5 – RECUPERAÇÃO TOTAL DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS APÓS PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.	71
TABELA 6 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL (BT _{FIL}) DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS APÓS A EXPLOSÃO VAPOR.	72
TABELA 7 – BALANÇO DE MASSAS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL (BT _{FIL}) DOS DIFERENTES BGAÇOS PRÉ-TRATADOS.	74
TABELA 8 – CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO BT _{FIL} DO BIN E BLE PRÉ-TRATADOS A VAPOR.....	78
TABELA 9 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SHF PARA O BLE.	81
TABELA 10 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SHF PARA O BIN.....	81
TABELA 11 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF PARA O BLE.	84

TABELA 12 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF PARA O BIN.....	84
TABELA 13 – RENDIMENTO, EFICIÊNCIA E PRODUTIVIDADE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO POR SHF.....	86
TABELA 14 – RENDIMENTO, EFICIÊNCIA E PRODUTIVIDADE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO POR SSF.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFEX – Explosão de fibra com amônia (do inglês *Ammonia fibre explosion*)
- AH – Auto-hidrólise
- AnAra - Anidroarabinose
- AnGlc – Anidroglucose
- AnXyl – Anidroxilose
- BIN – Bagaço *in natura*
- BLE – Bagaço lavado com etanol
- BPC – Bioprocesso consolidado
- BT_{FA} – Fração solúvel do bagaço
- BT_{FIL} – Fração insolúvel do bagaço lavado com água
- CF – Co-fermentação
- GCxGC/TOFMS – Cromatografia de fase gasosa bidimensional acoplada à detecção de massas por tempo de voo (do inglês *Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometer*)
- CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
- FT-IR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*)
- GP – Grau de polimerização
- NIST - *National Institute of Standards and Technology*
- SHF – Hidrólise e fermentação separadas (do inglês *Separate hydrolysis and fermentation*)
- SSCF – Sacarificação e co-fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous saccharification and co-fermentation*)
- SSF – Sacarificação e fermentação simultâneas (do inglês *Simultaneous saccharification and fermentation*)

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 Etanol celulósico.....	14
1.2 Composição química de materiais lignocelulósicos.....	18
1.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	26
1.4 Hidrólise enzimática de lignocelulose pré-tratada.....	33
1.5 Fermentação.....	36
2. Objetivos.....	40
2.1 Objetivo geral.....	40
2.2 Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Material.....	41
3.2 Preparo das amostras de bagaço para o pré-tratamento	41
3.3 Pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor	42
3.4 Caracterização dos extraíveis obtidos a partir do BLE	42
3.5 Análise química de materiais celulósicos.....	44
3.6 Ensaio de hidrólise enzimática.....	46
3.7 Ensaio de fermentação	47
3.7.1 Meio de cultura.....	47
3.7.2 Preparação do inóculo e crescimento celular	47
3.7.3 Fermentação	48
4. Resultados e Discussão	50
4.1 Extraíveis do bagaço de cana-de-açúcar	50
4.2 Caracterização da composição química do bagaço	66
4.3 Rendimentos de recuperação e composição química dos bagaços pré-tratado.....	71
4.4 Ensaio de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado	78
4.5 Ensaio de fermentação	81
5. Conclusão.....	90
6. Referências Bibliográficas	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Etanol celulósico

Durante os últimos anos, a busca por fontes renováveis de energia tem sido constante e crescente com o intuito de substituir ainda que parcialmente a utilização de combustíveis fósseis como a gasolina e o óleo diesel. Tal iniciativa visa reduzir as emissões dos gases ligados ao efeito estufa e diminuir o alto impacto do preço de um barril de petróleo, cujas oscilações de mercado tem prejudicado o desenvolvimento de economias emergentes (ABOLHOSSEINI e HESHMATI, 2014). O etanol é o biocombustível mais amplamente usado para transporte em todo o mundo, seja puro ou em mistura com a gasolina. Trata-se de uma fonte de energia limpa e renovável que pode ser produzida a partir da sacarose e/ou do amido presente em matérias primas como cana-de-açúcar, sorgo sacaríneo, beterraba, mandioca e milho, genericamente denominada etanol de primeira geração (AZEVEDO *et al.*, 2012; SUKUMARAM *et al.*, 2009). Atualmente, o etanol corresponde a aproximadamente 94% da produção global de biocombustíveis, sendo derivado majoritariamente da cana-de-açúcar (modelo brasileiro) e do amido de milho (modelo norte-americano). Segundo dados do Serviço da Agricultura Estrangeira, o Brasil e os EUA são líderes mundiais do setor, totalizando 84% desta produção (USDA-FAS, 2014).

As diferenças nas tecnologias de produção de etanol de primeira geração podem ser representadas de modo simplificado conforme os fluxogramas da FIGURA 1. A matéria-prima sacarínea é lavada para remoção de impurezas e posteriormente moída para remoção do caldo. Em seguida, este caldo passa por um processo de esterilização e purificação e é submetido a um processo de fermentação para a produção de etanol. Quando o material é amiláceo, como, por exemplo, no caso do amido de milho, este é triturado e submetido a uma etapa de hidrólise enzimática para a sua posterior fermentação (AZEVEDO *et al.*, 2012; MILANEZ *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

O etanol também pode ser produzido a partir de resíduos agroindustriais como os bagaços de cana-de-açúcar e de sorgo sacaríneo, as palhas de cana-de-açúcar, de milho, de trigo, de cevada e de arroz, as cascas de arroz e de outros

cereais, assim como de outros materiais como serragem e cavacos de madeira, resíduos de celulose (papel jornal, lodo de papel reciclado) e resíduos sólidos urbanos (CARDONA *et al.*, 2010; HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009). O etanol produzido a partir destes tipos de material é denominado etanol de segunda geração ou etanol celulósico, pois na composição química destes materiais existem polissacarídeos não-amiláceos que podem ser hidrolisados a açúcares fermentescíveis para a conversão a etanol (CARDONA e SANCHEZ, 2007). A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica apresenta vantagens sobre o etanol de primeira geração, pois não compete com a produção de alimentos e está baseada em materiais amplamente disponíveis a um baixo custo (DIAS *et al.*, 2013; GOUVEIA *et al.*, 2009; MORAIS *et al.*, 2012).

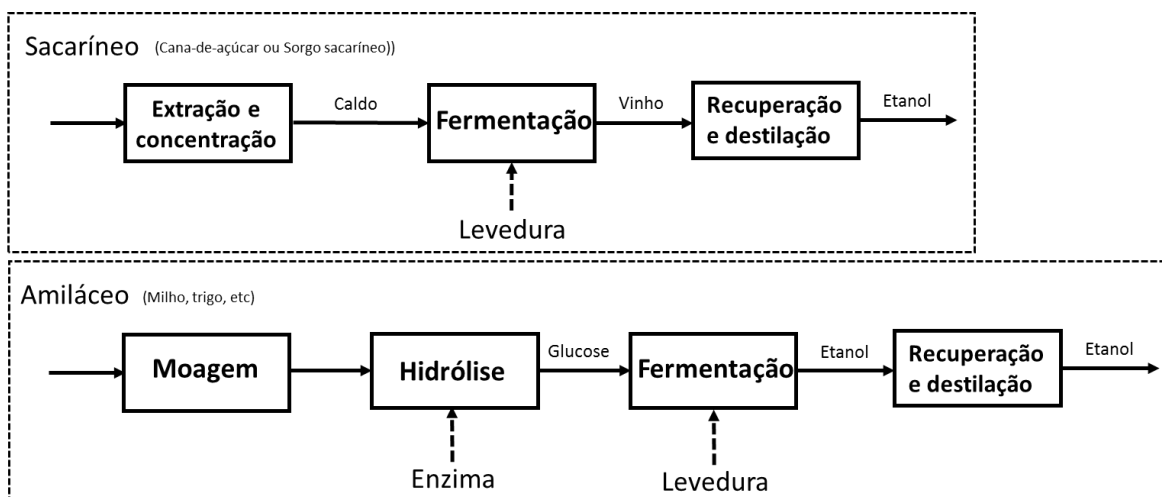


FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DAS ETAPAS DE PRODUÇÃO DO ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO (1G) (ADAPTADO DE GOLDEMBERG, 2009).

De acordo com Vaz Jr. (2011) e Moraes e Broetto (2012), de cada hectare de terras agricultáveis podem ser colhidos 80 toneladas de cana-de-açúcar, sendo que de cada tonelada de cana moída são produzidos 143 kg de açúcar e 80 litros de etanol, restando entre 260 a 280 Kg de bagaço e palha. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na última safra (2013/2014) foram produzidos 28 bilhões de litros de etanol, que corresponde a uma média de 6,4 mil litros de etanol por hectare de cana plantada. No entanto, o emprego do bagaço e da palha com uma tecnologia bem consolidada poderia aumentar a produtividade de etanol por hectare em até duas vezes, além de solucionar importantes passivos ambientais usualmente associados ao acúmulo

últimas décadas: a co-fermentação de pentoses e hexoses (CF); a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); a sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) e o bioprocesso consolidado (BPC). O processo SSF reduz o tempo de processamento, pois a glucose liberada por hidrólise é rapidamente convertida a etanol pelos micro-organismos da fermentação, reduzindo a inibição das celulasas pelo acúmulo dos produtos de hidrólise (WATANABE *et al.*, 2010). No entanto, sua desvantagem quando comparado ao processo separado de hidrólise e fermentação (SHF) é a diferença entre as temperaturas ótimas das enzimas hidrolíticas e dos micro-organismos responsáveis pela fermentação (BINOD *et al.*, 2010). Já a co-fermentação (CF) de hidrolisados lignocelulósicos consiste na utilização de um micro-organismo geneticamente modificado (GMO) ou de uma mistura de micro-organismos que fermente eficientemente as hexoses e as pentoses presentes no meio (CARDONA *et al.*, 2010). Por sua vez, o processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) representa a integração dos processos de SSF e de CF. Por outro lado, o bioprocesso consolidado (BPC) consiste na utilização de um modelo biológico (um ou mais micro-organismos) que seja capaz de realizar todas as etapas do processo, desde o pré-tratamento até a produção de etanol (ATALA *et al.*, 2008; CARDONA e SANCHEZ, 2007; CASTRO e PEREIRA Jr. 2010; ROSA e GARCIA, 2009). No entanto, barreiras tecnológicas ainda precisam ser superadas para que esses processos sejam eficientes, como a obtenção de micro-organismos que fermentem efetivamente as hexoses e as pentoses ao mesmo tempo e sob as mesmas condições.

Finalmente insumos químicos podem ser obtidos a partir do tratamento dos principais componentes presentes na biomassa. A celulose e as hemiceluloses quando submetidas a diferentes tratamentos, sejam químicos, físicos ou biológicos (hidrólise, liquefação, pirólise, fermentação, entre outros), podem ser convertidas em compostos como sorbitol, xilitol, ácido láctico, ácido acético, acetona, butanol, gliceraldeído, ácido levulínico e compostos furânicos como 5-hidroximetil-2-furfural (HMF) e furfural, dentre outros. A lignina também é uma fonte de produtos de alto valor agregado, que podem ser formados a partir de sua oxidação ou então de seus derivados, como eugenol, coníferaldeído, vanilina, cresol, ácido ferúlico, ácido sinápico, sinapaldeído, siringaldeído, entre outros. Além disto, estes materiais lignocelulósicos residuais ainda podem ser destinados à produção de ração animal ou à geração de energia nas unidades fabris, quer

por processos de co-geração, quer pelo seu aproveitamento como substrato para a produção de biogás (DONATE, 2014; LAURICHESSE e AVÉROUS, 2014; VAZ, 2011).

1.2 Composição química de materiais lignocelulósicos

Para escolher a estratégia mais adequada e para que bons rendimentos sejam alcançados, é necessário conhecer a composição química da biomassa a ser utilizada no processo, que é rica em compostos macromoleculares como celulose, hemiceluloses e lignina, além de apresentar compostos de baixa massa molar em menor porcentagem (extraíveis), cinzas e outros componentes minoritários (BRIENZO *et al.*, 2009).

Um dos componentes mais abundantes em materiais lignocelulósicos é a celulose, que corresponde usualmente a 35-50% de sua massa seca (MOOD *et al.*, 2013). Trata-se de um homopolissacarídeo linear constituído exclusivamente por unidades de anidro-D-glucose interligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), sendo que sua unidade estrutural básica é representada pela celobiose (SUN *et al.*, 2004). Algumas propriedades da celulose dependem do tamanho da sua cadeia ou grau de polimerização (GP). Este grau de polimerização se refere ao número de unidades de anidrogucose que formam a cadeia e varia muito de uma espécie para outra. Por exemplo, a celulose de madeira apresenta GP de 300 a 1700, algodão e outras fibras de 800 a 10000 e, para o bagaço de cana, tais valores são próximos de 1800 unidades (ATALA *et al.*, 2008; KLEM *et al.*, 2005).

As cadeias de celulose apresentam conformação linear devido a orientação equatorial da ligação β -(1 \rightarrow 4) e a disposição também equatorial das hidroxilas do anel piranosídico em conformação 4C_1 . Quando duas ou mais cadeias de celulose estão em contato, ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares são formadas pelas hidroxilas presentes nos carbonos C2, C3 e C6 e pelo par eletrônico do oxigênio do anel, facilitando o alinhamento e fortalecendo a estrutura associativa entre elas (FIGURA 3) (FENGEL e WEGNER, 1989; SILVEIRA *et al.*, 2014; SOLOMONS, 1934). Além disso, é importante salientar que cada cadeia de celulose apresenta um terminal não redutor e um terminal redutor. O terminal não redutor corresponde a um grupamento hidroxila

em C4 e o terminal redutor tem esta denominação pois o C1 (carbono anomérico) pode sofrer mutarrotação (KLEMM *et al.*, 2005).

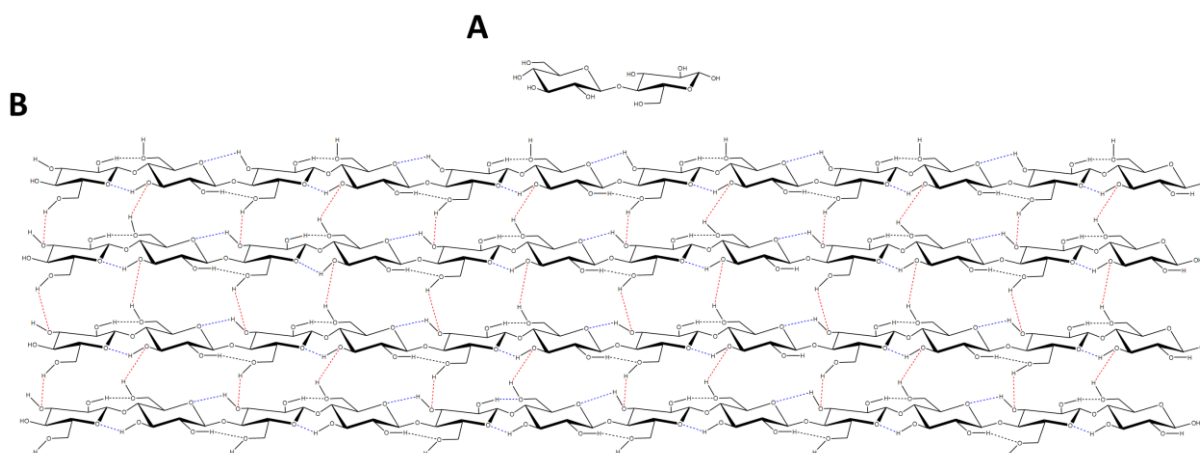


FIGURA 3 – ESTRUTURA DA CELULOSE. (A) CELOBIOSE, UNIDADE CONFORMACIONAL; (B) CELULOSE (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Devido a sua organização supramolecular, a celulose é composta por partes cristalinas e não cristalinas. A parte não cristalina da celulose tem uma área superficial maior, sendo mais suscetível à hidrólise do que a forma cristalina, que representa uma região de maior organização estrutural. Por apresentar regiões cristalinas e não cristalinas, diferentes tipos de celulases são necessárias para maximizar a hidrólise enzimática da celulose (CARVALHO, 2011; SANTOS e GOUVEIA, 2009). A parte cristalina é expressa em porcentagem (CrI) e seu valor depende muito da origem e do processo ao qual a celulose é submetida. A celulose I, denominada celulose nativa, foi inicialmente caracterizada por difração de raio X e, mais tarde, a partir de análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que revelaram a existência de duas formas cristalinas, I α e I β . A forma I α tem organização triclínica e é encontrada majoritariamente em algas como *Valonia* sp., enquanto que a forma I β é monoclínica e tem ocorrência majoritária em vegetais superiores. As demais formas cristalinas (II, III_I, III_{II}, IV_I, IV_{II}) são sintetizadas a partir da celulose nativa por tratamentos químicos variados (KLEMM *et al.*, 2005).

As hemiceluloses, ao contrário da celulose, são heteropolissacarídeos com menor massa molecular que podem possuir em sua estrutura mais de um tipo de monossacarídeo (FIGURA 4), que podem ser hexoses (D-glucose, D-

manose e D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose, e L-ramnose) e, em alguns casos, ácidos urônicos (ácidos D-glucurônico e 4-O-metil-D-glucurônico).

Em geral, materiais lignocelulósicos contêm de 20-35% de hemiceluloses em sua composição química (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; MOOD *et al.*, 2013; RAMOS 2003).

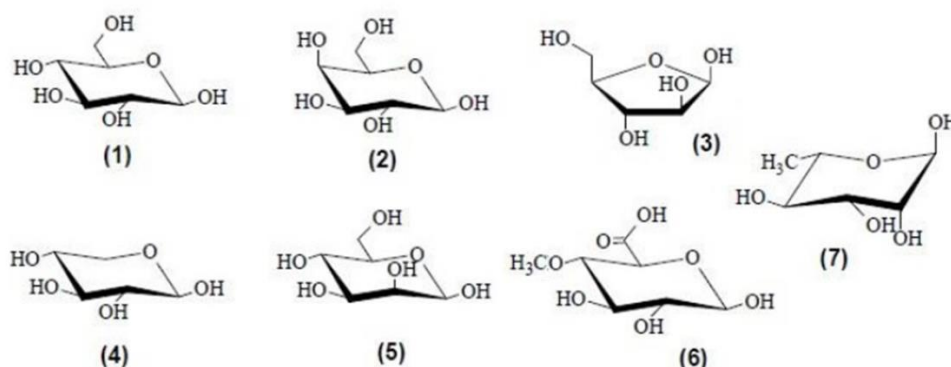


FIGURA 4 – UNIDADES DE MONOSSACARÍDEOS QUE COMPÕEM AS HEMICELULOSAS. (1) D-GLUCOSE; (2) D-GALACTOSE; (3) L-ARABINOSE; (4) D-XILOSE; (5) D-MANOSE; (6) 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO; (7) L-RAMNOSE (SJÖSTRÖM E WESTERNARK, 1999).

As estruturas das hemiceluloses podem apresentar diversas ramificações que se dispõem ao longo da cadeia principal, o que facilita sua interação com a celulose e resulta em uma alta associação molecular baseada em uma rede de ligações de hidrogênio. Estas ramificações conferem às hemiceluloses uma estrutura muito menos organizada ou menos cristalina, sendo portanto mais suscetível à hidrólise do que a celulose (RAMOS, 2003). Os grupos presentes nas ramificações da estrutura principal e o grau de substituição das hemiceluloses variam de uma espécie para outra. Por exemplo, em espécies de madeira duras (folhosas ou angiospermas dicotiledôneas) são encontradas xilanas altamente acetiladas com pequenas quantidades de ácido glucurônico, enquanto que em madeiras moles (ou gimnospermas) a acetilação é parcial e existem grupos substituintes de arabinose e ácido urônico (PHITSUWAN *et al.*, 2013).

Xilanas e glucomanas são as hemiceluloses mais importantes, sendo que as xilanas são as mais abundantes. Em gramíneas podem ser encontradas xiloglucanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas (GÍRIO *et al.*, 2010). A FIGURA 5 (SILVEIRA *et al.*, 2014) apresenta um exemplo de hemicelulose encontrada em gramíneas. A cadeia principal é formada por

unidades de anidro-D-xilopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4), com ramificações por unidades O-acetil, α -L-arabinofuranosil e α -D-4-O-metilglucuronopiranosil. As cadeias de arabino-O-metilglucuronoxilana estão conectadas entre si a partir de ligações covalentes com unidades de ácido ferúlico (SUNNA e ANTRANIKIAN, 1997).

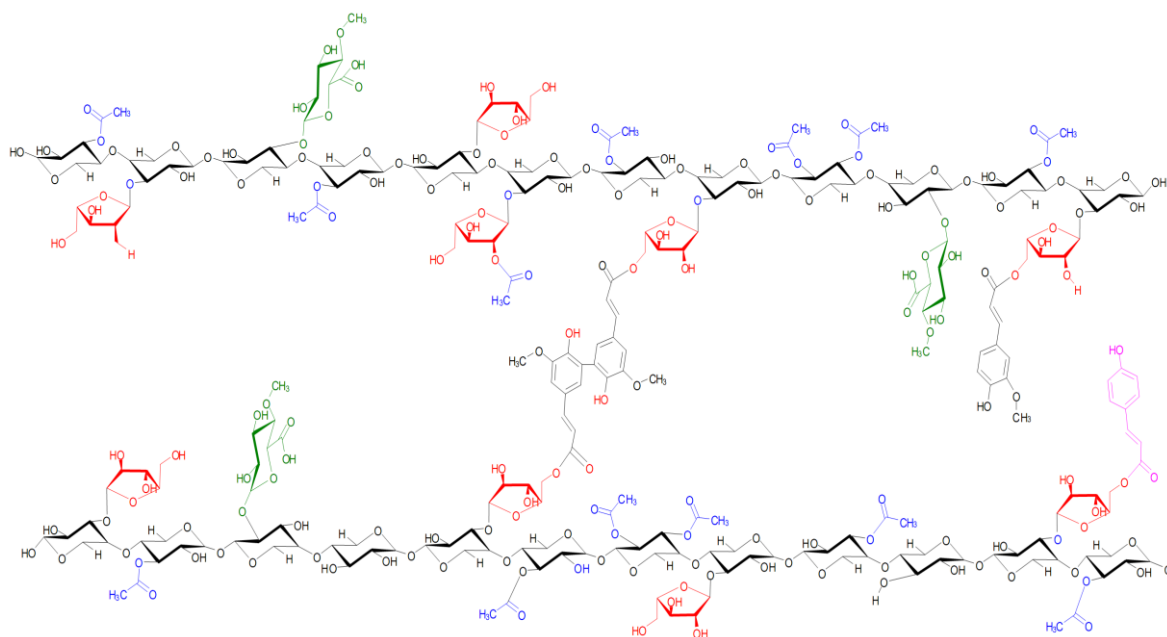


FIGURA 5 – MODELO ESTRUTURAL DE HEMICELULOSES DE GRAMÍNEA – ARABINO-O-METILGLUCURONOXILANA – PRETO: UNIDADES DE ANIDRO-D-XILOPIRANOSE; AZUL: UNIDADES DE O-ACETIL; VERMELHO: UNIDADES DE ARABINOFURANOSIL; VERDE: UNIDADES DE α -D-4-O-METILGLUCURONIL (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Estes polímeros estão presentes na parede celular da biomassa em conexão direta com a celulose via ligações de hidrogênio e também se encontram covalentemente ligados à lignina por ligações de diferentes tipos, sendo difícil sua remoção sem que haja uma mudança significativa na sua estrutura, de modo que atuam como um intermediário de conexão entre a celulose e a lignina (BIAN *et al.*, 2012; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; RAMOS, 2003). As hemiceluloses também se associam com a lignina formando complexos lignina-carboidrato que dificultam ainda mais a ação enzimática (PHITSUWAN *et al.*, 2013).

A principal substância responsável pela resistência física e mecânica das plantas é a lignina e sua abundância varia de 15 a 30% dependendo da espécie

vegetal. Este componente polifenólico recobre os polissacarídeos que compõe a parede celular (celulose e hemiceluloses), tornando-a resistente à degradação química e microbiana. A lignina é resultado da condensação radicalar de derivados do álcool *p*-hidroxi-cinâmico com vários graus de oxidação, cuja estrutura amorfa é baseada em três precursores monoméricos: álcool sinapílico, álcool *p*-cumarílico e álcool coniferílico (DENCE e LIN, 1992; FENGEL e WEGNER, 1989; SOARES, 2012) (FIGURA 6). Madeiras duras apresentam principalmente unidades guaiacil e siringilpropanóides; já em madeiras moles (coníferas ou gimnospermas) encontram-se quase que exclusivamente unidades de guaiacilpropanóides; e ligninas derivadas de gramíneas normalmente apresentam as três unidades precursoras (PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993; RAMOS 2003).

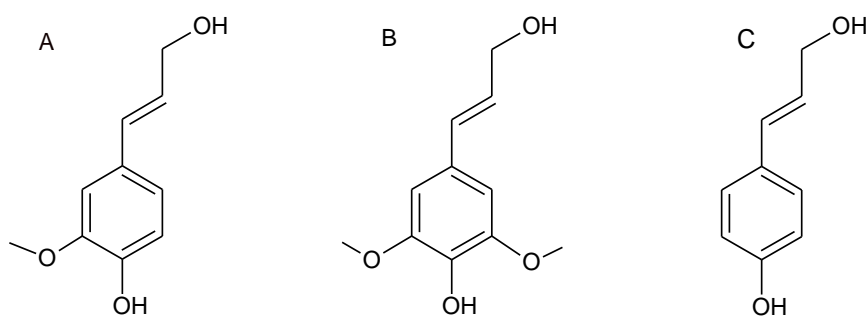


FIGURA 6 – ESTRUTURAS DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA: (A) ÁLCOOL CONIFERÍLICO (GRUPO GUAIIACILA); (B) ÁLCOOL SINAPÍLICO (GRUPO SIRINGILA); (C) ÁLCOOL *p*-CUMARÍLICO (GRUPO *p*-HIDROXIFENILA).

Além da constituição química, a lignina se diferencia dos outros polímeros naturais pela sua estrutura macromolecular, na qual unidades monoméricas não se repetem de forma regular, mas encontram-se entrelaçadas por diferentes ligações como ligações carbono-carbono entre as cadeias alifáticas de duas unidades (β - β' , α - α' , α - β') (1), entre estas e anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6') (2) e entre carbonos de núcleos aromáticos (5-5') (3), além de ligações éter envolvendo apenas cadeias alifáticas ou anéis aromáticos e cadeias alifáticas (β -O-4', α -O-4') (4). Um exemplo da estrutura da lignina está representada na FIGURA 7 (PILÓ-VELOSO *et al.*, 1993).

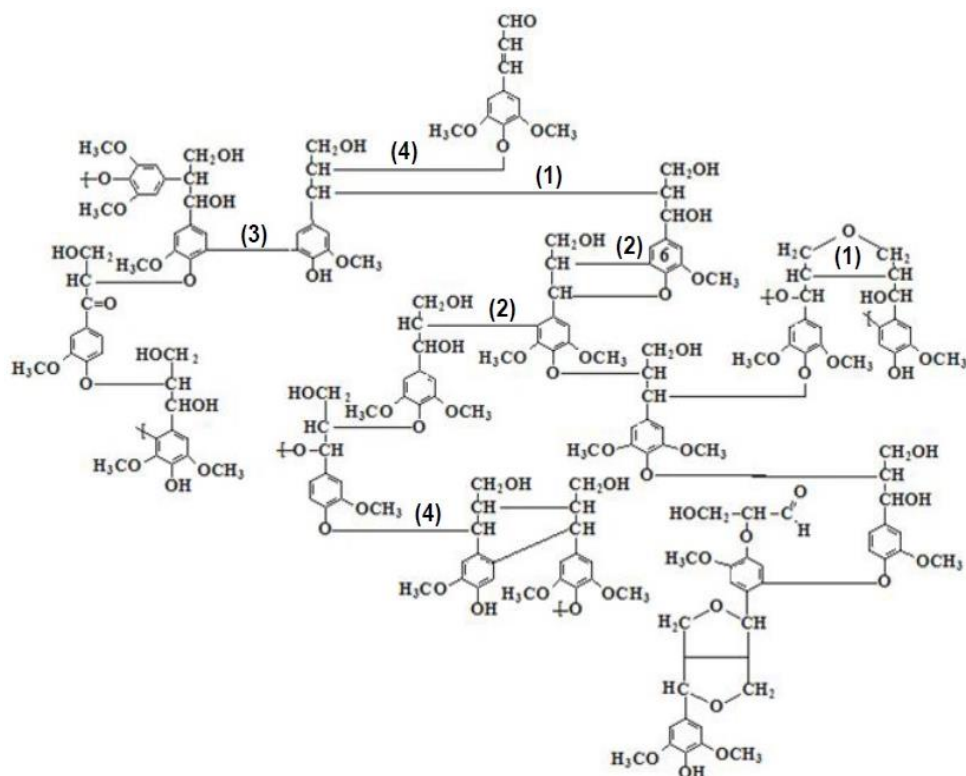


FIGURA 7 – MODELO ESTRUTURAL DA LIGNINA DERIVADA DA ESPÉCIE *Picea abies* (GIMNOSPERMA) (HIGUCHI, 1985).

Finalmente, existem componentes de baixa massa molar que não estão ligados diretamente à parede celular denominados extraíveis, que correspondem a intermediários do metabolismo dos vegetais ou substâncias de reserva energética ou proteção contra o ataque de micro-organismos e insetos. Sua composição e ocorrência são governadas por uma série de fatores de natureza genética e climática (HILLIS, 1972; ROCHA, 2011). Os extraíveis são responsáveis pela cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas características da planta e o seu conteúdo e proporção varia de uma espécie para outra, e pode ser aplicado na área da medicina, cosméticos e preservantes (KLOCK *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em folhosas, o percentual de extraíveis varia de 2 a 3%, enquanto coníferas e gramíneas podem apresentar até 10% e 26% desta fração, respectivamente (MORAIS *et al.*, 2012; SARTO e SANSIGOLO, 2010).

Os extraíveis compreendem uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos, como sais, óxidos, compostos fenólicos simples e complexos, açúcares, gomas, terpenos, alcalóides, ceras, proteínas, resinas e compostos

lipofílicos como ácidos graxos saturados e insaturados, esteróides, hidrocarbonetos e álcoois graxos (CARVALHO, 2011; SANTOS, 2008; SHESHMANI, 2013). Este componentes podem ser removidos da biomassa lignocelulósica utilizando solventes como hexano, éter dietílico, diclorometano, etanol/tolueno, etanol, metanol e água, produzindo extratos complexos contendo uma grande variedade de componentes (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SARTO e SANSIGOLO, 2010). Por outro lado, alguns procedimentos sugerem o uso de extrações sequenciais em uma ordem crescente de polaridade, de modo a permitir a remoção de famílias de compostos orgânicos com propriedades distintas, facilitando inclusive a sua caracterização por métodos cromatográficos e espectrométricos de análise.

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem em sua estrutura um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila (SHAHIDI e NACZK, 2006). Alguns compostos fenólicos são provenientes da biossíntese da lignina, como os alcoóis vanílico e coniferílico, aldeídos aromáticos como a vanilina e o siringaldeído e cetonas como a acetovanilina, sendo que muitos destes apresentam propriedades fungicidas (FIGURA 8) (MORAIS *et al.*, 2012; SILVÉRIO, 2008).

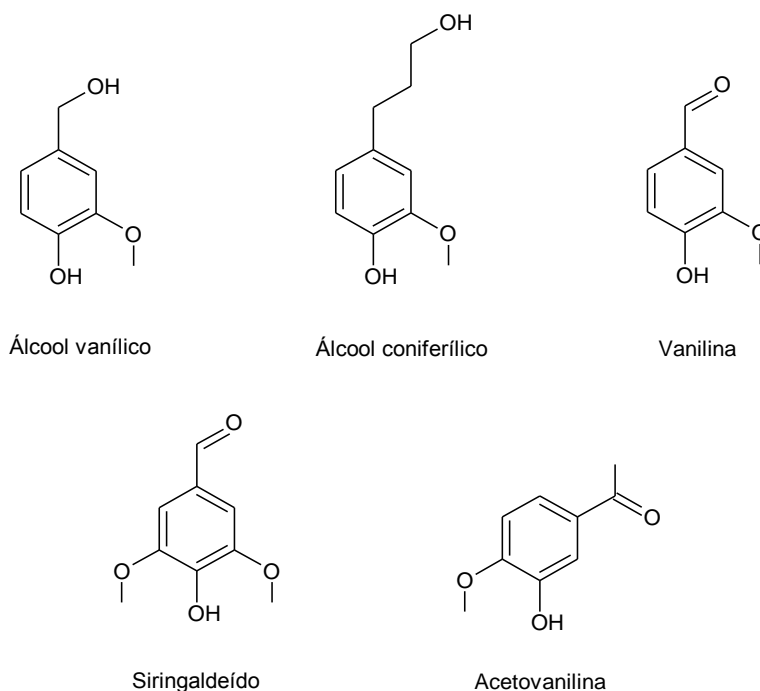


FIGURA 8 – POSSÍVEIS COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES NOS EXTRAÍVEIS DE BIOMASSAS VEGETAIS (BARBOSA *et al.*, 2005; MORAIS *et al.*, 2012; SILVÉRIO, 2008).

Backlund *et al.* (2014) analisaram os extraíveis de *Pinus contorta* utilizando hexano em extrator Soxhlet durante 4 h. Duas famílias foram identificadas em maior proporção, as dos ésteres e dos ácidos graxos, sendo que os ácidos octadecanóico e tetradecanóico se apresentaram como majoritários. Kilulya *et al.* (2014) extraíram os compostos lipofílicos presente nos extraíveis de eucalipto com acetona em extrator Soxhlet e a composição destes foi majoritariamente de ácidos graxos de C₈ a C₂₈ como, por exemplo, os ácidos hexadecanóico, 9,12-octadecenóico e 2 hidroxidocosanóico. Os esteroides corresponderam à segunda classe principal, sendo representados por compostos como sitosterol, estigmasterol e campesterol. Álcoois graxos também foram encontrados como, 1-dodecanol, 1-eicosanol e 1-tricosanol. Vilela *et al.* (2014) obtiveram os extraíveis de *Halimione portulacoides* por extração com diclorometano em Soxhlet e identificaram compostos como os ácidos tetradecanóico, docosanóico e hexacoisanóico, 1-hexadecanol, 1-eicosanol, 1-octacosanol, pentacosanol, nonacosanol, campesterol e estigmasterol, entre outros. Fernandez *et al.* (2001) identificou os extrativos de *Populus tremuloides* removidos por extração Soxhlet utilizando acetona por um período de 8 h. Foram identificados vários compostos como ácido benzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido 3-(4-hidroxifenil)-propanóico, 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-propenal, ácido hexadecanóico, ácido octadecanóico, 1-docosanol e flavonoides como 4,5,7-trihidroxi-flavonona e 3,4,5,7-tetrahidroxi-flavona. Estes autores ainda identificaram a presença de lipídeos como α -tocoferol e tri-9,12-octadecadienoato de glicerila.

Vários autores já evidenciaram o poder inibitório de compostos fenólicos sobre as etapas de hidrólise enzimática e de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000). Como vários compostos fenólicos se encontram presentes nos extraíveis do bagaço, muitos deles como precursores da estrutura da lignina, é provável que a remoção destes antes do pré-tratamento pudesse evitar ao menos em parte estes efeitos inibitórios. Por outro lado, dependendo de sua análise qualitativa e quantitativa, substâncias de baixa massa molar desta e de outras classes de compostos orgânicos podem apresentar grande interesse para a indústria. No entanto, nenhum estudo foi até então realizado para avaliar estas questões.

Uma grande variedade de compostos inorgânicos também são encontrados em biomassas, particularmente gramíneas e palha de cereais. Por

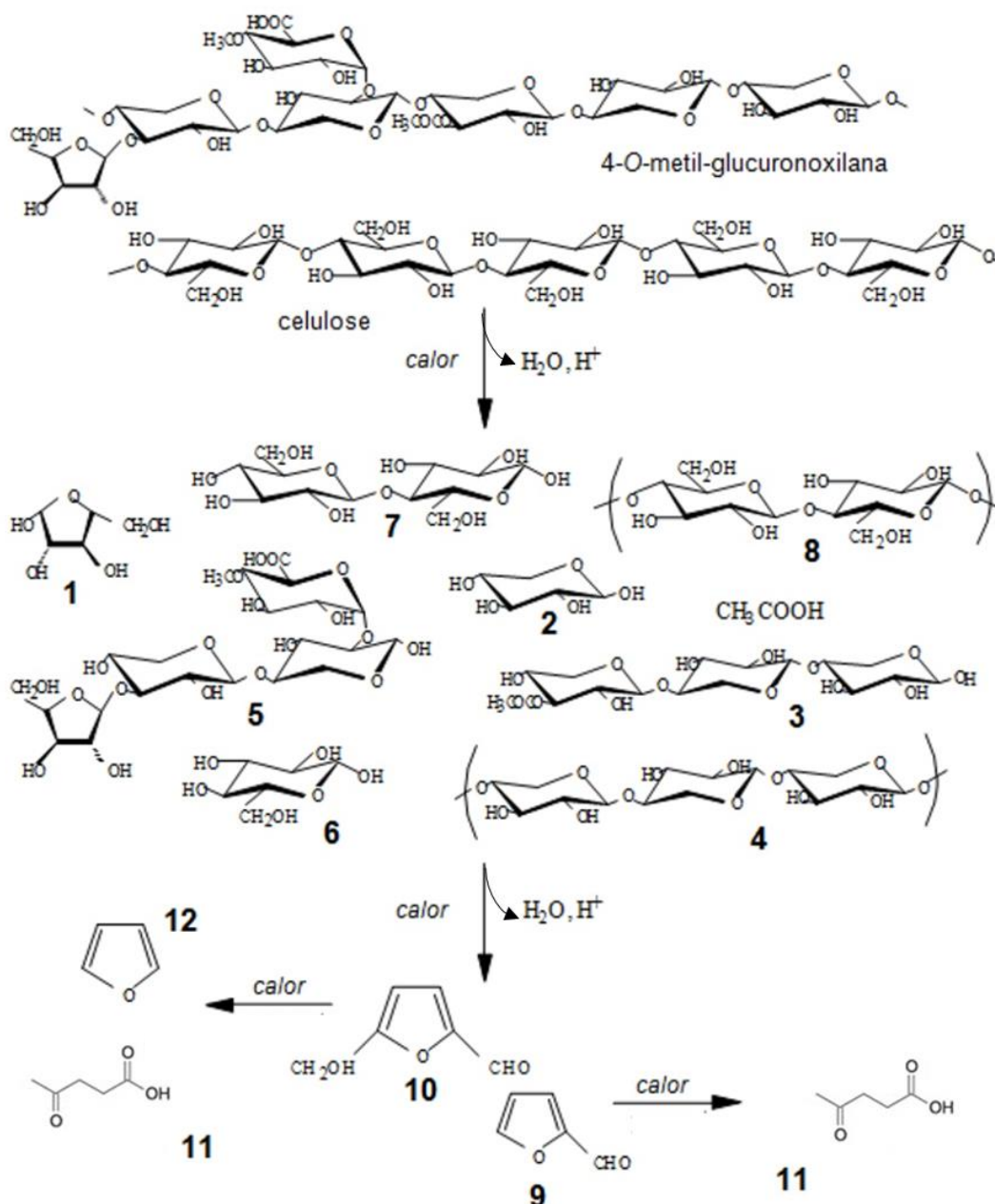
exemplo, a análise das cinzas do bagaço de cana acusou a presença de óxidos simples como CaO, MgO, MnO, K₂O, Na₂O, SrO, TiO₂, Fe₂O₃, Al₂O₃ e SiO₂. Além de sua importância no metabolismo das plantas, a presença de alguns destes componentes pode ser atribuída à contaminação com solo (Al₂O₃ e SiO₂), o que depende fortemente da tecnologia utilizada para a colheita e processamento dos colmos da cana-de-açúcar, bem como à eventual abrasão de acessórios dos equipamentos de corte e moagem (TiO₂, Fe₂O₃). (SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014).

1.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Para se tornar suscetível à bioconversão, a biomassa lignocelulósica *in natura* necessita de um processo de hidrólise para converter seus polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (CARDONA *et al.*, 2010; CARVALHO, 2011). Tal processo não é trivial devido às interações entre a celulose e as hemiceluloses presentes na parede celular de vegetais superiores, assim como à relação destes polissacarídeos com a lignina, que atua como uma barreira física para as enzimas. Assim, o pré-tratamento reduz a interação entre esses componentes, expõe os polissacarídeos da parede celular e favorece a sua hidrólise a açúcares passíveis de fermentação, diminuindo assim a cristalinidade e a organização estrutural dos polissacarídeos da biomassa, o tamanho da fibra, o conteúdo de hemiceluloses e lignina e aumentando propriedades texturais como porosidade e área superficial (OGEDA e PETRI, 2010; PHITSUWAN *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2012).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é fundamental para aproveitamento integral e mais eficiente de todo o carboidrato neles disponível (GONÇALVEZ, 2010). Entretanto, existem fatores que devem ser analisados para que um pré-tratamento seja considerado eficiente, como oferecer elevada recuperação de carboidratos, propiciar elevada acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática, apresentar produtos com elevada concentração de sólidos, ter baixa demanda energética e evitar a formação de subprodutos como hidroximetilfurfural, furfural, ácidos e compostos fenólicos que são oriundos da desidratação de hexoses (glucose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) e degradação da lignina (RAMUSSEN *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*,

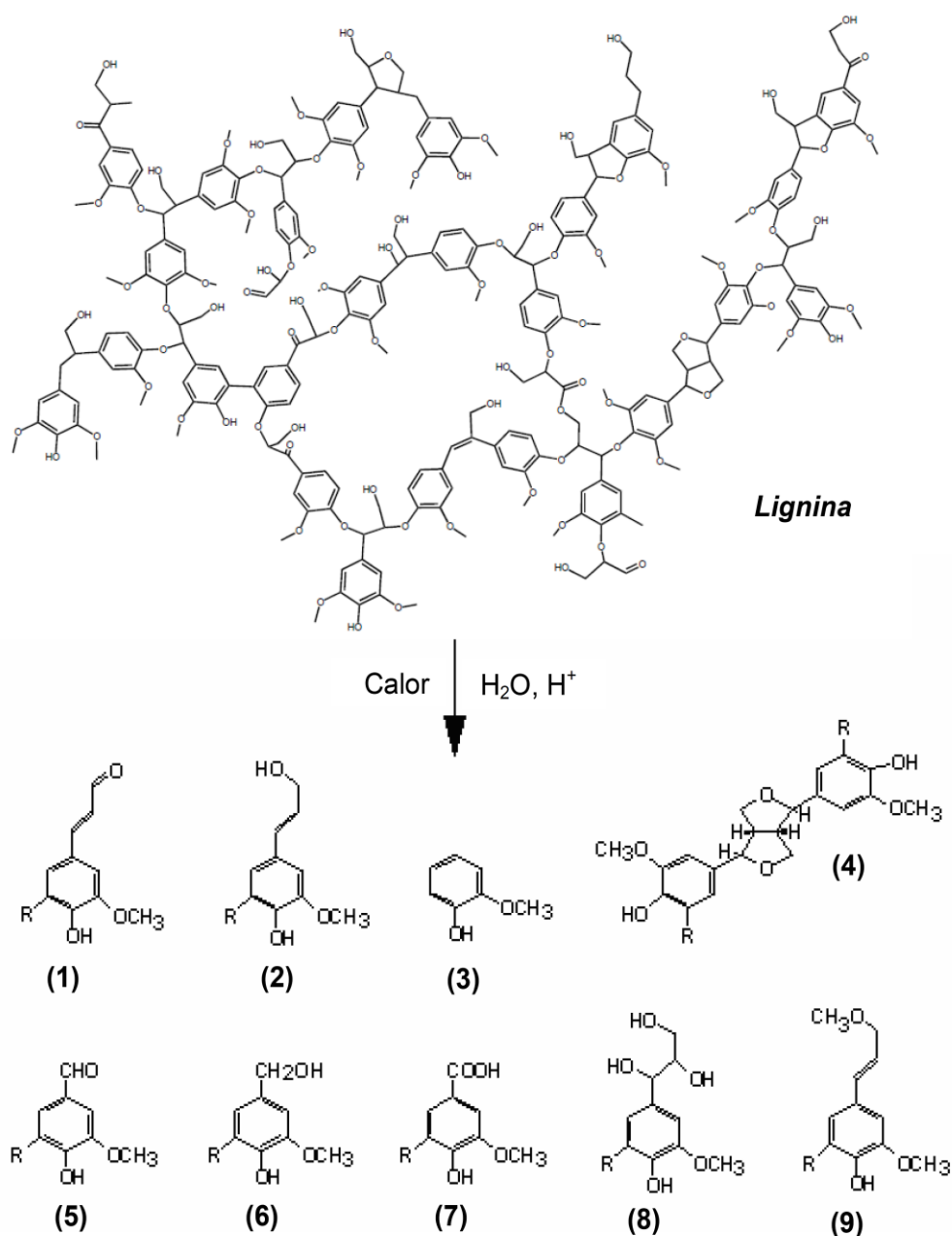
2012). A FIGURA 9 apresentem os principais produtos formados a partir do pré-tratamento por explosão a vapor. O ácido levulínico pode ser formado a partir do HMF e do furfural, enquanto que o ácido fórmico é proveniente do HMF. A formação do ácido acético se dá a partir da hidrólise dos grupamento acetila presente nas hemiceluloses (RAMUSSEN *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2012).



(1) Arabinose; (2) xilose; (3) xilo-oligômeros (3 resíduos); (4) xilo-oligômeros de alta massa molar; (5) oligossacarídeos ácidos ramificados; (6) glucose; (7) celobiose; (8) celo-oligômeros; (9) furfural; (10) hidroximetilfurfural; (11) ácido levulínico e (12) furano.

FIGURA 9 – COMPOSTOS FORMADOS DURANTE A EXPLOSÃO A VAPOR A PARTIR DA CELULOSE E DAS HEMICELULOSES (4-O-METILGLUCURONOXILANA) (RAMOS, 2003).

Compostos fenólicos liberados durante o pré-tratamento são provenientes da degradação da lignina. Isto pode ser decorrente de três tipos de reações: hidrólise ácida, clivagem homolítica e reações de condensação. Essas reações ocorrem a partir da quebra das ligações ariléter dos tipos α -O-4 e β -O-4 existentes na estrutura da lignina (FIGURA 10) (RAMOS, 2003).



(1) Sinapaldeído (R = OCH₃) ou coniferaldeído (R = H); (2) álcool coniferílico (R = OCH₃) ou álcool sinapílico (R = H); (3) guaiacol; (4)iringaresinol; (5)iringaldeído (R = OCH₃) ou vanilina (R = H); (6) álcooliringílico (R = OCH₃) ou álcool vanílico (R = H); (7) ácidoiringílico (R = OCH₃) ou ácido vanílico (R = H); (8)iringilglicerol (R = OCH₃) ou guaiacilglicerol (R = H); (9) γ -metoxi-iringil (R = OCH₃) ou γ -metoxi-guaiacil (R = H).

FIGURA 10 – COMPOSTOS FENÓLICOS FORMADOS A PARTIR DA LIGNINA DURANTE A EXPLOSÃO A VAPOR (RAMOS, 2003).

A formação destes produtos depende do tipo de pré-tratamento ao qual a biomassa é submetida. Diferentes métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura para separação e aproveitamento de materiais lignocelulósicos. Tais técnicas são baseadas em processos mecânicos, físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes. Dentre estes processos, podem ser destacados os que utilizam hidrólise ácida (ELIANA *et al.*, 2014), reagentes alcalinos (SOUZA *et al.*, 2012), explosão a vapor (AGUIAR *et al.*, 2013; RAMOS, 2003; ROCHA *et al.*, 2012b), oxidação úmida (MARTÍN, 2007), amônia líquida (*Ammonia Fibre Explosion* ou AFEX) (GAO *et al.*, 2010a), água quente (LYND *et al.*, 2002), moagem (INOUE *et al.*, 2009), solventes orgânicos (CASTRO *et al.*, 2010) e pré-tratamentos biológicos (YU *et al.*, 2009), todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa.

Os diferentes pré-tratamentos e suas definições encontram-se discriminados na TABELA 1. Os métodos físicos consistem em diminuir o tamanho da partícula e a cristalinidade da biomassa lignocelulósica, aumentando assim a área superficial e facilitando a ação das enzimas sobre a biomassa. Nos métodos químicos, modificações ocorrem na estrutura da parede celular como a solubilização das hemiceluloses e lignina, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da biomassa. Já os métodos biológicos consistem na utilização de micro-organismos (geralmente fungos) que são capazes de secretar enzimas extracelulares capazes de degradar a lignina e as hemiceluloses com certa seletividade (ALVIRA *et al.*, 2010; BEHERA *et al.*, 2014; OGEDA e PETRI, 2010; RAMOS, 2003).

O pré-tratamento por explosão a vapor é umas das técnicas mais eficientes para o fracionamento do material lignocelulósico e esta se destaca por agir tanto física como quimicamente na estrutura da biomassa. Durante este processo as ligações presentes nos componentes macromoleculares são em parte quebradas, de modo que, quando ocorre a descompressão, a biomassa é desestruturada gerando um aumento na área superficial e um conseqüente aumento de sua suscetibilidade à hidrólise devido à remoção das hemiceluloses e de parte da lignina. No entanto, condições mais severas geram modificações que deixam a lignina mais condensada e mais inibitória (BRUGNAGO *et al.*, 2011; GOUVEIA *et al.*, 2009; RAMOS, 2003).

TABELA 1 – TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTOS UTILIZADOS EM BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.

	Processo	Descrição	Referência
Físico	Moagem	O tamanho da partícula é reduzido, aumentando a digestibilidade da biomassa pelo aumento de sua área superficial de contato	SILVA <i>et al.</i> , 2010b.
	Irradiação	Absorção de energia no interior da molécula formando radicais com diferentes reatividades que são capazes de despolimerizar a lignina e os polissacarídeos da biomassa	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2013.
	Ultrassom	Atua na integridade estrutural da biomassa reduzindo o tamanho das partículas quando aplicado ultrassom de alta potência. Desintegra a estrutura da lignina e das hemiceluloses e modifica a ultraestrutura da celulose	KASHNINEJAD e TABIL, 2011.
Químico	AFEX	A exposição da biomassa à amônia líquida sob pressões e temperaturas elevadas diminui o índice de cristalinidade da celulose, hidrolisa as hemiceluloses e despolimeriza a lignina.	BALS <i>et al.</i> , 2010; UPPUGUNDLA <i>et al.</i> , 2014.
	Ácidos (HCl, H ₂ SO ₄ , H ₃ PO ₄ , HNO ₃)	Podem ser realizados em meio diluído ou concentrado e consistem na solubilização da fração hemicelulósica, aumentando a acessibilidade a celulose e modificando parcialmente a lignina	PAPPAS <i>et al.</i> , 2014; ZHOU <i>et al.</i> , 2014.
	Extração alcalina	Ocorre o rompimento da parede celular dissolvendo sílica, lignina e hemicelulose e promovendo o inchamento da celulose, diminuindo assim sua cristalinidade.	CABRERA <i>et al.</i> , 2014; RABELO <i>et al.</i> , 2014.
	Líquido iônico	Consiste na habilidade de alguns líquidos iônicos em dissolver carboidratos ou lignina sobre condições moderadas. No primeiro caso, a celulose deve ser regenerada pela a adição de um anti solvente como, por exemplo, a água.	SWATLOSKI <i>et al.</i> , 2002; WEERACHANCHAI e LEE, 2014.
	CO ₂ supercrítico	CO ₂ no estado supercrítico apresenta baixa viscosidade e tensão superficial zero; deste modo, penetra rapidamente na estrutura da biomassa, promovendo o rompimento de sua estrutura, aumentando a área superficial e diminuindo o grau de polimerização	GAO <i>et al.</i> , 2010b; PAN e TAN, 2014.

Continuação da Tabela 1

Biológico	Fungos ou enzimas	Biodegradação da lignina e da hemicelulose. Os fundos da podridão branca são os mais utilizados por produzirem enzimas como lacases e peroxidases que degradam a lignina	ISHOLA <i>et al.</i> , 2014; MA <i>et al.</i> , 2010.
	Explosão a vapor	Consiste na desconstrução da estrutura da parede celular pela aplicação de vapor a alta pressão seguido de uma rápida descompressão. Pode ser realizada na ausência ou na presença de catalisadores como ácidos orgânicos ou minerais	AGUIAR <i>et al.</i> , 2013; CASTRO <i>et al.</i> , 2014; MARTIN-SAMPEDRO <i>et al.</i> , 2013.
Combinado	Organosolve	Consiste na utilização de solventes orgânicos ou aquosos que promovem a solubilização da lignina, sendo esta recuperada relativamente pura como um coproduto	AMIRI <i>et al.</i> , 2014; PARK <i>et al.</i> , 2010.
	Água quente a alta pressão	A pressão é utilizada para manter a água no estado líquido, ocorrendo assim a solubilização das hemiceluloses e tornando a celulose mais acessível	LASER <i>et al.</i> , 2002; PÉREZ <i>et al.</i> , 2008.
	Oxidação úmida	Tratamento a partir de água e oxigênio, onde ocorrem reações hidrolíticas e oxidativas sob condições específicas	ARVANITI <i>et al.</i> , 2012.

Durante o processo de explosão a vapor, alguns ácidos orgânicos são formados por hidrólise (ácido acético) ou por decomposição de pentoses e hexoses (ácido levulínico e ácido fórmico) sob condições de alta pressão e temperatura e estes mesmos ácidos orgânicos catalisam novas reações de hidrólise e desidratação em um processo conhecido como auto-hidrólise. Além disto, no momento em que a pressão é liberada (explosão ou descompressão), ocorre o rompimento das fibras por consequência de um grande efeito de cisalhamento (BEHERA *et al.*, 2014; RAMOS, 2003). Rocha *et al.* (2012a) pré-tratou o bagaço por explosão a vapor a 190 °C por 15 min, e obteve uma recuperação de 82,6% do teor de hemicelulose na fração solúvel.

A explosão a vapor também pode ocorrer na presença de catalisadores como H₂SO₄ (CHEN *et al.*, 2013), H₃PO₄ (PITARELO *et al.*, 2013), SO₂ e CO₂ (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2010). O pré-tratamento utilizando catalisadores

ácidos aumenta as reações de hidrólise das hemiceluloses, promovendo modificações mais significativas na estrutura da lignina que expõem a celulose à conversão; além disto, a presença do catalisador reduz a temperatura e o tempo de pré-tratamento, gerando uma menor formação de subprodutos e/ou compostos inibitórios. Experimentos com o bagaço de cana realizados em Lund (Suécia) tendo H_2SO_4 e SO_2 como catalisadores alcançaram elevadas taxas de reação, com uma remoção de 60-80% de hemiceluloses na forma de xilose e pouca perda de celulose na forma de glucose (3-5%) (BAUDEL, 2006). O uso de H_3PO_4 como catalisador oferece menor efeito destrutivo sobre as pentoses e leva a um menor acúmulo de furfural no meio da reação, além de minimizar os efeitos de corrosão interna nos equipamentos por ser um ácido mais fraco (GÁMEZ, 2006). Zeng *et al.* (2014) pré-trataram bagaço de cana impregnado com ácido fosfórico (0,5% v v⁻¹) por explosão a vapor a 180 °C por 10 min, e obtiveram um teor de 80% de recuperação de hemiceluloses na fração solúvel. Já no caso do bagaço explodido por Amores *et al.* (2013) a 215 °C por 5 min, o teor de recuperação foi de apenas 25% de hemiceluloses; neste caso, apesar de menor tempo de residência no reator, a temperatura elevada provavelmente favoreceu a maior formação de subprodutos, reduzindo o percentual de recuperação de seus componentes majoritários.

No Brasil já existem usinas piloto que utilizarão no processo alguns dos tipos de pré-tratamento citados na Tabela 1 para produção de etanol celulósico. A primeira usina brasileira de etanol celulósico está instalada em Alagoas e é um investimento da GranBio (EUA) cuja estimativa de produção é de 82 milhões de litros de etanol por ano. Outra usina piloto é a da Usina São Manoel abrigará, cuja tecnologia foi desenvolvida pelo Centro de Tecnologia Canavieira em Piracicaba (SP). A Raízen, que foi formada por uma sociedade entre a Cosan e Shell, finalizará este ano a sua primeira unidade industrial de etanol celulósico em Piracicaba (SP) e a Petrobras vem anunciando o seu interesse nesta área, optando por tecnologia própria e prevendo que os seus postos serão abastecidos com etanol celulósico a partir de 2015. No mundo, três empresas inauguraram unidades de etanol celulósico este ano: a usina piloto da DuPont (Nevada, Iowa) iniciou construção em 2012 e terá uma capacidade de produção estimada de 113 milhões de litros de etanol por ano, enquanto que as usinas da Abengoa (Hugoton, Kansas) e a construída em parceria entre a Poet-DSM (Emmetsburg,

Iowa) estimam produzir 95 milhões de litros de etanol por ano (INCT, 2014; Portal da Unica, 2014a; Portal da Unica, 2014b).

1.4 Hidrólise enzimática de lignocelulose pré-tratada

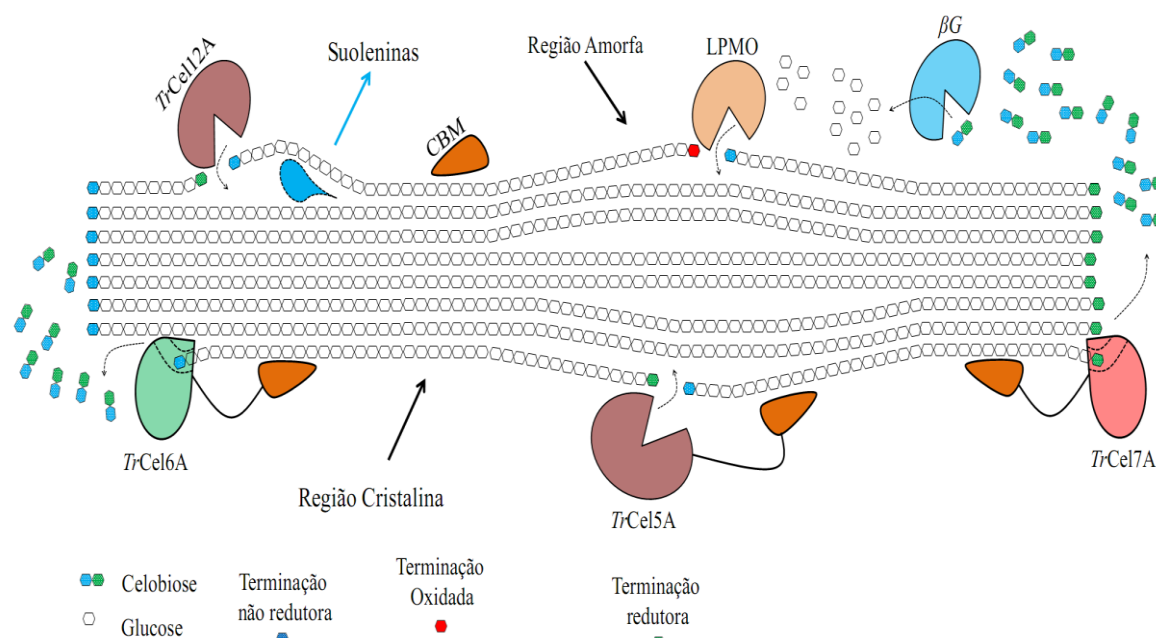
Depois do pré-tratamento, o material sofre um processo de hidrólise dos polissacarídeos formando mono e dissacarídeos que, na etapa final, passam por um processo de fermentação resultando em etanol celulósico (OGEDA e PETRI, 2010).

A hidrólise do material lignocelulósico pode ser realizada pela rota ácida ou enzimática. No caso da hidrólise ácida, apesar de ser uma reação rápida, há corrosão e geração de produtos de degradação de açúcares que podem atuar como inibidores na etapa de fermentação. Já a hidrólise enzimática, embora de alto custo pelo valor comercial das enzimas utilizadas, pode ser realizada em condições mais brandas de reação, evitando assim a formação de subprodutos e conduzindo a melhores resultados de fermentação (CARVALHO, 2011; HAMELINCK *et al.*, 2005; WIJAYA *et al.*, 2014).

A hidrólise enzimática da celulose é uma reação heterogênea conduzida por um complexo enzimático que compreende três classes de hidrolases: as endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases, as exo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases ou celobiohidrolases (CBHI e CBHII) e as β -(1 \rightarrow 4)-glucosidases, cuja sinergia é essencial para que todo o carboidrato disponível seja hidrolisado (SANTOS e GOUVEIA, 2009). Segundo Bon *et al.*, (2008), um única hidrolase seria incapaz de hidrolisar eficientemente a celulose, sendo necessário um sinergismo entre as hidrolases. O sinergismo existente entre as celulases está apresentado na FIGURA 11 (SILVEIRA *et al.*, 2014).

As endoglucanases são enzimas que agem em pontos aleatórios da região não cristalina diminuindo o grau de polimerização da celulose e este modo de ação depende da estrutura de seu sítio catalítico, que se apresenta na forma de uma fenda capaz de acomodar as cadeias da celulose e hidrolisar ligações β -(1 \rightarrow 4) internas (CARVALHO, 2011; SANTOS e GOUVEIA, 2009). As celobiohidrolases são responsáveis pela formação de celobiose a partir das extremidades redutoras e não-redutoras da cadeia de celulose. Estas enzimas podem ser divididas em CBHI e CBHII, sendo a CBHI a responsável pelo ataque

nos terminais redutores e a CBHII responsável pelo ataque nos terminais não-redutores (BRINK e VRIES, 2011; LIMA *et al.*, 2013). Por fim, as β -glucosidases, convertem a celobiose e celo-oligômeros de baixa massa molar em glicose (CARVALHO, 2011; SANTOS e GOUVEIA, 2009). A hidrólise enzimática depende do sinergismo entre as endo- e exo-glucanases, de modo que as endoglucanases clivam as cadeias de celulose fornecendo terminais redutores e não redutores para a ação das exoglucanases (OGEDA e PETRI, 2010). Além disto, as β -glucosidases contribuem pela remoção da celobiose do meio, já que esta atua como inibidor competitivo da celobiohidrolases.



TRCEL12A, TRCEL5A = ENDOGLUCANASES; TRCEL6A, TRCEL7A = EXOGLUCANASES; β -G = β -GLUCOSIDASES; GH61 = GLICOSIL HIDROLASE; CBM = MÓDULO DE LIGAÇÃO AO CARBOIDRATO

FIGURA 11 – SINERGISMO ENTRE AS CELULASES E PROTEÍNAS ACESSÓRIAS DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO MATERIAL CELULÓSICO (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Atualmente, outra classe enzimática, denominada AA9 (Atividades Auxiliares da Família 9), anteriormente classificadas como GH61 (Glicosídeo Hidrolases da Família 61), tem recebido atenção por exercer papel fundamental na obtenção de elevados rendimentos de sacarificação em menor curso de tempo. Ao contrário das hidrolases, estas atuam via reações de oxidação-redução, produzindo compostos oxidados tanto no C1 (lactonas, as quais podem

ser hidrolisadas à ácidos aldônicos) como no carbono 4 (cetonas). Tais enzimas atuam tanto em regiões amorfas como em regiões cristalinas onde outras enzimas não possuem atividade, promovendo alto valor de sinergismo com outros componentes do complexo (SILVEIRA *et al.*, 2014).

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos depende de processos contínuos de adsorção e dessorção das endo- e exoglucanases.

Por isto, estas enzimas possuem em sua estrutura um Módulo de Ligação a Carboidratos (CBM – do inglês *Carbohydrate binding module*), que corresponde a um peptídeo não hidrolítico que facilita a interação destas com a superfície do substrato (BORASTON, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2014). Neste sentido, a lignina pode representar uma barreira à hidrólise enzimática da celulose, pois sua estrutura polimérica tridimensional e amorfa permite que as enzimas adsorvam em sua superfície por interações hidrofóbicas, diminuindo a disponibilidade destas para a etapa de hidrólise da celulose ou até mesmo levando à sua inativação (PALONEN, 2004).

Como mencionado acima, fatores associados à natureza das enzimas podem influenciar o processo de hidrólise. São eles o sinergismo entre as celulasas, a adsorção e dessorção da enzima e a inibição provocada pelo produto final, além da carga de enzima utilizada e de outros parâmetros de controle como agitação, temperatura e pH do meio (PANDEY *et al.*, 2000). No entanto, algumas propriedades do substrato também podem influenciar o processo como a sua cristalinidade, área superficial de contato, volumetria de poros e teor de lignina e hemiceluloses (COSTA *et al.*, 2013; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). O grau de polimerização e a cristalinidade são alterados a partir da etapa do pré-tratamento, sendo que a redução da cristalinidade facilita a ação das endoglucanases.

Por outro lado, dependendo do tipo e das condições do pré-tratamento, produtos de inibição podem ser formados como furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, além da probabilidade da conversão de extraíveis em inibidores por apresentar em sua composição uma diversidade de compostos fenólicos. Apesar de boa parte destes inibidores serem removidos da fração fibrosa por lavagem aquosa após o processo de pré-tratamento, alguns ainda permanecem devido à baixa solubilidade em água ou ineficiência do processo de lavagem. A utilização de altos teores de sólidos totais também afetam a taxa inicial da hidrólise, pois dificultam os fenômenos de transferência de massas,

aumentam a perda de atividade por cisalhamento e aceleram os efeitos de inibição das enzimas. Estes fatos dependem da composição química do substrato e da relação da enzima/substrato utilizado no ensaio. Além disso, o uso de altas cargas de substrato aumentam o consumo de energia necessário para a obtenção de uma agitação eficiente do meio (LINDEDAM *et al.*, 2010; PANDEY *et al.*, 2000; TOQUERO e BOLADO, 2014).

Carrasco *et al.* (2010) hidrolisaram o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (190 °C, 10 min) com Celluclast 1,5L suplementada com Novozym 188 por 72 h. Para a hidrólise foram utilizadas amostras de bagaço não lavado e lavado com água para avaliar a influência dos inibidores gerados durante o pré-tratamento. O bagaço não lavado apresentou uma produção de glucose de 20 g g⁻¹ de massa seca, valor este menor do que o obtido para o bagaço lavado (29 g g⁻¹), demonstrando que a lavagem removeu parte dos inibidores formados durante o pré-tratamento.

Outros fatores que podem interferir na taxa de sacarificação da celulose são as condições experimentais, tais como pH, temperatura e a agitação do meio. A temperatura tem uma relação positiva entre a adsorção do substrato e a sacarificação até 60 °C, mas, acima desta temperatura ocorre a desnaturação da enzima e sua conseqüente inativação. As condições já foram otimizadas para as celulases provenientes da *T. reesei*, sendo pH 4,8 e temperatura de 45-50 °C. Entretanto, enzimas isoladas de outros micro-organismos podem exigir outras condições para que possam apresentar o máximo do seu desempenho (PANDEY *et al.*, 2000; SUN, 2004).

Vários micro-organismos podem produzir hidrolases para sua utilização na etapa de hidrólise enzimática, como fungos filamentosos aeróbicos, bactérias termofílicas anaeróbicas, fungos anaeróbicos, dentre outros. Nas últimas décadas, um fungo filamentoso tem sido muito estudado, o *Trichoderma reesei*, sendo que este domina a produção industrial de hidrolases até hoje (OLOFSSON *et al.*, 2008).

1.5 Fermentação

Finalizada a etapa de hidrólise, o passo seguinte é a fermentação da glucose a etanol e dióxido de carbono por uma levedura em condições de

anaerobiose (HAGMAN *et al.*, 2012). Teoricamente, a cada 100 g de glucose pode-se produzir 51,4 g de etanol e 48,8 g dióxido de carbono, entretanto, na prática, os micro-organismos utilizam parte da glucose para seu crescimento, de modo que o rendimento relacionado ao etanol é geralmente menor que 100% (PANDEY *et al.*, 2000).

O micro-organismo mais utilizado para este processo é uma levedura fermentativa denominada *Saccharomyces cerevisiae*, que tem aplicação industrial por fermentar hexoses eficientemente, resultando em altas produções de etanol. Este micro-organismo apresenta atividade ótima em condições controladas como pH 4,5 e temperatura de 37 °C. Entretanto, esta levedura não é capaz de fermentar pentoses (CORAL, 2009; SANTOS *et al.*, 2010; STAMBUK *et al.*, 2008; YUAN *et al.*, 2011), cuja conversão tem sido estudada com as leveduras *Pichia stipitis* e a *Candida shehatae* (PANDEY *et al.*, 2000).

Derivados de furânicos, compostos aromáticos e ácidos fracos produzidos durante o pré-tratamento podem inibir a etapa de fermentação. Os compostos aromáticos são provenientes da degradação da lignina como vanilina e 4-hidroxibenzaldeído, enquanto HMF e furfural são produtos da desidratação de carboidratos. Além disto, o HMF pode ser degradado nos ácidos levulínico e fórmico, conforme demonstrado por vários autores (HAGMAN *et al.*, 2012; HAWKINS e DORAN-PETERSON, 2011). Tais inibidores são proveniente do tipo e das condições do pré-tratamento utilizado e podem provocar efeitos como redução da velocidade de crescimento da levedura e diminuição da produtividade volumétrica de etanol, da sua produtividade específica e da produção de biomassa (CARDONA e SANCHEZ, 2007).

Huang *et al.* (2011) analisaram a influência dos inibidores presentes na palha de milho pré-tratada por explosão a vapor (205 °C, 5,4 min) durante a fermentação com *S. cerevisiae* e observaram que a partir de concentrações de 4 e 6 g L⁻¹, os ácidos fórmico e acético começam a inibir a produção de etanol. Na literatura tem sido relatado que o furfural e o HMF apresentam inibição em concentrações a partir de 0,5 e 1 g L⁻¹, respectivamente (PALMQVIST *et al.*, 1996). Entretanto, nos estudos de Huang *et al.* (2011), estes inibidores não apresentaram inibição até uma concentração de 4 g L⁻¹. Algumas linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de converter o HMF em um composto menos tóxico, o 2,5-bis-hidroximetilfurano, e de metabolizar alguns compostos fenólicos em

derivados menos tóxicos (HAWKINS e DORAN-PETERSON, 2011).

Entre os principais processos de fermentação até hoje investigados, dois processos se destacam: a Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF) e a Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF). O processo de SSF apresenta vantagens sobre o processo de SHF por utilizar apenas um reator, gerar altas produções, diminuir a inibição dos açúcares que inibem a atividade da celulases e exigir menores tempos de reação. Porém, a levedura não pode ser reutilizada devido a sua difícil separação da lignina (CORAL, 2009; OLOFSSON *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012).

Linde *et al.* (2008) realizaram processos de SSF e SHF com a palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor (190 °C, 10 min) impregnado com ácido sulfúrico, sendo que a enzima utilizada consistiu de uma mistura de Celluclast 1,5L (14 FPU g⁻¹ massa seca) suplementada com Novozym 188 (18 IU g⁻¹ massa seca) e a concentração de levedura utilizada foi de 1 g L⁻¹ de *S. cerevisiae*. No processo de SSF, uma carga de 5% de sólidos totais foi utilizada com um rendimento de 12 g L⁻¹ de etanol. Já quando os hidrolisados foram fermentados via SHF, o rendimento foi de 22 g L⁻¹. A diferença pode ser atribuída principalmente às condições de operação de cada etapa, de modo que o maior rendimento no SHF se deve a realização de cada etapa em sua condição ótima.

Shen *et al.* (2011) realizaram experimentos de SHF e SSF com sorgo sacaríneo pré-tratado por explosão a vapor (190 °C, 5 min). A etapa de hidrólise foi realizada com 12% de sólidos totais por 72 h e a celulase comercial utilizada foi a Spezyme-CP (7,5 FPU g⁻¹ de celulose) suplementada com Novozym 188 (10 CBU g⁻¹ de celulose). A fermentação dos hidrolisados e o processo de SSF utilizou 3 g L⁻¹ de *S. cerevisiae*. No processo de SHF, o rendimento de etanol foi de 31 g L⁻¹, enquanto que, no caso do processo de SSF, o rendimento foi de 21 g L⁻¹ de etanol. Novamente, o rendimento de etanol foi superior no processo de SHF.

De um modo geral, o pré-tratamento representa uma etapa crucial do processo de produção de etanol celulósico, pois dele dependem a maximização dos rendimentos de recuperação e o aumento da suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática, sem que a fermentabilidade dos hidrolisados obtidos seja comprometida pela presença de compostos inibitórios como ácidos orgânicos, compostos fenólicos e produtos de desidratação. Neste sentido, é importante

salientar que compostos inibitórios também podem resultar de modificações químicas dos extraíveis, já que estes representam componentes de baixa massa molar de alta reatividade (SANTOS, 2008). Por esta razão, investigar a influência dos extraíveis sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana utilizando diferentes catalisadores, e sobre as etapas subsequentes de hidrólise enzimática e de fermentação, representam parte dos principais objetivos deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos extraíveis sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar, na presença e na ausência de catalisador ácido (H_3PO_4 e H_2SO_4), e determinar a sua subsequente influência sobre os processos de hidrólise enzimática e de fermentação.

2.2 Objetivos específicos

A. Extrair e caracterizar os compostos solúveis em etanol 95% presentes em amostras industriais de bagaço de cana;

B. Produzir substratos celulósicos a partir do bagaço de cana na presença e na ausência de extraíveis, utilizando a técnica de explosão a vapor ácido-catalisada ou não (auto-hidrólise);

C. Determinar os rendimentos e caracterizar as frações insolúveis derivadas do processo de explosão a vapor do bagaço de cana;

D. Determinar o efeito da remoção dos extraíveis sobre os processos de hidrólise e fermentação realizadas em separado (SHF) ou simultaneamente (SSF).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido junto à empresa Nova América S.A. (São Paulo/SP) e cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP). A preparação enzimática empregada para a sacarificação dos substratos pré-tratados foi a Cellic CTec2 (celulases), fornecida pela Novozymes Latin América (Novozymes, Araucária, Brasil).

A levedura utilizada para os ensaios de fermentação foi a ThermossacDry (*Saccharomyces cerevisiae*) fornecida pela empresa Lallemand Specialties. Inc. (Milwaukee, EUA).

Reagentes e solventes orgânicos foram provenientes das marcas Biotec, Vetec e Dinâmica (Brasil) e estes não sofreram nenhum tipo de tratamento antes de sua utilização. Os padrões cromatográficos e espectrométricos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

3.2 Preparo das amostras de bagaço para o pré-tratamento

Para a etapa de pré-tratamento, dois tipos de bagaço foram utilizados, o bagaço *in natura* (BIN) e o bagaço lavado com etanol (BLE). O BLE foi obtido a partir do BIN em processo de extração adaptado da Norma NREL/TP-510-42619 (SLUITER *et al.*, 2008a) com etanol 95%. O equipamento utilizado foi um extrator Soxhlet de larga escala instalado no prédio da Engenharia Química da Universidade Federal do Paraná. A extração foi realizada com intuito de se obter uma grande quantidade de bagaço para os experimentos de pré-tratamento. Ao todo foram realizadas 10 extrações, onde cada extração envolveu o uso de 360 g de bagaço em base seca e 6 L de etanol 95%.

O etanol foi removido em evaporador rotativo para a recuperação dos extraíveis, os quais foram armazenados sob refrigeração, sendo que os rendimentos mássicos foram determinados por gravimetria em relação à massa seca do bagaço de origem. Tanto o BLE quanto o BIN foram armazenados em sacos plástico até o momento da impregnação para a etapa de pré-tratamento.

3.3 Pré-tratamento de bagaço de cana por explosão a vapor

Os pré-tratamentos do BIN e do BLE foram realizados pelo processo de explosão a vapor. Os experimentos foram realizados na ausência (auto-hidrólise) e na presença de catalisadores ácidos, tais como os ácidos fosfórico e sulfúrico, para avaliar o efeito destes sobre a eficiência do processo.

Os experimentos de explosão a vapor foram realizados na temperatura de 195 °C por 7,5 min, seja na ausência ou na presença de catalisador (AGUIAR *et al.*, 2013). Todos os experimentos foram realizados com o bagaço contendo 50% de umidade, sendo que, nos experimentos de catálise ácida, a impregnação consistiu no borrifamento de uma solução ácida diluída (9,5 mg de ácido fosfórico ou ácido sulfúrico) sobre o bagaço de cana contendo 8% de umidade. Todas as amostras foram acondicionadas em saco plástico selado e conservadas em geladeira por no máximo 24 h. Para garantir uma maior homogeneidade na amostra, os sacos selados previamente resfriados foram abertos somente no momento do pré-tratamento, após terem atingido a temperatura ambiente e nela permanecido por pelo menos 30 min.

Os cálculos de rendimento mássico foram obtidos por diferença a partir da recuperação das frações solúveis (BT_{FA}) e insolúveis (BT_{FIL}) após o pré-tratamento. Os rendimentos da fração insolúvel em água foram determinados por gravimetria em relação à massa seca de bagaço inicial. As frações solúveis em água foram recuperadas por filtração do bagaço pré-tratado em funil de Büchner sob pressão reduzida e os seus teores de sólidos totais foram determinados gravimetricamente em relação ao bagaço seco.

3.4 Caracterização dos extraíveis obtidos a partir do BLE

Duas técnicas foram utilizadas para caracterização dos extraíveis, a espectrometria por infravermelho e cromatografia de fase gasosa bidimensional acoplada à detecção de massas (GCxGC/TOFMS).

Os extratos etanólicos secos em estufa (40 °C) foram analisados por espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) na forma de pastilhas de KBr com 1 a 2% de material em relação a sua massa, na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

A análise cromatográfica dos extraíveis foi realizada por GCxGC/TOFMS em um equipamento Pegasus 4D LECO, que consiste de um cromatógrafo Agilent 6890N equipado com detector de espectrometria de massas por tempo de voo, amostrador automático Combi PAL e modulador térmico de dois estágios com quatro jatos de nitrogênio (LECO, St. Joseph, MI, EUA). O período de modulação utilizado foi de 8 s, com a temperatura do modulador de 35 °C e uma energia de ionização de 70 eV. A faixa de massa de íons adquiridos foi de 45 a 450 Daltons, com frequência de aquisição de dados de 100 Hz e voltagem do detector de -1.460 V. As temperaturas utilizadas foram de 290 °C na linha de transferência, 250 °C para a fonte de íons e de 280 °C para o injetor. O volume de injeção foi de 1 µL com uma razão de divisão de amostra de 1:30. Na primeira dimensão foi utilizada uma coluna DB-5 com 5% de fenil-dimetilpolisiloxano (60 m, 0,25 mm d.i.; 0,25 µm). Já na segunda dimensão foi utilizada coluna DB-17 com 50% fenil-polidimetilsiloxano (PDMS - 2,05 m; 0,18 mm d.i.; 0,18 µm). A programação de temperatura do primeiro forno iniciou a 40 °C por 0,2 min, elevando-se até 300 °C com uma taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹, mantendo-se nessa temperatura por 15 min. A temperatura do segundo forno foi mantida em 10 °C acima da temperatura do forno principal. Esta análise foi realizada, na Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal no Rio Grande do Sul, sob orientação da Prof^a. Elina Bastos Caramão.

Para a identificação de cada composto foi primeiramente calculado o índice de retenção de Van Den Dool e Kratz (1993) utilizando padrões de hidrocarbonetos injetados nas mesmas condições da amostra (Equação 1). Depois, cada composto foi caracterizado por aproximação utilizando a máxima semelhança entre os seus índices de retenção e espectros de massas com aqueles disponíveis na literatura e na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology), respectivamente.

$$IR = 100 \times n + 100 \times \left(\frac{t_{Ri} - t_{Rn}}{t_{R(n+1)} - t_{Rn}} \right) \quad \text{Equação 1}$$

sendo n o número de carbonos do padrão de alcano anterior ao analito de interesse, t_{Ri} o tempo de retenção do analito de interesse, t_{Rn} o tempo de retenção

do padrão de alcano anterior ao analito de interesse e $t_{R(n+1)}$ o tempo de retenção do padrão de alcano posterior ao analito de interesse.

3.5 Análise química de materiais celulósicos.

A caracterização das amostras BIN e BLE foram realizadas após extração com uma sequência de solventes para remoção total dos seus extraíveis. As extrações foram realizadas em aparelho Soxhlet utilizando os seguintes solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico (EE), diclorometano (DCM), etanol:tolueno (ET 1:2, v v⁻¹) e etanol 95% (EtOH), segundo a norma TAPPI T204 om-88, e uma extração em balão de fundo redondo com água quente (AQ), segundo a norma TAPPI T264 om-88. Após cada etapa de extração, o solvente foi removido por evaporador rotativo para recuperação dos extraíveis e os rendimentos mássicos foram determinados por gravimetria em relação a massa seca de bagaço. O total de extraíveis presentes em cada amostra foi determinado a partir da somatória de cada fração de extraíveis removida pelos diferentes solventes. Os extraíveis removidos do BIN foram secos em estufa (40 °C) e analisados por espectrometria no infravermelho como mencionado acima.

As massas secas dos materiais *in natura* e da fração insolúvel (BT_{FIL}) do pré-tratamento foram determinadas em balança de infravermelho em triplicata (Shimadzu Modelo MOC63u) de acordo com a norma NREL/TP-510-42621 (SLUITER *et al.*, 2008b). Os teores de cinzas destes materiais celulósicos foram determinados a partir de uma quantidade conhecida de amostra em um cadinho de porcelana, que foi previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma temperatura de 575 °C por 4 h segundo a Norma NREL/TP-510-42622 (SLUITER *et al.*, 2008c). O percentual de cinzas foi obtido a partir da diferença entre a massa do cadinho vazio e a massa do cadinho com as cinzas calcinadas.

A composição química do BIN, BLE e do bagaço pré-tratado foi determinada conforme método NREL/TP-510-42618 (SLUITER *et al.*, 2008b) ambos previamente moídos em moinho de facas do tipo Wiley (60 mesh). O teor de lignina insolúvel em meio ácido (lignina de Klason) foi determinado por gravimetria e a lignina solúvel, por espectroscopia no ultravioleta. O método consistiu na hidrólise de 0,3 g de amostra com 3 mL de ácido sulfúrico 72% por 1

h a 30 °C. Em seguida, o material foi diluído com 84 mL de água destilada e condicionado em autoclave a 121 °C por 1 h para posterior filtragem. A massa retida no cadinho de Gooch foi quantificada gravimetricamente e denominada Lignina Insolúvel em Ácido (LIA). Por outro lado, o filtrado foi avolumado em um balão de 100 mL para determinação de lignina solúvel em ácido por espectrometria no ultravioleta nos comprimentos de onda de 210 e 280 nm de acordo com a Equação 2,

$$C (g L) = \frac{4,53 \times (Ac - Al)}{m \times v} \quad \text{Equação 2}$$

em que Ac é a absorbância em 280 nm, Al é a absorbância em 210 nm, m a massa seca da amostra e v o volume do balão (DENCE e LIN, 1992).

A composição em carboidratos foi determinada no hidrolisado resultante da determinação de lignina solúvel em ácido, usando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE). O equipamento utilizado coincide de um sistema de deslocamento positivo de alta pressão LC20AD, amostrador automático SIL10A, degaseificador de fase móvel DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detectores RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp com rede de fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta (Shimadzu, Japão). A coluna utilizada foi a Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65 °C, precedida de uma pré-coluna Hi-Plex H e eluída com uma fase móvel de H₂SO₄ 5 mmol L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. A quantificação foi efetuada por padronização externa com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado nas seguintes faixas de concentração: 0,08 a 0,8 g L⁻¹ de celobiose, 0,2 a 2 g L⁻¹ de glucose, 0,1 a 1 g L⁻¹ de xilose, 0,08 a 0,8 g L⁻¹ de arabinose, 0,12 a 1,2 g L⁻¹ de ácido fórmico, 0,1 a 1 g L⁻¹ de ácido acético, e 0,1 a 1 g L⁻¹ de hidroximetilfurfural e de furfural. Nos cálculos, também foi levado em consideração os respectivos fatores de correção de cada analito, que são devidos à incorporação de uma molécula de água a cada etapa de hidrólise ácida de uma ligação glicosídica (PITARELO *et al.*, 2012).

3.6 Ensaio de hidrólise enzimática

Os materiais pré-tratados na presença e na ausência de extraíveis foram submetidos ao processo de hidrólise enzimática, comparando-se o rendimento e a composição química de cada um dos materiais, permitindo assim avaliar a influência que os extraíveis tiveram sobre as etapas de produção de etanol celulósico.

A preparação enzimática que foi empregada para a hidrólise dos substratos pré-tratados a vapor foi a Cellic CTec2 (celulases) avolumada com tampão acetato 50 mmol L⁻¹, pH 4,8. Os experimentos foram conduzidos por 96 h a 150 rpm em uma incubadora de agitação orbital pré-aquecida à temperatura de 50 °C, sendo que cada hidrólise foi realizada em duplicata e acompanhada pelos respectivos brancos do substrato e da enzima utilizando 12% de sólidos totais. A carga enzimática utilizada foi de 62,5 mg de enzima comercial g⁻¹ de bagaço seco pré-tratado (RAMOS, 1992; RAMOS e FONTANA, 2004). Alíquotas de aproximadamente 1 mL foram coletadas nos tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h, fervidas por 5 min em banho-maria, centrifugadas a 10000G e imediatamente conduzidas para análise cromatográfica.

Os componentes monitorados por CLAE foram quantificados por calibração externa empregando curvas de calibração nas seguintes faixas de concentração: celobiose (0,3 a 3 g L⁻¹), glucose (3 a 30 g L⁻¹) e xilose (0,12 a 1,2 g L⁻¹). Estes valores foram expressos em relação aos seus polissacarídeos de origem, através da multiplicação por seus respectivos fatores de correção devidos a hidrólise ácida. Os rendimentos de hidrólise enzimática foram, então, calculados em relação à quantidade de celulose presentes no material pré-tratado por explosão a vapor.

Para determinação da atividade enzimática foi utilizado o procedimento descrito por Ghose (1987) e modificado por Schwald *et al.* (1998). A determinação foi realizada contra papel filtro Whatman #1 (1 x 8,5 cm; 70 mg) em tampão acetato de sódio 50 mmol L⁻¹ pH 4,8, usando tubos de ensaio com 1 mL de enzima e 1 mL de tampão e papel filtro Whatman #1. Os tubos então foram incubados em banho-maria a 50 °C por 1 h para que ocorresse a reação enzimática, em seguida adicionou-se 3 mL de ácido-dinitrosalicílico (DNS) para interromper a reação. As amostras foram colocadas em ebulição por 10 min e a

leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-vis a 540 nm. Para determinar a atividade enzimática, determinou-se a diluição da enzima na qual 2 mg de glucose são liberados no meio da reação. Para isso fez-se 4 diluições, sendo que nestas pelo menos em uma deveria liberar menos que 2 mg de glucose e em outra mais do que 2 mg de glucose.

3.7 Ensaios de fermentação

3.7.1 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a conservação do micro-organismo possui a seguinte composição: 1,0% (m v⁻¹) de glucose, 0,5% (m v⁻¹) de peptona, 0,3% (m v⁻¹) de extrato de levedura e 0,3 % de extrato de malte, 2% (m v⁻¹) de ágar em água deionizada. Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até a fervura e esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. Em seguida, o meio foi distribuído em placas de Petri esterilizadas no interior de uma capela de fluxo laminar e estas foram posteriormente armazenadas em câmara fria.

As estirpes foram repicadas para placas de Petri contendo o meio de cultura e incubadas em estufa durante 24 h a 30 °C. Este procedimento foi executado em todos os momentos que antecederam os ensaios, de forma a manter a cultura fresca e obter biomassa suficiente para os procedimentos de inoculação.

3.7.2 Preparação do inóculo e crescimento celular

A preparação do pré-inóculo foi realizada por transferência de uma quantidade de biomassa fresca (item 3.6.1) para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de crescimento composto por 30 g L⁻¹ de glucose, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2 g L⁻¹ de cloreto de amônia (NH₄Cl), 1 g L⁻¹ de dihidrogênio fosfato de potássio (KH₂PO₄) e 0,3 g L⁻¹ de sulfato de magnésio em água. As culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital de 150 rpm por aproximadamente 24 h.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado pela leitura da densidade óptica do pré-inóculo a 640 nm (DO_{640}) em espectrofotômetro Genesys 20 Modelo 4001/4 da Thermo Spectronic (EUA).

Para os ensaios de fermentação, a medida da DO_{640} foi realizada no meio de crescimento após 24 h de incubação, que foi posteriormente centrifugado em tubos esterilizados para remoção do sobrenadante. Com o valor obtido pela medida de DO_{640} , calculou-se a quantidade de água necessária a ser adicionada ao pré-inóculo concentrado para obter aproximadamente 1 g L^{-1} de células no meio de fermentação.

3.7.3 Fermentação

Foram realizados dois tipos de ensaios para a fermentação: hidrólise e fermentação separados (SHF) e fermentação e sacarificação simultâneas (SSF). Os experimentos de SHF foram realizados em duplicata utilizando o hidrolisado obtido pela ação das enzimas sob os substratos pré-tratados por explosão a vapor, com e sem catalisador ácido (item 3.3), sendo que o meio continha 20 mL de hidrolisado em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH 4,8), $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, $0,025 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de *S. cerevisiae* (Thermossac). Os ensaios foram realizados em uma incubadora de agitação orbital a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 24 h, sendo que alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 3, 6, 12 e 24 h.

Os experimentos de SSF foram realizados em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 12% de sólidos totais, 62,5 mg de enzima/g de substratos seco (Cellic Ctec 2), $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de levedura, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ e $0,025 \text{ g L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} (pH 4,8), mais o inóculo de *S. cerevisiae* (Thermossac) na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$. Os ensaios foram também realizados em incubadora de agitação orbital a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm por 48 h, dos quais alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 3, 6, 12, 24, 36 e 48 h.

O consumo de glucose e a produção de etanol para os ensaios de fermentação foram quantificadas por CLAE usando o mesmo sistema descrito no item 3.4. A quantificação foi determinada a partir de uma curva de calibração externa dos componentes glucose e etanol na faixa de 2,5 a 25 g L^{-1} . Três cálculos foram realizados para avaliação dos resultados de fermentação: o

rendimento do ensaio foi calculado em relação à produção de etanol (g) e a concentração de glucose consumida ($Y_{E/B}$); a eficiência do processo foi calculada a partir da relação entre o quanto de etanol foi produzido e o quanto de etanol poderia ter sido produzido teoricamente ($Y_{P/T}$); por fim, a produtividade do ensaio foi calculada a partir da relação entre a produção de etanol e o tempo do ensaio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extraíveis do bagaço de cana-de-açúcar

Com o intuito de avaliar a influência dos extraíveis sobre o processo de produção de etanol celulósico, o bagaço foi submetido a um processo de extração por Soxhlet em etanol 95%. Na FIGURA 12 é realizada uma comparação do teor de extraíveis obtido no presente trabalho com dados disponíveis na literatura.

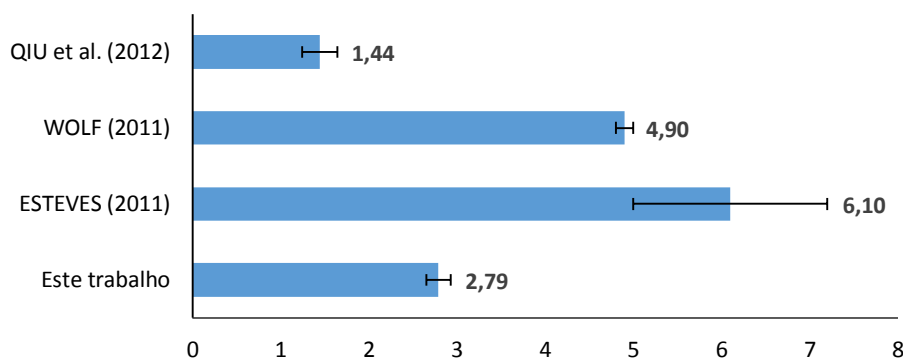


FIGURA 12 – COMPARAÇÃO ENTRE ESTUDOS RELATIVOS AO PERCENTUAL DE EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO DE CANA.

O bagaço *in natura* (BIN) apresentou um percentual de 2,94% de extraíveis em etanol 95%. Wolf (2011) e Qiu (2012) também utilizaram o etanol 95% como solvente de extração, enquanto Esteves (2011), além do etanol, também empregou água na sequência, apresentando assim um maior percentual que representa a somatória dos extraíveis removidos. Apesar de Wolf (2011) ter utilizado o mesmo solvente, a amostra de bagaço foi neste caso submetida a uma etapa de secagem, sendo que a extração foi realizada por 2 h a mais do que a realizada no presente trabalho. Já o percentual de extraíveis obtido por Qiu (2012) foi 48% menor em relação ao presente trabalho empregando a mesma metodologia, sendo que a única diferença entre estes procedimentos foi a quantidade de bagaço utilizada na extração. Assim, supõe-se que tal diferença se deva ao tipo de bagaço de cana empregado em cada caso, bem como a diferenças no seu processamento ou nas condições edafoclimáticas que caracterizaram o cultivo da cana-de-açúcar.

Todas as amostras de extraíveis obtidas a partir do bagaço de cana com etanol 95% foram caracterizadas por FT-IR e estas apresentaram espectros

bastante semelhantes, conforme o perfil observado na FIGURA 13.

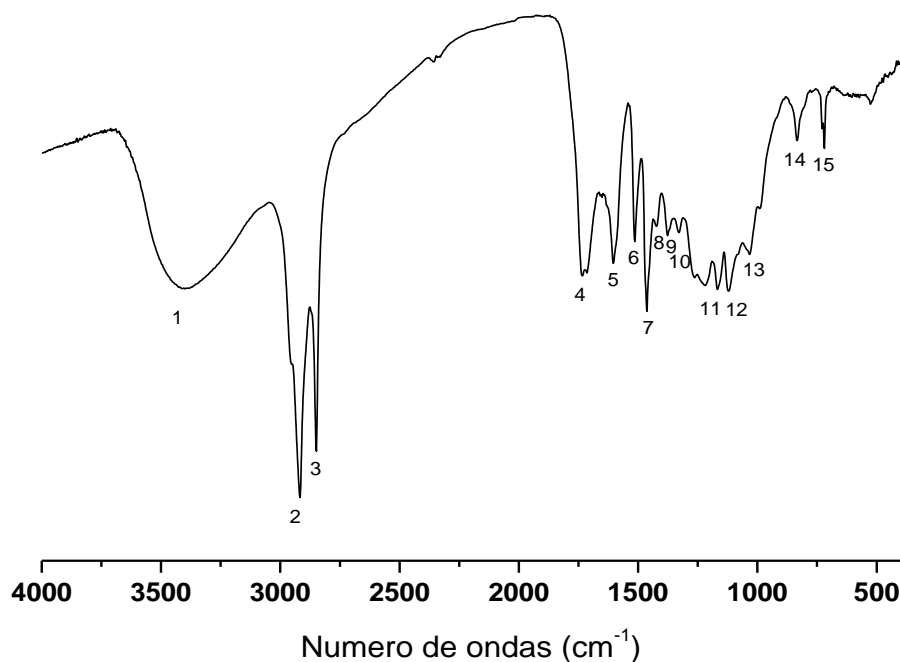


FIGURA 13 – ESPECTRO DE FT-IR DOS EXTRATIVOS EM ETANOL 95% DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

A banda larga de 3750 a 3000 cm^{-1} (1) corresponde à banda de deformação axial da ligação O-H em sistemas associados por ligações de hidrogênio. As duas bandas em 2920 e 2850 cm^{-1} (2 e 3) correspondem às deformações axiais de C-H em CH_2 e CH_3 de compostos alifáticos e suas correspondentes deformações angulares em 1463 e 1378 cm^{-1} (7 e 9), respectivamente. Além disto, foram observadas vibrações de C=O de grupamentos carbonílicos em 1732 cm^{-1} (4) e a sua corresponde deformação axial do ânion carboxilato em 1426 cm^{-1} (8). Vibrações de C=C de alcenos em 1603 cm^{-1} (5) e de anéis aromáticos em 1514 cm^{-1} (6) e o respectivo dobramento do grupo C-H de anel aromático fora do plano em 830 cm^{-1} (14) também foram observadas, bem como as vibrações de C-O de fenóis em 1171 cm^{-1} (11), de álcoois primários em 1034 cm^{-1} (13), de éteres em 1122 cm^{-1} (12) e de grupos C-O-H em 1329 cm^{-1} (10), além da vibração referente a bandas de cadeia longa com 4 ou mais grupos CH_2 em 715 cm^{-1} (15) (BENITES *et al.*, 1999; LOPES e FASCIO, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; PAVIA *et al.*, 2010; TODORCIUK *et al.*, 2009).

Em uma tentativa de identificar a composição química dos extraíveis presentes no bagaço de cana, o extrato etanólico foi submetido a uma análise bidimensional na fase gasosa equipado com um detector de massas. A FIGURA 14 apresenta o diagrama de cores e o diagrama 3D obtido para o extrato etanólico, onde o mecanismo de separação na primeira dimensão é de acordo com a volatilidade do composto e na segunda dimensão por polaridade.

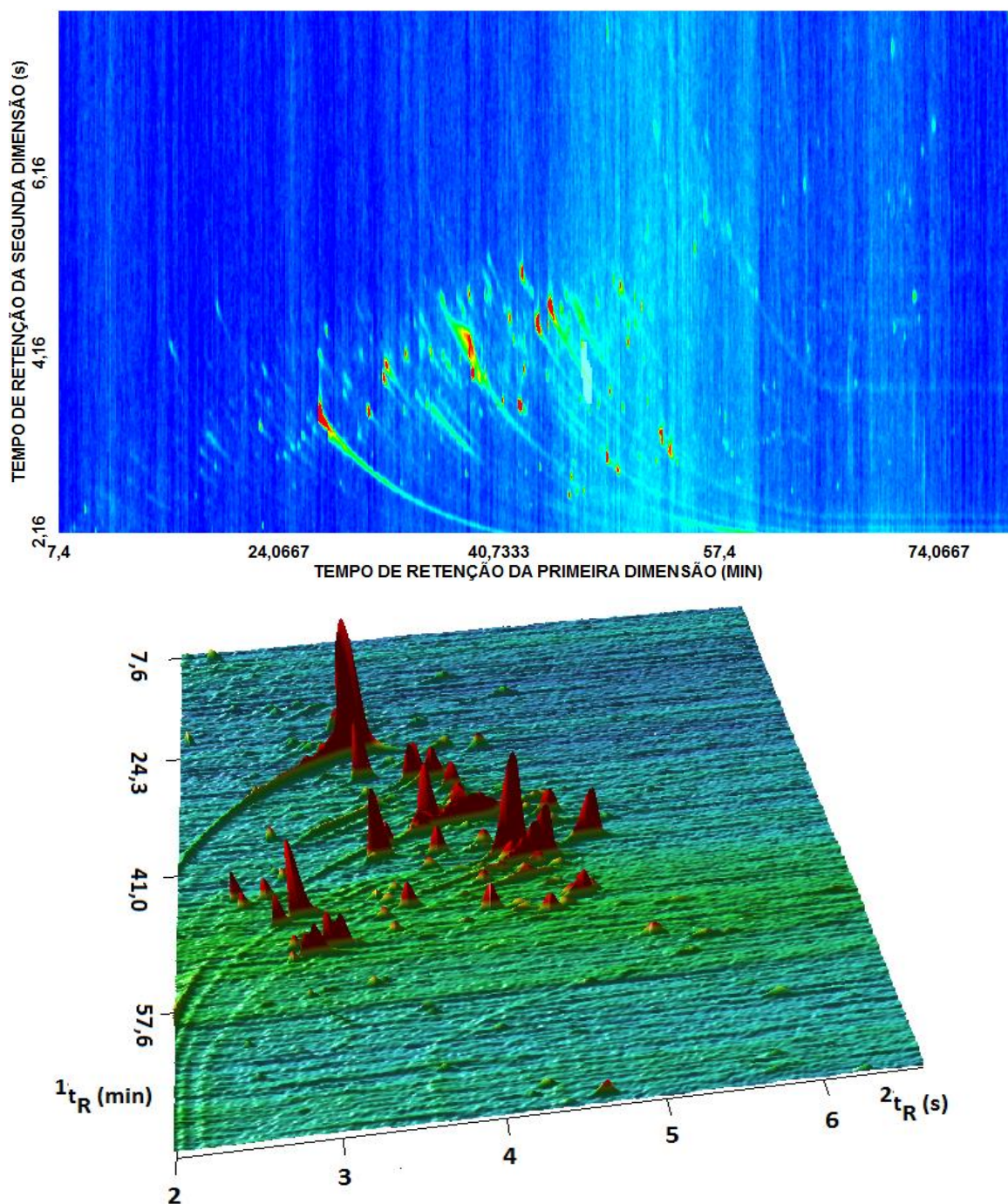


FIGURA 14 – DIAGRAMA DE CORES E DIAGRAMA 3D DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA A PARTIR DA ANÁLISE POR GCXGC/TOFMS.

A cromatografia bidimensional foi necessária, pois, como pode ser observado nos diagramas, o extrato etanólico apresenta uma variedade de compostos. Foram encontrados 377 compostos, destes 169 foram identificados através do índice de retenção e espectros de massas em comparação a biblioteca NIST. Estes compostos correspondem a 78% da área total do cromatograma e as classes majoritárias foram os compostos fenólicos (28 compostos) e hidrocarbonetos (31 compostos), seguidos de ésteres (25 compostos) e ácidos (25 compostos), estas e as demais classes identificadas estão apresentadas na FIGURA 15.

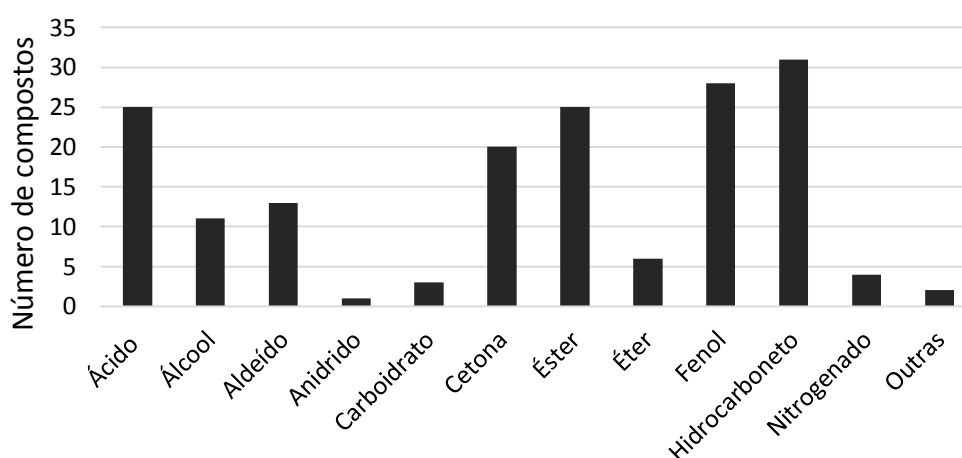


FIGURA 15 – CLASSES DE COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.

Os compostos identificados foram representados em um gráfico de dispersão (FIGURA 16) e estão disponíveis na TABELA 2. Dos compostos identificados até o momento, uma grande porção já foi identificada em extratos de plantas. Observou-se uma diversidade de hidrocarbonetos como tolueno, octano, decano, 1-eicosano, etilbenzeno, ceteno, 2-heptadeceno, tricoseno e hexacoseno, além de uma série de outros componentes minoritários. Também foram identificados metabólitos secundários que estão associados à biossíntese da lignina, como acetosiringona, ácido vanílico, vinisiringol e propenilsiringol. Ésteres e ácidos graxos como propanoato de metila, ácido oleico, ácido palmitoleico, ácido pentanóico e decanoato de decila também foram identificados, dentre outros. Esta foi a primeira vez em que os extraíveis do bagaço de cana foram caracterizados de forma tão detalhada e não foi encontrada nenhuma literatura com a qual estes dados pudessem ser comparados.

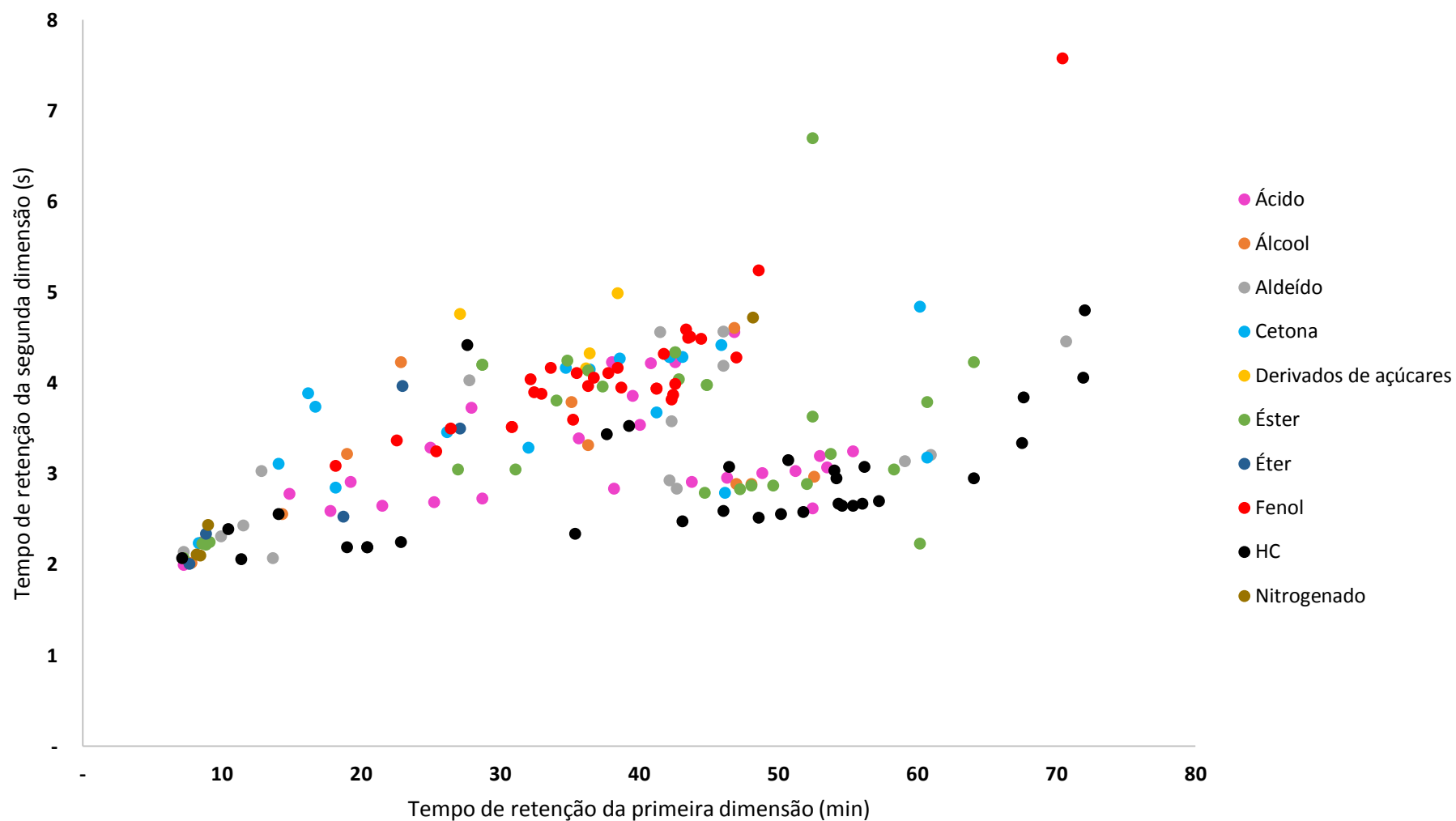


FIGURA 16 – GRÁFICO DE DISPERSÃO DOS COMPONENTES IDENTIFICADOS POR GCXGC/TOFMS NO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.

O 4-vinilfenol foi o composto que apresentou maior área na análise bidimensional realizada sobre o extrato etanólico de bagaço de cana por GCxGC/TOFMS. Sua confirmação foi possível a partir de seu índice de retenção de 1217, que apresentou uma diferença de apenas 7 unidades do encontrado na literatura (1226) (El-SAYED et al., 2005), e pela interpretação de seu espectro de massas (FIGURA 17).

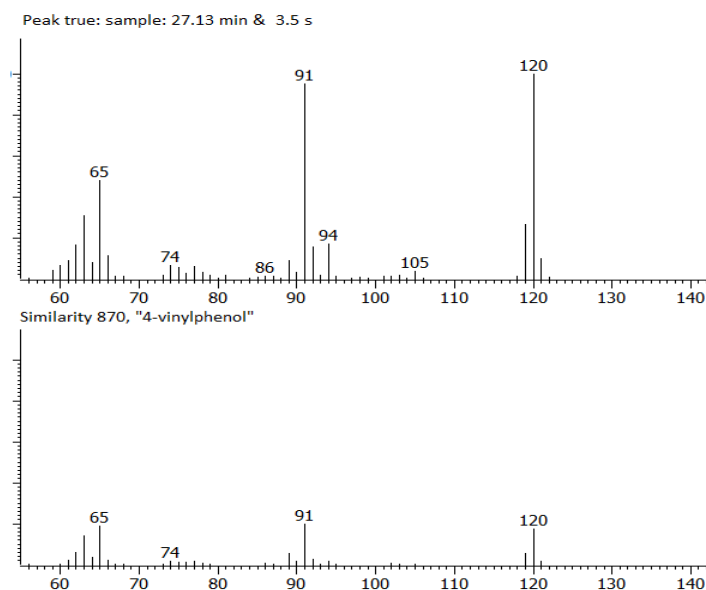


FIGURA 17– ESPECTROS DE MASSAS DO 4-VINILFENOL EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS DA BIBLIOTECA NIST.

A rota bioquímica para obtenção do 4-vinilfenol se dá por ação da enzima hidroxicinamato descarboxilase, que promove a descarboxilação do ácido *p*-cumárico (BERNINI *et al.*, 2002; GOMEZ, 2012). No entanto, o 4-vinilfenol também pode ser proveniente do tratamento térmico do ácido *p*-cumárico (BERNINI *et al.*, 2002; SHAHIDI e NACZK *et al.*, 2006). Deschamps e Ramos (2002) demonstraram que o ácido *p*-cumárico é um dos compostos fenólicos majoritários do bagaço de cana. Como este composto não foi identificado no GCxGC/TOFMS do extrato etanólico de bagaço, foi então realizada a injeção de um padrão de ácido *p*-cumárico nas mesmas condições e, a partir do cromatograma obtido, observou-se que a formação quase que majoritária de seu produto de descarboxilação, o 4-vinilfenol (FIGURA 18). Deste modo, conclui-se a temperatura do sistema de injeção do equipamento (280 °C) promove a descarboxilação de ácidos cinâmicos como os ácidos *p*-cumárico, ferúlico e

vanílico, cujos produtos de descarboxilação são o 4-vinilfenol, o 2-metoxi-4-vinilfenol e o vinilsiringol. Infelizmente, não foi possível diminuir a temperatura do injetor para evitar este efeito, pois a redução da temperatura prejudica a volatilização completa de todos os componentes da amostra. Por esta, razão a Tabela 2 indica estes compostos como componentes do extrato etanólico de bagaço de cana.

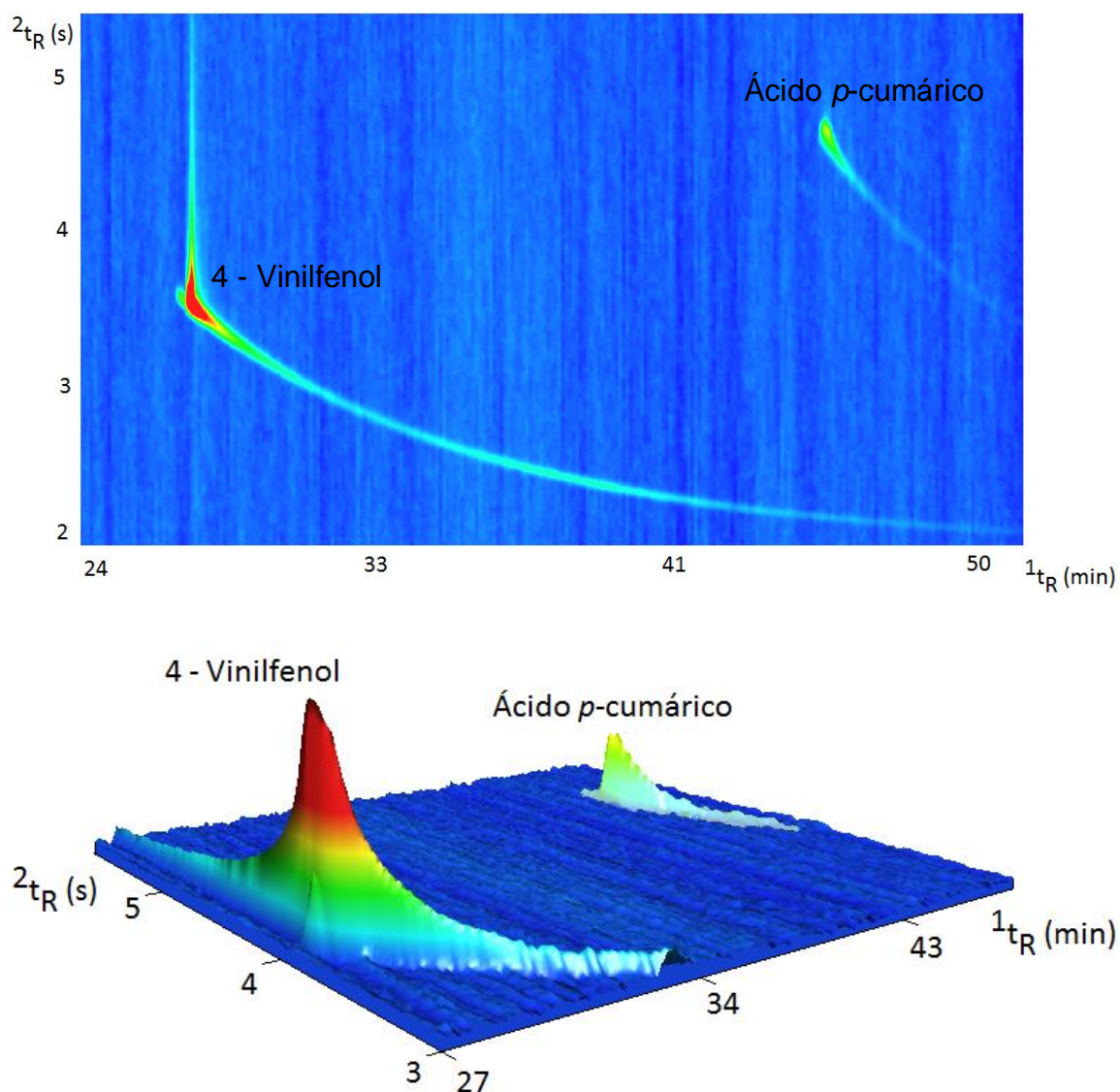


FIGURA 18 – DIAGRAMA DE CORES E DIAGRAMA 3D DO PADRÃO DE ÁCIDO *p*-CUMÁRICO.

TABELA 2 - COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR GCXGC/TOFMS DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _R (min) ^b	² t _R (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
Ácido acético	n.d.	7,27	2,00		Ácido	0,77	C ₂ H ₄ O ₂	962
Propanoato de metila	n.d.	7,27	2,07		Éster	0,17	C ₄ H ₈ O ₂	753
Hidroxiacetaldeído	n.d.	7,27	2,14		Aldeído	0,03	C ₂ H ₄ O ₂	745
2,2-Dimetóxiopropano	n.d.	7,67	2,01		Éter	0,12	C ₅ H ₁₂ O ₂	792
3-Metil-2-pentanol	n.d.	7,80	2,02		Álcool	0,02	C ₆ H ₁₄ O	672
3-Amino-1,2-propanediol	n.d.	8,20	2,11		Nitrogenado	0,02	C ₃ H ₉ NO ₂	550
2-Pentanona	n.d.	8,33	2,24		Cetona	0,01	C ₅ H ₁₀ O	629
2-Amino-1,3-propanediol	n.d.	8,47	2,10		Nitrogenado	0,03	C ₃ H ₉ NO ₂	664
2-Propenoato de etila	n.d.	8,60	2,23		Éster	0,19	C ₅ H ₈ O ₂	846
2-Propen-1-ol	n.d.	8,60	2,25		Álcool	0,15	C ₃ H ₆ O	860
Propanoato de 2-propenila	n.d.	8,87	2,22		Éster	0,02	C ₆ H ₁₀ O ₂	599
Etóxi-1-propeno	n.d.	8,87	2,34		Éter	0,03	C ₅ H ₁₀ O	710
2-Metóxi-etanamina	n.d.	9,00	2,44		Nitrogenado	0,02	C ₃ H ₉ NO	954
Butanoato de metila	n.d.	9,13	2,25		Éster	0,02	C ₅ H ₁₀ O ₂	749
Pentanal	n.d.	9,93	2,31		Aldeído	0,02	C ₅ H ₁₀ O	701
Octano	800	11,40	2,06	826	Hidrocarboneto	0,02	C ₈ H ₁₈	757
Hexanal	804	11,53	2,43	829	Aldeído	0,04	C ₆ H ₁₂ O	846
Furfural	835	12,87	3,03	857	Aldeído	0,10	C ₅ H ₄ O ₂	817
Heptanal	882	13,67	2,07	873	Aldeído	1,19	C ₇ H ₁₄ O	890
Etilbenzeno	864	14,07	2,56	881	Hidrocarboneto	0,02	C ₈ H ₁₀	705
5-Metilfuranona	864	14,07	3,11	882	Cetona	0,05	C ₅ H ₆ O ₂	729
Ciclohexanol	886	14,33	2,56	887	Álcool	1,55	C ₆ H ₁₂ O	979
Ácido pentanóico	902	14,87	2,78	898	Ácido	0,02	C ₅ H ₁₀ O ₂	521
Dimetilsulfona	919	15,93	4,23	926	Sulfurado	1,231	C ₂ H ₆ O ₂ S	934

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _R (min) ^b	² t _R (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
2(5H)-Furanona	918	16,20	3,89	933	Cetona	0,148	C ₄ H ₄ O ₂	806
Dimetilsulfona	926	16,33	4,11	936	Sulfurado	0,084	C ₂ H ₆ O ₂ S	910
2(5H)-Furanona	918	16,73	3,74	946	Cetona	0,177	C ₄ H ₄ O ₂	743
Ácido hexanóico	977	17,80	2,59	974	Ácido	0,241	C ₆ H ₁₂ O ₂	866
2,4-Diidróxi-2,5-dimetil-3(2H)-furan-3-ona	989	18,20	2,85	984	Cetona	0,042	C ₆ H ₈ O ₄	738
Fenol	981	18,20	3,09	984	Fenol	0,439	C ₆ H ₆ O	945
2-Pentilfurano	994	18,73	2,53	998	Éter	0,049	C ₉ H ₁₄ O	857
Decano	999	19,00	2,19	1004	Hidrocarboneto	0,028	C ₁₀ H ₂₂	837
Glicerol	n.d.	19,00	3,22	1005	Álcool	3,647	C ₃ H ₈ O ₃	900
Ácido 4-metil-3-pentenóico	1011	19,27	2,91	1011	Ácido	0,279	C ₆ H ₁₀ O ₂	818
Anidrido succínico	n.d.	19,40	4,69	1015	Anidrido	3,284	C ₄ H ₄ O ₃	878
4-Metildecano	1054	20,47	2,19	1041	Hidrocarboneto	0,017	C ₁₁ H ₂₄	635
Ácido heptanóico	1078	21,53	2,65	1068	Ácido	0,017	C ₇ H ₁₄ O ₂	705
2-Metóxiifenol	1090	22,60	3,37	1095	Fenol	0,769	C ₇ H ₈ O ₂	937
Undecano	1099	22,87	2,25	1101	Hidrocarboneto	0,309	C ₁₁ H ₂₄	910
2-Nonen-1-ol	1105	22,87	4,23	1102	Álcool	0,073	C ₉ H ₁₈ O	832
2-Hexilfurano	1094	23,00	3,97	1105	Éter	1,750	C ₁₀ H ₁₆ O	856
Ácido benzóico	1170	25,00	3,29	1159	Ácido	0,029	C ₇ H ₆ O ₂	722
Ácido octanóico	1182	25,27	2,69	1165	Ácido	0,104	C ₈ H ₁₆ O ₂	824
4-etilfenol	1168	25,40	3,25	1169	Fenol	0,021	C ₈ H ₁₀ O	738
3,5-Diidróxi-2-metil-(4H)-piran-4-ona	1197	26,20	3,46	1191	Cetona	0,139	C ₆ H ₆ O ₄	831
1,2-Benzenediol	1197	26,47	3,50	1198	Fenol	0,152	C ₆ H ₆ O ₂	886
Fucitol	1226	27,00	3,05	1213	Éster	0,012	C ₉ H ₁₈ O ₄	563
4-Vinilfenol	1224	27,13	3,50	1217	Fenol	15,262	C ₈ H ₈ O	823
Dianidroglicopirranose	n.d.	27,13	4,16	1217	Carboidrato	1,315	C ₆ H ₈ O ₄	851

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _{TR} (min) ^b	² t _{TR} (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
2-Butil-1,1,3-trimetilcicloexano	1228	27,67	4,42	1233	Hidrocarboneto	1,500	C ₁₃ H ₂₆	897
5-(hidroximetil)-2-Furancarboxaldeído	1224	27,80	4,03	1237	Aldeído	0,129	C ₆ H ₆ O ₃	656
Ácido benzenoacético	1248	27,93	3,73	1240	Ácido	0,028	C ₈ H ₈ O ₂	734
Ácido nonanóico	1272	28,73	2,73	1263	Ácido	0,080	C ₉ H ₁₈ O ₂	777
3-Acetoxihexanoato de etila	1266	28,73	4,20	1264	Éster	0,130	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	691
2-Metoxi-4-vinilfenol	1307	30,87	3,52	1326	Fenol	1,684	C ₉ H ₁₀ O ₂	938
3,3-Dietoxipropanoato de etila	1163	31,13	3,05	1334	Éster	0,038	C ₉ H ₁₈ O ₄	730
4-Acetilanol	1369	32,07	3,29	1362	Cetona	0,052	C ₉ H ₁₀ O ₂	641
4-Hidroxibenzaldeído	n.d.	32,20	4,04	1366	Fenol	2,804	C ₇ H ₆ O ₂	961
3,5-Diidroxitolueno	1378	32,47	3,90	1374	Fenol	0,066	C ₇ H ₈ O ₂	795
1,2,3-Benzenetriol	1385	33,00	3,88	1390	Fenol	0,059	C ₆ H ₆ O ₃	644
Vanilina	1410	33,67	4,17	1411	Fenol	0,570	C ₈ H ₈ O ₃	932
2-Hidroxi-3-fenilpropanoato de etila	1438	34,07	3,81	1424	Éster	0,022	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	738
4-Hidroxiacetofenona	1442	34,73	4,17	1446	Cetona	0,081	C ₈ H ₈ O ₂	821
3-Ureidopropanoato de metila	1451	34,87	4,25	1450	Éster	0,653	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	929
Álcool veratril	1464	35,13	3,79	1459	Álcool	0,038	C ₉ H ₁₂ O ₃	709
2-Metoxi-4-(1-propenil)-fenol	1459	35,27	3,60	1463	Fenol	0,091	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	868
2-Metil-1-tetradeceno	1489	35,40	2,34	1466	Hidrocarboneto	0,015	C ₁₅ H ₃₀	831
Ácido undecanóico	1468	35,67	3,39	1476	Ácido	0,025	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	669
3,4-Dimetil-5-pentil-5H-furan-2-ona	1481	36,20	3,76	1493	Lactona	0,139	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	821
Terbutilcatecol	1493	36,33	3,97	1493	Fenol	0,019	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	690
10-Dodecen-1-ol	1490	36,33	3,32	1497	Álcool	0,018	C ₁₂ H ₂₄ O	663
4-Metóxiibenzenopropanoato de metila	1494	36,33	4,14	1498	Éster	0,019	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	587
1-(4-hidroxi-3-metóxiifenil)-Etanona	1491	36,47	4,15	1502	Cetona	0,233	C ₉ H ₁₀ O ₃	856
Levoglucozan	1491	36,47	4,76	1503	Carboidrato	1,37	C ₆ H ₁₀ O ₅	867

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade.

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _{TR} (min) ^b	² t _{TR} (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
4-Hidroxibenzóico	1537	36,73	4,06	1511	Fenol	0,46	C ₇ H ₆ O ₃	845
4-Hidroxi-3-metóxi benzoato de metila	1525	37,40	3,96	1533	Éster	0,04	C ₉ H ₁₀ O ₄	780
5-Metilpentadecano	1551	37,67	3,44	1541	Hidrocarboneto	0,03	C ₁₆ H ₃₄	675
1-(4-hidroxi-3-metóxi fenil)-2-Propanona	1541	37,80	4,11	1546	Fenol	0,39	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	848
Ácido 4-hidroxibenzenóico	1545	38,07	4,23	1554	Ácido	0,02	C ₈ H ₈ O ₃	604
Ácido dodecanóico	1559	38,20	2,84	1558	Ácido	0,21	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	844
Ácido vanílico	1570	38,47	4,17	1567	Fenol	0,58	C ₈ H ₈ O ₄	878
Xilitol	n.d.	38,47	4,33	1568	Álcool	12,62	C ₅ H ₁₂ O ₅	878
3,4-diidro-8-hidroxi-3-metil-(1H)-2-Benzopiran-1-ona	1549	38,60	4,27	1572	Cetona	0,02	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	662
Vinilsiringol	1573	38,73	3,95	1576	Fenol	1,16	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	744
Ceteno	1593	39,27	3,53	1593	Hidrocarboneto	0,24	C ₁₆ H ₃₂	848
Ácido metil-p-hidroxicinamato	1603	39,53	3,86	1602	Ácido	0,02	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	562
3-Deoxy-D-manoico lactona	n.d.	39,80	4,99	1612	Carboidrato	0,63	C ₆ H ₁₀ O ₅	807
Ácido homovanílico	1633	40,07	3,54	1621	Ácido	0,11	C ₉ H ₁₀ O ₄	793
Ácido 4-metóxi-3-etóxi benzenóico	1685	40,87	4,22	1650	Ácido	0,02	C ₉ H ₁₀ O ₄	693
4-(3-hidroxi-1-butenil)-3,5,5-Trimetil-2-ciclohexen-1-ona	1631	41,27	3,68	1664	Cetona	0,04	C ₁₃ H ₂₀ O ₂	782
Propenilsiringol	1658	41,27	3,94	1664	Fenol	0,03	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	735
4-Hidroxi-3,5-dimetóxi-benzaldeído	1669	41,53	4,56	1674	Aldeído	0,44	C ₉ H ₁₀ O ₄	892
Ácido 4-hidroxibenzenepropanóico	1653	41,80	4,32	1684	Fenol	0,20	C ₉ H ₁₀ O ₃	842
Metóxi-3,7,11-metildodec-2,6,10-eno	1683	42,20	2,93	1697	Éter	0,02	C ₁₆ H ₂₈ O	807
Sedadenoline	1672	42,20	4,29	1698	Cetona	0,03	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	625
Ciperenal	1706	42,33	3,58	1702	Aldeído	1,75	C ₁₄ H ₂₀ O	823
3,4-dihidroxibenzoato de metila	1696	42,33	3,82	1702	Fenol	0,02	C ₈ H ₈ O ₄	736
4-(2-etil-1,1-dimetilbutil)-Fenol	1729	42,47	3,87	1708	Fenol	0,05	C ₁₄ H ₂₂ O	714
Propenilsiringona	1709	42,60	3,99	1713	Fenol	0,27	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	847
3-(4-metóxi fenil)-2-Propenóico	n.d.	42,60	4,23	1713	Ácido	0,12	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	853

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade.

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _{TR} (min) ^b	² t _{TR} (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
2-Propenoato de 3-(4-metóxiifenil)-metila	n.d.	42,60	4,34	1713	Éster	0,05	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	629
Pentadecanal	1721	42,73	2,84	1718	Aldeído	0,05	C ₁₅ H ₃₀ O	899
3,4-Dimetóxiibenzenopropanoato de metila	1726	42,87	4,04	1724	Éster	0,03	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	629
2-Heptadeceno	1721	43,13	2,48	1733	Hidrocarboneto	0,03	C ₁₇ H ₃₄	837
Bisabol-1-one	1713	43,13	4,29	1734	Cetona	0,15	C ₁₅ H ₂₈ O	696
Acetosiringona	1744	43,53	4,50	1750	Fenol	0,44	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	730
4-(3-hidroxi-1-propenil)-2-Metóxiifenol	1745	43,67	4,51	1756	Fenol	3,28	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	899
Ácido tetradecanóico	1762	43,80	2,91	1760	Ácido	0,15	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	857
3-(3,4,5-trimetóxiifenil)-1-Propanol,	1804	44,47	4,49	1787	Fenol	0,64	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	673
Tetradecanoato de etila	1796	44,73	2,79	1797	Éster	0,02	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	740
Glutarato de 2,4-dimetilpent-3-isobutila	1802	44,87	3,98	1803	Éster	0,05	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	703
3-(4-hidroxi-3-metóxiifenil)-2-propenoato de metila	1845	45,93	4,42	1845	Éster	0,35	C ₁₁ H ₈ O ₄	770
Fitadieno	1843	46,07	2,59	1849	Hidrocarboneto	0,29	C ₁₉ H ₃₆	827
Ácido 3-(4-hidroxifenil)-2--propenóico	1854	46,07	4,57	1850	Ácido	0,12	C ₉ H ₈ O ₃	595
6,10,14-trimetil-2-Pentadecanona	1846	46,20	2,79	1854	Cetona	0,30	C ₁₈ H ₃₆ O	862
Ácido pentadecanóico	1867	46,33	2,96	1860	Ácido	0,07	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	801
1-Nonadecene	1875	46,47	3,08	1865	Hidrocarboneto	0,02	C ₁₉ H ₃₈	744
Ácido ferúlico	1875	46,87	4,56	1882	Ácido	0,09	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	834
Sorbitol	n.d.	46,87	4,61	1882	Álcool	1,30	C ₆ H ₁₄ O ₆	857
13-Hexadecanol	1884	47,00	2,89	1886	Álcool	0,01	C ₁₆ H ₃₂ O	798
14-Hexadecanol	1886	47,00	4,28	1887	Álcool	0,08	C ₁₆ H ₃₂ O	667
2-Etilbutirato de dodecila	1874	47,27	2,83	1897	Éster	0,02	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	726
Miristato de isobutila	1941	48,07	2,87	1928	Éster	0,04	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	744
2-Heptadecanol	1909	48,07	2,89	1928	Álcool	0,03	C ₁₇ H ₃₆ O	785

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade.

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _R (min) ^b	² t _R (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
Nicotinato de 4-metóxfenila	1935	48,20	4,72	1935	Nitrogenado	0,08	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	623
2-Metil-7-ocadecano	1926	48,60	2,52	1949	Hidrocarboneto	0,08	C ₁₉ H ₃₈	587
Escopoletim	1974	48,60	5,24	1951	Fenol	0,03	C ₁₀ H ₈ O ₄	737
Ácido palmítico	1964	48,87	3,01	1960	Ácido	1,99	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	849
Palmitato de isopropila	1999	49,67	2,87	1991	Éster	0,84	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	873
2-Eicoseno	2007	50,20	2,56	2014	Hidrocarboneto	0,04	C ₂₀ H ₄₀	565
5-Metileicosano	2052	50,73	3,15	2038	Hidrocarboneto	0,02	C ₂₁ H ₄₄	692
Ácido heptadecanóico	2080	51,27	3,03	2061	Ácido	0,04	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	798
1-Heneicoseno	2087	51,80	2,58	2084	Hidrocarboneto	0,05	C ₂₁ H ₄₂	662
Decanoato de decila	2084	52,07	2,89	2096	Éster	0,02	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	784
Ácido 8-heptadecenóico	2140	52,47	2,62	2115	Ácido	0,03	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	660
11-Octadecenoato de metila	2115	52,47	3,63	2115	Éster	0,01	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	644
Estearato de metila	2117	52,47	6,70	2118	Éster	0,14	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	747
Fitol	2119	52,60	2,97	2121	Álcool	0,24	C ₂₀ H ₄₀ O	891
Ácido oleico	2147	53,00	3,20	2140	Ácido	0,13	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	891
Ácido octadecanóico	2162	53,53	3,07	2165	Ácido	0,24	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	837
3-Metil-heneicosano	2173	53,80	3,22	2178	Hidrocarboneto	0,03	C ₂₂ H ₄₆	771
1-Docoseno	2195	54,20	2,95	2196	Hidrocarboneto	0,18	C ₂₂ H ₄₄	873
5,5-Dietilnonadecano	2208	54,33	2,67	2202	Hidrocarboneto	0,03	C ₂₃ H ₄₈	784
2-Docoseno	2208	54,60	2,65	2215	Hidrocarboneto	0,03	C ₂₂ H ₄₄	828
5-Metildocosano	2252	55,40	2,65	2252	Hidrocarboneto	0,08	C ₂₃ H ₄₈	686
Ácido 10-nonadecenóico	2256	55,40	3,25	2253	Ácido	0,03	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	738
9-Tricoseno	2281	56,07	2,67	2283	Hidrocarboneto	0,04	C ₂₃ H ₄₆	764
11-Tricoseno	2287	56,20	3,08	2290	Hidrocarboneto	0,03	C ₂₃ H ₄₆	783
5-Metiltricosano	2347	57,27	2,70	2342	Hidrocarboneto	0,13	C ₂₄ H ₅₀	669

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade.

Nome	IR _{LIT} ^a	¹ t _R (min) ^b	² t _R (s) ^c	IR _{EXP} ^d	Classe	Área (%)	Fórmula	SIM ^e
2-Hexil-heptadecanoato	2395	58,33	3,05	2396	Éster	0,09	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	842
Docosanal	2434	59,13	3,14	2430	Aldeído	0,02	C ₂₂ H ₄₄ O	873
4-(geranilóxi)-Cinamato de metila	2461	60,20	2,23	2474	Éster	0,02	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	709
Fitaliato de 2,3-dimetilfenilbutila	2477	60,73	3,79	2497	Éster	0,06	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	759
2-Tricosanona	2513	61,00	3,21	2507	Cetona	0,04	C ₂₃ H ₄₆ O	907
2-Hexacoseno	2629	64,07	2,95	2626	Hidrocarboneto	0,05	C ₂₆ H ₅₂	845
2-Etilbutirato de nonadecila	2620	64,07	4,23	2627	Éster	0,07	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	822
Ciclooctacosano	2795	67,53	3,34	2775	Hidrocarboneto	0,08	C ₂₈ H ₅₆	784
4-Butilbenzenoato de heptadecila	2892	70,47	7,58	2894	Fenol	0,78	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	845
Heptacosanal	2930	70,73	4,46	2903	Aldeído	0,03	C ₂₇ H ₅₄ O	810
7-Metilnonacosano	2939	71,93	4,06	2943	Hidrocarboneto	0,01	C ₃₀ H ₆₂	697
6-Metilnonacosano	2950	72,07	4,80	2948	Hidrocarboneto	0,35	C ₃₀ H ₆₂	911

^aÍndice de retenção da literatura; ^bTempo de retenção na primeira dimensão; ^cTempo de retenção na segunda dimensão; ^dÍndice de retenção experimental; ^eSimilaridade.

A análise bidimensional permite a separação de compostos que apresentam pontos de ebulição próximos na primeira dimensão. Um exemplo da eficiente separação desta técnica ocorre entre 45,8 a 46,3 min, onde os compostos são separados apenas na segunda dimensão. A FIGURA 19 amplia o diagrama de cores desta região, onde os pontos pretos representados na figura são referentes a cada um dos compostos envolvidos. Pelo diagrama 3D foi possível observar a intensidade de cada composto individualmente.

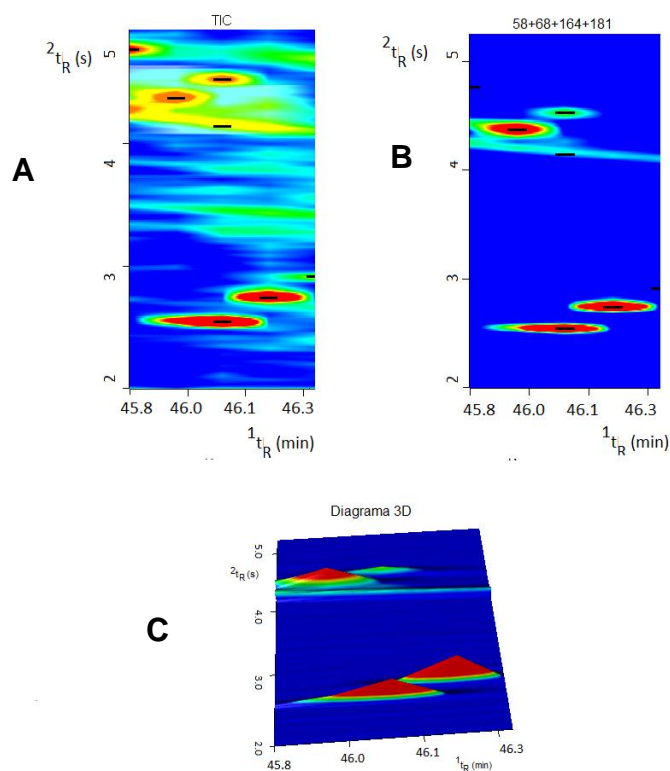


FIGURA 19 – DIAGRAMA DE CORES PARA OS CROMATOGRAMAS DE (A) ÍONS TOTAIS E DE (B) ÍONS SELETIVOS, EM COMPARAÇÃO AO (C) CROMATOGRAMA TRIDIMENSIONAL DOS COMPOSTOS SEPARADOS POR GCXGC/TOF NA SEGUNDA DIMENSÃO.

Quando analisado o espectro de massas na primeira dimensão da área ampliada, é possível observar a coeluição destes componentes e a partir da segunda dimensão, estes compostos foram separados. A FIGURA 20 apresenta os cromatogramas dos compostos sobrepostos e individuais, assim como o espectro de massas comparado a biblioteca NIST.

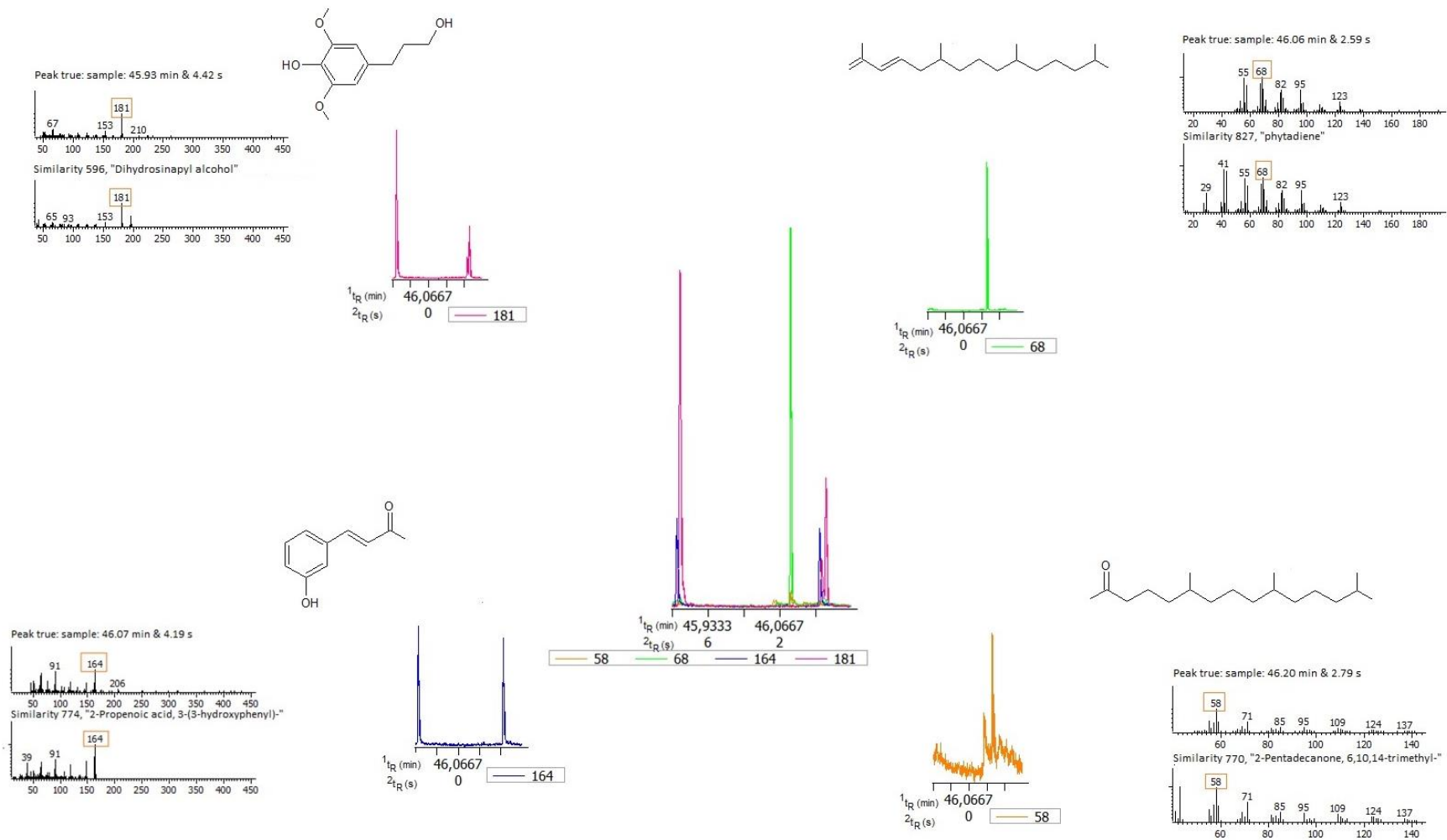


FIGURA 20 – CROMATOGRAMAS E ESPECTROS DE MASSAS DE COMPOSTOS SEPARADOS NA SEGUNDA DIMENSÃO POR GCXGC/TOFMS A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DO BAGAÇO DE CANA.

4.2 Caracterização da composição química do bagaço

Como parte do procedimento de caracterização, as amostras de bagaço BIN e BLE foram submetidas à extração por uma sequência de solventes de polaridade crescente. Tal medida se faz necessária para evitar que estes componentes sofram reações de condensação entre si e com outras substâncias presentes no meio, gerando estruturas de maior massa molar que possam ser contabilizadas de maneira errônea como lignina insolúvel em ácido devido a sua baixa solubilidade em ácido sulfúrico diluído. Posteriormente, a amostra foi hidrolisada para que fossem determinados os seus teores de anidroglicose, anidroxilose, anidroarabinose, grupo acetila e lignina (solúvel e insolúvel em ácido), que estão expressos na TABELA 3 juntamente aos valores de cinzas e extraíveis.

As amostras de bagaço BIN e BLE apresentaram um teor de umidade de 11 e 9%, respectivamente. No entanto, todos os dados da TABELA 3 foram expressos em relação à massa seca das amostras. Entre as amostras de bagaço BIN e BLE, diferenças foram encontradas entre os teores de anidroglicose e anidroxilose, enquanto que os teores de anidroarabinose e de grupamentos acetila foram muito próximos entre si. O menor percentual de cinzas para o bagaço lavado com etanol é devido ao processo de extração a que este bagaço foi submetido. Ambas as amostras de bagaço apresentaram teores de cinzas menores que outros tipos de biomassa lignocelulósica como, por exemplo, a palha de arroz (14,5%) e a palha de milho (9,2%) (CARDONA *et al.*, 2010).

O percentual de furfural e 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) encontrado nos hidrolisados ácidos das diferentes amostras são decorrentes da desidratação de pentoses e hexoses durante o ensaio, respectivamente. Estes teores foram convertidos aos seus polissacarídeos de origem e somados ao valor total de glucanas e hemiceluloses porque não seria possível saber exatamente quais as suas respectivas origens. Já quanto aos extraíveis, houve uma diferença significativa entre os teores observados nas duas amostras, demonstrando que a lavagem com etanol 95% foi capaz de remover aproximadamente 50% dos extraíveis totais presentes no bagaço.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA* (BIN) E PARA O BAGAÇO LAVADO COM ETANOL (BLE).

Componentes	Percentual (%)	
	BIN	BLE*
Anidroglicose	33,98 ±1,25	38,37 ±0,20
Anidroxilose ¹	17,99 ±0,38	20,34 ±0,10
Anidroarabinose ¹	1,92 ±0,02	2,00 ±0,27
Grupo acetila ¹	2,38 ±0,13	2,93 ±0,35
Hexoses identificadas como HMF ²	1,43 ±0,02	0,27 ±0,25
Pentoses identificadas como furfural ³	1,52 ±0,05	0,71 ±0,54
Lignina Insolúvel em ácido	19,68 ±0,04	19,97 ±0,01
Lignina Solúvel em ácido	2,22 ±0,16	0,45 ±0,01
Extraíveis totais	4,72 ±0,10	2,13 ±0,20
Éter etílico	0,76 ±0,04	0,11 ±0,09
Diclorometano	0,25 ±0,12	0,05 ±0,01
Etanol:tolueno (1:2)	1,78 ±0,17	0,40 ±0,10
Etanol 95%	0,37 ±0,11	0,05 ±0,01
Água	1,57 ±0,05	1,52 ±0,01
Cinzas	4,50 ±0,6	3,77 ±0,10
Total	90,31	90,93
Total de glucanas ⁴	36,91 ±0,64	38,74 ±0,20
Total de hemiceluloses ⁵	24,54 ±0,15	26,31 ±0,30
Total de lignina	21,99 ±0,08	19,86 ±0,01

* Extração com etanol 95%

¹ Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses)

² Produto da desidratação de hexoses: hidroximetilfurfural (HMF)

³ Produto da desidratação de pentoses: furfural

⁴ Somatória do teor de anidroglicose e de seu valor correspondente em HMF

⁵ Somatória dos teores de anidroxilose, anidrorabinse, grupo acetila e o valor de conversão do furfural

A extração sequencial com solventes de diferentes polaridades foi realizada para garantir a eliminação de interferentes durante a caracterização química das amostras de bagaço. No entanto, este procedimento também permitiu avaliar a eficiência da extração realizada com etanol 95%, demonstrando assim a natureza dos extraíveis que eventualmente permaneceram na composição química do BLE. Os solventes orgânicos retiraram 3,16 e 0,61% dos

extraíveis do BIN e BLE, respectivamente, sendo que diferenças significativas foram observadas entre os teores extraídos por cada solvente. Assim, constata-se que a extração com etanol 95% retirou o equivalente a 86, 80 e 77% dos extraíveis em éter etílico, diclorometano e etanol:tolueno, respectivamente. Os demais extraíveis foram retirados pela água, sendo importante ressaltar que entre as amostras de bagaço a quantidade de extraíveis hidrossolúveis foram bem semelhantes, sugerindo que a extração com etanol 95% não removeu componentes como sais, carboidratos simples e substâncias pécicas.

Dentre os solventes orgânicos, que mais extraiu substâncias foi o etanol:tolueno (1:2), sendo de 1,78% para o BIN e de 0,40% para o BLE. Este solvente remove compostos oxigenados como ácidos fenólicos, flavonoides, lipídeos complexos e lignanas e, dentre estes, os de menor polaridade devem ter sido retidos na matriz lignocelulósica após a extração com etanol. Já a água remove carboidratos hidrossolúveis como sacarose e materiais pécicos e estes são pouco solúveis em etanol hidratado. Assim, o BIN apresentou um percentual de 1,52% de extrato aquoso, sendo responsável pela retirada de aproximadamente 33% dos extraíveis presentes na amostra, enquanto que, para o BLE, a água foi responsável pela retirada de 71% do total de extraíveis.

Os extraíveis obtidos a partir da sequência de solventes do BIN também foram caracterizados por FT-IR e os espectros estão apresentados na FIGURA 21, sendo que as bandas encontradas no extrato etanólico do bagaço também foram observadas nos espectros obtidos para cada extrato da sequência de solventes. O espectro dos extratos obtidos com éter etílico é bem característico de compostos alifáticos ricos em CH_2 e CH_3 , sendo esta uma das classes majoritárias identificadas no extraíveis. No espectro do extrato de diclorometano, há o surgimento da banda 4 que sugere fortemente a presença de compostos carbonílicos, como cetonas, aldeídos e ésteres graxos. Já nos espectros dos extratos de etanol:tolueno e etanol, observa-se a presença da banda 5 e de outras bandas de impressão digital que sugere a presença de fenóis e outros compostos aromáticos hidroxilados, carbonilados ou não. Finalmente, o espectro dos compostos hidrossolúveis é bem característico de carboidratos.

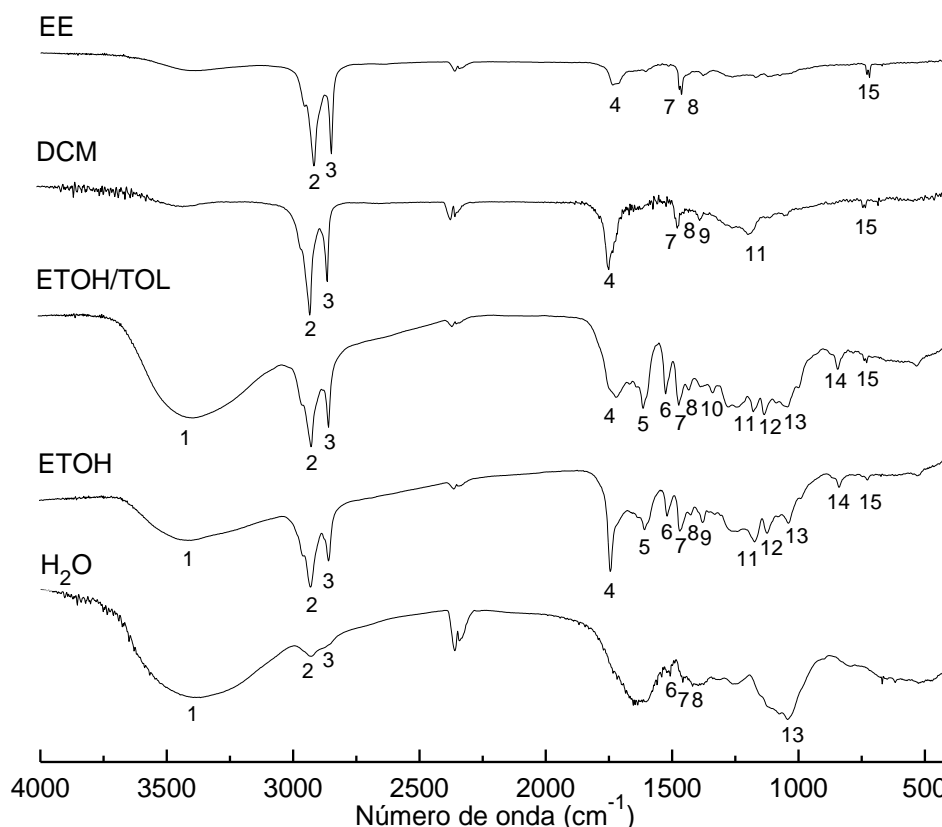


FIGURA 21 – ESPECTROS DE FT-IR DOS EXTRAÍVEIS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*.

Na literatura, a composição de materiais lignocelulósicos é geralmente apresentada em relação aos teores de glucanas, hemiceluloses, lignina, extraíveis e cinzas. Por esta razão, a TABELA 4 apresenta uma comparação dos teores obtidos neste trabalho com os obtidos por outros autores.

O teor de glucanas (majoritariamente celulose) do bagaço *in natura* ficou em torno de 37,42%, semelhante ao resultado obtido por Gómez (2010), que utilizou amostras de BIN realizando uma secagem do material por quatro dias. Marabenzi (2009) determinou a composição química a partir do bagaço livre de extraíveis utilizando cicloexano/etanol como solvente, além de um processo de lavagem com água antes da remoção destes extraíveis, e seus teores de glucana, hemiceluloses, lignina total e extraíveis foram muito semelhantes ao BLE investigado neste trabalho.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO *IN NAURA* E LAVADO COM ETANOL FRENTE AOS DADOS DISPONÍVEIS NA LITERATURA.

Componentes (%)	Bagaço		Gómez (2010)	Marabenzi (2009)	Pitarello (2013)	Qiu <i>et al.</i> , (2012)	Rocha <i>et al.</i> (2014)
	BIN	BLE					
Glucanas	37,42 (33,98) ¹	40,78 (38,37) ¹	37,35	40,21	41,63	40,87	44,30
Hemiceluloses ²	24,55 (22,29) ¹	26,85 (25,27) ¹	23,66	27,14	28,86	22,55	27,10
Lignina	24,12 (21,90) ¹	21,70 (20,42) ¹	25,10	20,70	22,82	24,81	20,90
Extraíveis	4,78	2,13	3,25	2,09	4,10	1,49	5,82
Cinzas	4,48	3,77	1,79	0,93	6,72	1,44	1,20

BIN – bagaço *in natura*

BLE – bagaço lavado com etanol

¹ Valores expresso em relação a massa inicial de bagaço

² Expresso pela soma dos teores de anidroxilose, anidroarabinose e grupamento acetila.

Qiu *et al.* (2012) utilizaram amostras de bagaço que foram submetidas a uma extração com etanol 95% e água, apresentando teores de glucana próximos ao bagaço lavado apenas com etanol 95%, porém, com menores teores de hemiceluloses, lignina total e extraíveis. Pitarello (2013) relatou valores próximos aos encontrados neste trabalho para o BLE, exceto em relação aos percentuais de extraíveis e cinzas. Já Rocha *et al.* (2014) determinou a composição química do bagaço livre de extraíveis a partir da extração com etanol 95% do bagaço moído, apresentando teores de hemiceluloses, lignina e extraíveis próximos aos obtidos para o BLE.

Diferentes valores de cinzas foram encontrados na literatura para o bagaço e a justificativa para estas diferenças pode ser atribuída ao tipo de solo utilizado no cultivo e às tecnologias de colheita e de processamento da cana (MARABENZI, 2009). O alto teor de cinzas observado neste trabalho pode ser justificado pela presença de impurezas no bagaço (poeira e fuligem), já que neste não foi realizada nenhuma lavagem do mesmo antes da caracterização. A intenção desta etapa adicional seria de remover compostos inorgânicos solúveis e a sacarose residual eventualmente presente após o processo industrial de moagem e extração. Comparado a outros tipos de biomassa, os teores de cinzas do bagaço são relativamente baixos, já que a palha de arroz, a palha de trigo e a palha da cana apresentam teores de 17,5%, 11% e 11,7%, respectivamente

(BARCELOS *et al.*, 2012). Altos teores de cinzas podem indicar problemas na etapa de pré-tratamento, pois diminuem o potencial energético da matéria-prima para o processo de fermentação, aumentam a capacidade tamponante da matéria-prima (levando à neutralização dos ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos) e podem causar corrosão e maior abrasão do equipamento (BARCELOS *et al.*, 2013; PITARELO, 2007).

4.3 Rendimentos de recuperação e composição química dos bagaços pré-tratado

Os rendimentos de recuperação das frações solúvel (BT_{FA}) e insolúvel (BT_{FIL}) estão apresentados na TABELA 5. A fração insolúvel foi sempre recuperada em maiores rendimentos do que a fração solúvel, indicando que o material lignocelulósico foi apenas parcialmente hidrolisado.

TABELA 5 – RECUPERAÇÃO TOTAL DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS APÓS PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.

AMOSTRAS		Massa seca (g)	Recuperação (%)		
			BT _{FA} ⁴	BT _{FIL} ⁵	Total
BLE ¹	AH ³	402,3	10,8 ±1,6	61,8 ±3,0	72,6
	H ₃ PO ₄	439,2	10,4 ±0,1	62,0 ±0,3	72,4
	H ₂ SO ₄	340,9	11,5 ±0,1	55,0 ±11,8	66,5
BIN ²	AH	400,5	11,0 ±2,8	62,8 ±1,4	73,8
	H ₃ PO ₄	328,5	8,5 ±0,8	51,7 ±10,7	60,2
	H ₂ SO ₄	267,2	7,5 ±0,8	49,7 ±7,2	57,2

¹ Bagaço lavado com etanol;

² Bagaço *in natura*;

³ Bagaço pré-tratado nas condições auto-hidrólise;

⁴ Fração solúvel em água do bagaço pre-tratado;

⁵ Fração insolúvel em água do bagaço pré-tratado.

Os rendimentos totais de recuperação para o BLE na ausência (auto-hidrólise) e na presença de um catalisador (ácidos fosfórico e sulfúrico) foram de 72,58, 72,37 e 66,48%, respectivamente. Já para o BIN estes rendimentos foram de 73,77, 60,19 e 57,22%, respectivamente. Parte destas perdas se devem à volatilização de sub-produtos da reação como hidroximetilfurfural e furfural, dentre outros. Tanto para o BIN quanto para o BLE, a auto-hidrólise gerou os melhores

rendimentos de recuperação total, o mesmo ocorrendo com os experimentos de catálise fosfórica do BLE. Os rendimentos de recuperação das frações BT_{FA} e BT_{FIL} foram menores para as amostras pré-tratadas na presença de ácido sulfúrico, devido à dificuldade de recuperação deste material de dentro do reator, que se apresentou de uma consistência mais fina do que os demais. Amores *et al.* (2013) obtiveram valores de recuperação semelhantes de 61 e 50% para fração insolúvel do bagaço de cana pré-tratado a 215 °C e 230 °C, por 5 min, respectivamente, de modo que o aumento da temperatura não influenciou no teor de recuperação. A composição química das frações insolúveis (BT_{FIL}) provenientes do pré-tratamento são apresentada na TABELA 6.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL (BT_{FIL}) DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS APÓS A EXPLOSÃO VAPOR.

AMOSTRAS	Composição química da fração BT _{FIL} ⁴ (%)					
	AnGlc ⁵	AnXyl ⁶	AnAra ⁶	Acetila ⁶	Lignina	Cinzas
BLE¹	40,9 ±0,20	21,6 ±0,1	2,1 ±0,3	3,1 ±0,4	21,7 ±0,1	3,8 ±0,1
AH ²	60,4 ±1,8	4,1 ±0,7	nd	nd	36,5 ±3,6	6,0 ±0,9
H ₃ PO ₄	51,8 ±1,9	2,0 ±0,1	nd	nd	34,3 ±2,9	8,0 ±0,9
H ₂ SO ₄	48,7 ±1,9	nd	nd	nd	46,9 ±0,2	10,1 ±2,0
BIN³	37,4 ±1,3	19,8 ±0,4	2,1 ±0,1	2,6 ±0,1	24,1 ±0,1	4,5 ±0,6
AH	54,9 ±0,4	3,4 ±0,8	nd	nd	40,4 ±0,2	9,5 ±0,1
H ₃ PO ₄	53,4 ±0,8	2,4 ±0,1	nd	nd	39,8 ±2,4	7,4 ±0,2
H ₂ SO ₄	48,2 ±2,0	1,2 ±0,2	nd	nd	51,3 ±3,0	9,8 ±0,1

¹ Bagaço lavado com etanol;

² Bagaço pré-tratado nas condições auto-hidrólise;

³ Bagaço *in natura*;

⁴ Fração insolúvel em água do bagaço pré-tratado;

⁵ AnGlc: anidroglicose; presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

⁶ AnXyl: anidroxilose; AnAra: anidroarabinose; presentes como componentes das heteroxilanas.

Os teores de anidroglicose e anidroxilose na fração BT_{FIL} decresceram conforme a drasticidade do pré-tratamento aumentou. Por outro lado, quando comparados ao material de origem, os teores de anidroglicose foram maiores no material pré-tratado, enquanto que o oposto foi observado para o teor de anidroxilose, que nem sequer foi detectada na fração insolúvel derivada do BLE pré-tratado por catálise sulfúrica. Isto indica que o uso de um ácido mais forte levou à remoção praticamente integral das hemiceluloses.

Tanto para o BIN quanto para o BLE, a auto-hidrólise gerou substratos

com maiores teores de anidroxilose quando comparada aos experimentos de catálise fosfórica. Já para os pré-tratamentos realizados na ausência e na presença de extraíveis, não foram detectados valores de anidroarabinose e grupo acetila (detectado na forma de ácido acético) nos substratos celulósicos produzidos, indicando que a maior parte destes componentes também foi hidrolisada e liberada na fração solúvel do bagaço pré-tratado. Naturalmente, com a remoção parcial das hemiceluloses, o percentual de lignina aumentou em relação à composição do bagaço de origem. Já os teores de cinzas para os materiais pré-tratados foram superiores em relação ao seu material de origem. No caso do BLE, o teor de cinzas aumenta conforme a severidade do pré-tratamento, o que não ocorre no BIN, onde o teor de cinzas no material por auto-hidrólise e catálise sulfúrica foram semelhantes. Um alto teor de cinzas pode ser considerado um problema para o pré-tratamento, pois diminui o potencial energético da matéria prima para o processo de fermentação e pode causar maior abrasão e corrosão do equipamento.

Aguiar *et al.* (2013) realizou experimentos de explosão a vapor com bagaço de cana a 210 °C por 4 min na ausência (auto-hidrólise) e na presença de um catalisador ácido exógeno (ácidos fosfórico e sulfúrico a 9,5 mg g⁻¹ de biomassa seca). Na composição química do material pré-tratado por auto-hidrólise foram encontrados teores de 56,5, 5,28 e 33,4% de glucanas, hemiceluloses e lignina respectivamente, enquanto que estes valores foram de 60,32, 3,63 e 30,30% para a catálise fosfórica e de 58,88, 2,65 e 34,35% para a catálise sulfúrica, respectivamente. Em relação ao teor de glucanas, o material obtido por auto-hidrólise apresentou valores bem semelhantes aos obtidos neste trabalho. Porém, no caso das catálises fosfórica e sulfúrica, Aguiar *et al.* (2013) encontraram teores superiores em 10 e 20%, respectivamente. Observa-se, portanto, que a redução do tempo em uma temperatura maior resulta em melhores rendimentos quando se utilizam catalisadores ácidos exógenos. Wanderley *et al.* (2013) demonstraram que a explosão a vapor do bagaço de cana a 200 °C por 7 min resultou em um material pré-tratado contendo 47,7% de glucanas, 8,9% de hemiceluloses e 34,3%, de lignina, teores estes menores do que os encontrados neste trabalho devido apenas ao aumento da temperatura, já que os tempos de residência no reator foram semelhantes. Estudos de explosão a vapor do bagaço de cana a 190 °C por 15 min realizados por Rocha *et al.* (2012a)

resultaram em materiais de composição química semelhante à encontrada neste trabalho, sendo esta de 57,5% de glucanas, 6,6% de hemiceluloses e 32,5%, de lignina.

A partir da TABELA 7, referente ao balanço de massas obtido após o pré-tratamento para a fração insolúvel, observam-se diferenças significativas entre os dois tipos de bagaço em relação à presença ou não de catalisador e ao tipo de catalisador empregado nos experimentos.

TABELA 7 – BALANÇO DE MASSAS DA FRAÇÃO INSOLÚVEL (BT_{FIL}) DOS DIFERENTES BGAÇOS PRÉ-TRATADOS.

AMOSTRAS	Balanço de massas da BT _{FIL} (%)		
	AnGlc	AnXyl	Lignina
BLE¹			
AH	91,0 ±1,6	11,9 ±0,9	99,6 ±0,2
H ₃ PO ₄	86,3 ±1,8	5,7 ±0,5	97,3 ±1,6
H ₂ SO ₄	59,6 ±0,1	-	105,5 ±0,9
BIN²			
AH	92,7 ±2,6	12,5 ±0,2	108,1 ±2,3
H ₃ PO ₄	84,5 ±1,6	6,1 ±0,9	87,4 ±0,1
H ₂ SO ₄	61,3 ±3,2	2,9 ±0,2	90,7 ±0,4

¹ Bagaço lavado com etanol;

² Bagaço pré-tratado nas condições auto-hidrólise.

Para a fração BT_{FIL}, o alto rendimento de recuperação de anidroglicose para o bagaço pré-tratado por auto-hidrólise, utilizando o BIN ou BLE, indica que a celulose não sofreu hidrólise em grande extensão, sendo quase totalmente recuperada na fração BT_{FIL}, sendo que o mesmo ocorre não para o teor de anidroxilose. A catálise fosfórica se destaca em comparação a catálise sulfúrica, apresentando melhores rendimentos de recuperação para anidroglicose e anidroxilose, tanto para o BIN quanto para o BLE. Pitarelo (2013) pré-tratou BIN por auto-hidrólise e catálise fosfórica nas mesmas condições empregadas neste trabalho e os rendimentos de glucanas apresentaram-se semelhantes, entre 97-98%. Já Aguiar *et al.* (2013) encontrou um teor de recuperação de 86% a partir do bagaço pré-tratado por auto-hidrólise a uma temperatura de 210 °C e 4 min, demonstrando que o aumento da temperatura influencia na recuperação deste componente.

Sobre o rendimento de recuperação de lignina, os pré-tratamentos apresentaram valores próximos e acima de 100% e isto se deve a sua modificação, que pode seguir três caminhos distintos: hidrólise ácida, clivagem homolítica e reações de condensação. Os altos valores são indicativos de que as reações de condensação podem ter sido mais importantes do que as reações de hidrólise.

Sabe-se que a explosão a vapor, particularmente quando realizada na ausência de um catalisador ácido exógeno, não gera apenas monossacarídeos, mas também uma quantidade significativa de oligômeros e estes podem ser observados claramente na análise cromatográfica das frações solúveis em água (BT_{FA}) (FIGURA 22).

Entre os três tipos de pré-tratamentos, observa-se que os bagaços BIN e BLE submetidos à auto-hidrólise foram os que apresentaram maior concentração de oligômeros na fração hidrossolúvel, sendo este também o que apresentou maior concentração de xilose nas formas mono e oligoméricas. Isto comprova a ocorrência de hidrólise parcial das hemiceluloses durante o processo de explosão a vapor, mas os rendimentos relativos a este processo não foram calculados devido a perdas ocorridas durante os processos de pré-tratamento e lavagem dos substratos pré-tratados.

Nos pré-tratamentos realizados na presença de um ácido mineral, o uso de catálise fosfórica proporcionou a maior recuperação de xilose na forma monomérica, conforme demonstra a FIGURA 22 para BIN e BLE. Este comportamento do ácido fosfórico se deve particularmente a dois fatores: sua presença propiciou a hidrólise quase que total dos xilo-oligômeros presentes nos hidrolisados de auto-hidrólise, enquanto que sua menor força ácida reduziu as perdas devidas à desidratação quando comparado à catálise sulfúrica. Neste sentido, é importante ressaltar que os cromatogramas da FIGURA 22 foram normalizados em relação à massa de bagaço pré-tratado e ao volume total de fração hidrossolúvel dele derivada após lavagem aquosa. Portanto, para experimentos de SSCF onde a fermentação de xilose também seja explorada, o uso de ácido fosfórico diluído parece interessante por produzir um hidrolisado com maior concentração de oligossacarídeos e pouca perda de glucanas na forma de glucose livre, apesar do evidente acúmulo de furfural (FIGURA 23) cujo poder inibitório depende do organismo que seja utilizado para a fermentação.

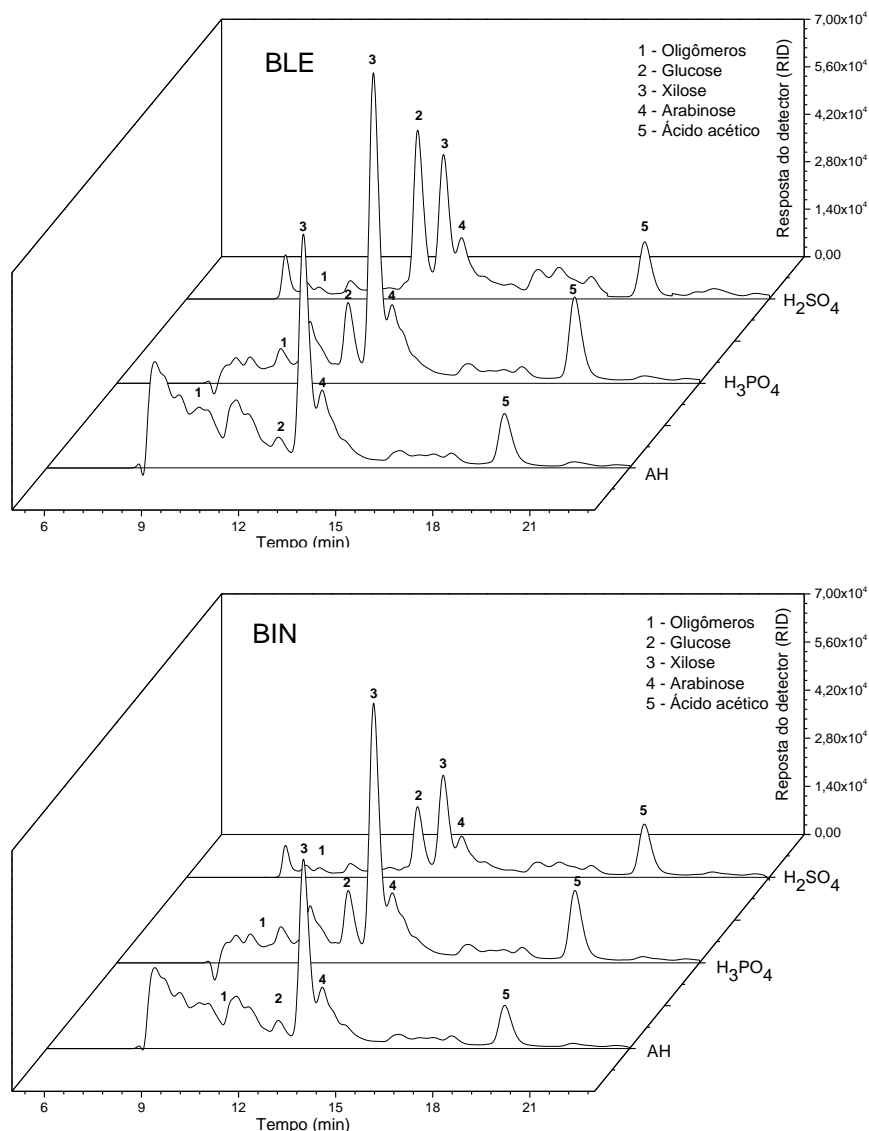


FIGURA 22 – CROMATOGRAMAS DOS CARBOIDRATOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DERIVADA DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR – AH, AUTO-HIDRÓLISE; H₃PO₄, CATÁLISE FOSFÓRICA; H₂SO₄, CATÁLISE SULFÚRICA.

O material derivado da catálise sulfúrica teve menor percentual de oligômeros e a maior liberação de glucose a partir de BIN e BLE, o que sugere perdas maiores de glucanas com o acúmulo de HMF e seus derivados na fração hidrossolúvel (FIGURA 23). Além disto, a presença de ácidos minerais levou a um maior acúmulo de furfural nesta fração, particularmente no caso das catálises fosfórica e sulfúrica. Esta constatação reforça a necessidade de se quantificar estes componentes para garantir que a composição química das diferentes frações do pré-tratamento sejam determinadas corretamente.

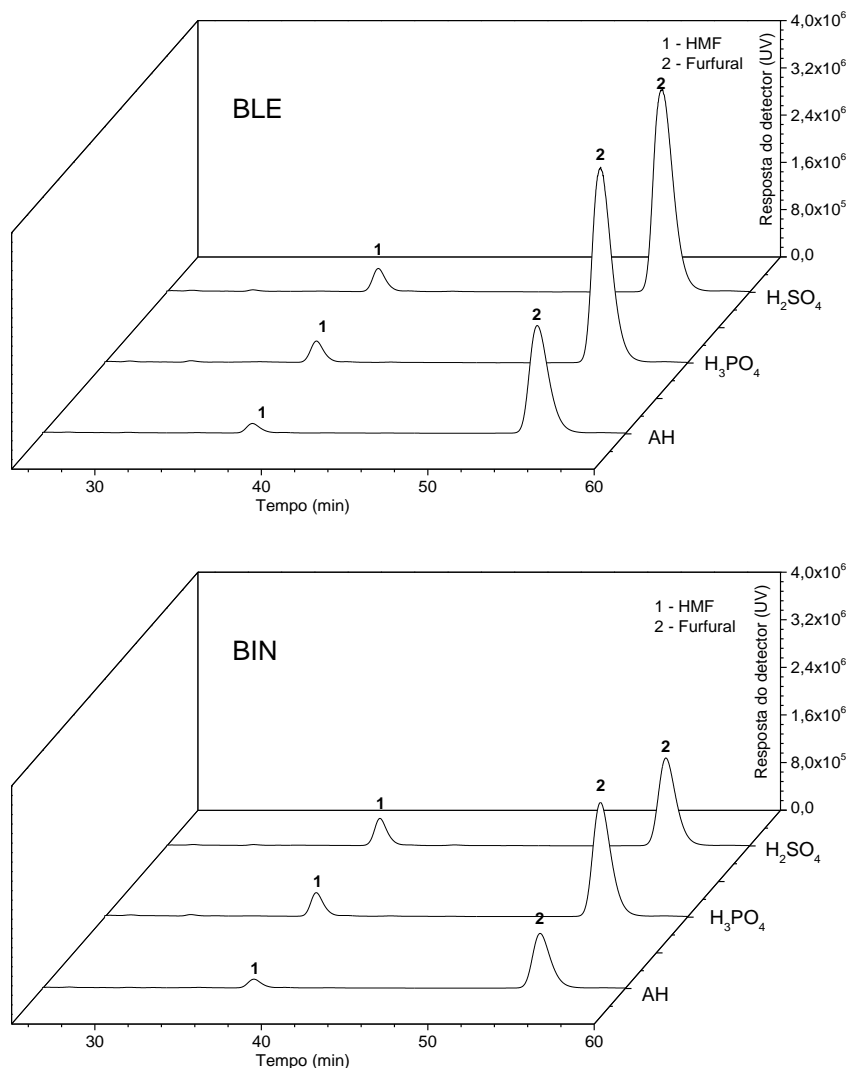


FIGURA 23 – CROMATOGRAMAS DOS COMPOSTOS FURÂNICOS DA FRAÇÃO SOLÚVEL DERIVADA DO BAGAÇO DE CANA POR EXPLOSÃO A VAPOR – AH, AUTO-HIDRÓLISE; H₃PO₄, CATÁLISE FOSFÓRICA; H₂SO₄, CATÁLISE SULFÚRICA.

A baixa recuperação de hemiceluloses na fração solúvel proveniente do pré-tratamento tem sido parcialmente atribuída à formação de furfural e HMF e à dificuldade de quantificação destas perdas durante o processo. As menores concentrações de furfural e HMF foram observadas nos hidrolisados de auto-hidrólise, seguido das catálises fosfórica e sulfúrica. Aparentemente, a extração etanólica do bagaço de cana proporcionou um aumento da susceptibilidade do bagaço de cana à hidrólise ácida, já que a presença de compostos furânicos nos hidrolisados derivados do BIN foram sempre inferiores aos observados para o BLE.

4.4 Ensaios de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado

As frações BT_{FIL} derivadas do pré-tratamento por explosão a vapor foram submetidas a uma hidrólise enzimática, conforme detalhado na seção 3.5, para avaliar a possibilidade de sua conversão a açúcares livres pela ação das enzimas. Os resultados obtidos estão apresentados na TABELA 8 e os gráficos relacionados a estes dados encontram-se registrados na FIGURA 24.

TABELA 8 – CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO BT_{FIL} DO BIN E BLE PRÉ-TRATADOS A VAPOR.

AMOSTRA	Equivalentes de glucose (%)								
	1h	3h	6h	12h	24h	48h	72h	96h	
AH	5,3	15,2	24,6	37,6	61,2	83,2	88,2	91,7	
BLE	H ₃ PO ₄	9,9	18,9	29,4	42,5	69,7	88,8	101,1	102,8
	H ₂ SO ₄	14,1	26,2	36,0	46,0	76,0	91,0	90,4	95,8
AH	5,3	15,2	26,7	41,9	66,6	93,8	101,5	103,6	
BIN	H ₃ PO ₄	7,5	20,0	29,8	41,7	68,9	90,3	101,6	102,8
	H ₂ SO ₄	13,9	23,4	36,6	42,6	69,5	77,1	85,2	94,9

O pré-tratamento por explosão a vapor proporciona redução do tamanho das partículas, abertura dos microporos e aumento na área superficial do substrato, e estas alterações proporcionam um aumento de sua acessibilidade às enzimas. Neste caso, os valores de conversão de anidrogucose no bagaço obtidos na hidrólise com consistência de 12% de sólidos totais e carga enzimática que correspondeu a 8,4 FPU g⁻¹ de substrato seco (FPU – unidades de papel de filtro), indicam um aumento de acessibilidade frente à bioconversão gerado nos substratos pelo pré-tratamento. Além disso, observou-se que a velocidade inicial de conversão foi maior para o material pré-tratado por catálise sulfúrica, seja para o BIN ou para o BLE, e isto pode ser correlacionado a força química do ácido utilizado durante o pré-tratamento. Quanto mais forte o ácido empregado na explosão a vapor, maior a acessibilidade do substrato gerado, possivelmente devido à maior remoção de hemiceluloses bem como a quebra de ligações glucosídicas na celulose (principalmente nas região amorfas), o que propicia uma maior liberação de equivalentes de glucose nas primeiras horas do ensaio, pois estes pontos são os sítios de ação das exoglucanases. Além disso, o bagaço pré-

tratado por catálise sulfúrica resultou em um material menos fibroso quando comparado aos demais, aumentando assim a homogeneidade do meio durante a etapa de hidrólise.

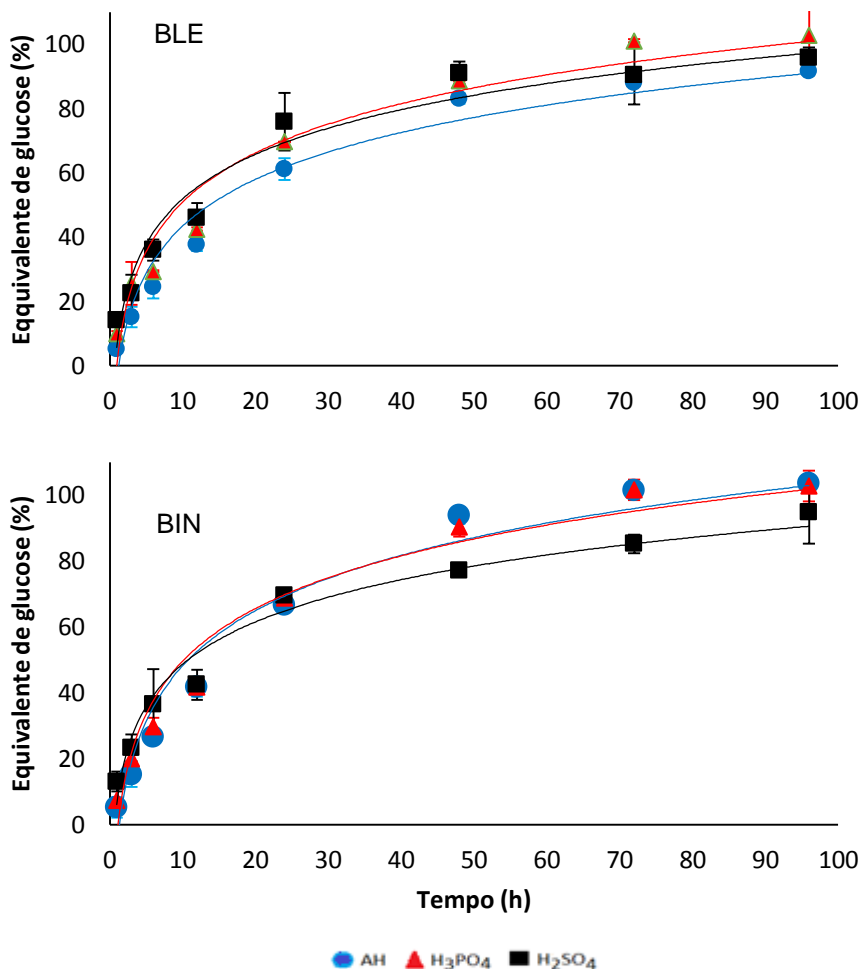


FIGURA 24 – GRÁFICO DE CONVERSÃO EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE OBTIDOS A PARTIR DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FRAÇÃO BT_{FIL} DO BLE E BIN PRÉ-TRATADOS A VAPOR.

O aumento nos valores de conversão para BIN em catálise sulfúrica ocorreu até o tempo de 24 h, onde a liberação de equivalentes de glucose foi bem próxima entre os diferentes tipos de pré-tratamento. Por outro lado, no caso do BLE, esse acréscimo ocorreu até o tempo de 48 h e, deste ponto em diante, a taxa de conversão foi diferente entre os mesmos. Observou-se também que a partir do tempo de 72 h as amostras catalisadas por ácido fosfórico e o BIN pré-tratado por auto-hidrólise alcançaram uma taxa de conversão de 100%, sugerindo que o ensaio poderia ter sido encerrado neste tempo. As amostras

catalisadas por ácido sulfúrico alcançaram conversão de 95% em 96 h, enquanto que o BLE pré-tratado por auto-hidrólise também apresentou 95% de conversão neste tempo. Apesar disso, a presença ou ausência dos extraíveis não demonstrou interferência durante a liberação de equivalentes de glucose e, de maneira similar, os diferentes teores de lignina presentes nos substratos pré-tratados não indicaram grandes mudanças nos valores de conversão, conforme apresentado na FIGURA 24.

Pitarelo (2013) realizou ensaios de hidrólise enzimática (62,5 mg g⁻¹ do preparado comercial Cellic CTec2; 12% de sólidos totais; 96 h) do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (195 °C por 7,5 min) e catálise fosfórica (9,5 mg g⁻¹ de massa seca) nas mesmas condições empregadas neste trabalho. O rendimento de hidrólise do material autohidrolisado foi de 97% em 96 h, superior ao obtido para o BLE e próximo ao BIN (obtidos no presente trabalho), ao passo que o obtido por catálise fosfórica foi de 84%, valor este inferior às taxas de conversão obtidas neste trabalho. Estes valores provavelmente refletem pequenas diferenças nos procedimentos experimentais.

Sasaki *et al.* (2012) estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana explodido a vapor (224 °C por 5 min) utilizando 10% de sólidos totais e uma preparação enzimática comercial (Meicellase) contendo 50 FPU g⁻¹ de substrato. Os ensaios de hidrólise realizados por 48 h apresentaram teores de conversão de 94,9%. Tais valores coincidem com os rendimentos obtidos no presente trabalho no mesmo tempo de hidrólise, que variaram entre 77,12 e 93,03% e chegaram a 100% de conversão com 96 h de ensaio. No entanto, a carga enzimática utilizada no presente trabalho foi 9,49 vezes menor e o teor de sólidos totais foi 20% maior do que as condições empregadas por Sasaki *et al.* (2012). Estes autores também realizaram ensaios para amostras de bagaço não lavados e obtiveram rendimentos de 73%, indicando que o processo de lavagem possibilita a retirada dos compostos solúveis oriundos do pré-tratamento que podem atuar como inibidores durante o processo de hidrólise.

Cada material hidrolisado apresentou uma concentração final de 58, 56 e 56 g L⁻¹ de glucose para o BLE tratado na ausência (auto-hidrólise) e na presença de catalisadores (catálise fosfórica e sulfúrica) respectivamente. Já para o BIN, o teor de glucose obtido do bagaço pré-tratado por auto-hidrólise foi de 58 g L⁻¹ e para os bagaços pré-tratados por catálises fosfórica e sulfúrica, estes valores

foram de 55 e 47 g L⁻¹, respectivamente. No entanto, comparando os desvios padrões destes valores, fica evidente que a presença de extrativos no material submetido ao pré-tratamento não afetou os resultados de hidrólise enzimática que foram obtidos com a enzima Cellic CTec2.

4.5 Ensaio de fermentação

Nas TABELAS 9 e 10 são apresentados os resultados de fermentação dos hidrolisados para cada tipo de bagaço pré-tratado caracterizando, portanto, a configuração de um processo SHF.

TABELA 9 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SHF PARA O BLE.

Tempo (h)	Consumo de glucose (g L ⁻¹)			Produção de etanol (g L ⁻¹)		
	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄
0	58,0 ±2,3	55,7 ±0,1	55,5 ±6,7	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1
3	49,4 ±0,2	46,9 ±0,8	46,8 ±6,8	3,5 ±0,6	4,3 ±0,6	2,5 ±1,2
6	32,9 ±1,6	28,7 ±1,3	33,4 ±7,3	13,0 ±1,1	13,5 ±1,7	9,2 ±0,6
12	0,5 ±0,2	0,4 ±0,1	4,7 ±0,3	27,6 ±0,6	25,5 ±0,8	23,8 ±1,6
20	0,4 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	27,2 ±0,3	24,8 ±0,1	24,2 ±2,8
24	0,4 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	27,1 ±0,1	24,6 ±0,2	23,8 ±2,6

TABELA 10 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SHF PARA O BIN.

Tempo (h)	Consumo de glucose (g L ⁻¹)			Produção de etanol (g L ⁻¹)		
	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄
0	57,8 ±1,4	54,9 ±0,	46,5 ±0,5	0,3 ±0,1	0,8 ±0,8	0,3 ±0,1
3	46,9 ±0,7	46,3 ±2,1	39,4 ±0,2	3,3 ±0,4	3,8 ±0,7	2,9 ±0,2
6	31,5 ±0,2	30,5 ±0,6	26,1 ±0,7	11,0 ±0,5	11,8 ±0,1	8,9 ±0,1
12	0,7 ±0,3	0,5 ±0,1	0,7 ±0,4	25,7 ±0,3	25,9 ±0,8	20,4 ±0,1
20	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1	0,3 ±0,1	25,7 ±1,0	25,2 ±0,3	20,4 ±0,9
24	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1	0,3 ±0,1	25,2 ±1,3	24,9 ±2,8	20,1 ±0,9

Os valores destas tabelas estão representados na forma de gráfico na FIGURA 25. No final do processo, diferentes concentrações de etanol foram obtidas, sendo que a produção variou entre 24-27 g L⁻¹ para as amostras pré-tratadas do BLE, e de 20-25 g L⁻¹ para as amostras pré-tratadas do BIN. Em todos

os ensaios foi possível observar que toda a glucose foi consumida a partir de 12 h, sugerindo que o processo possa ser finalizado neste tempo. Para as amostras pré-tratadas por auto-hidrólise houve uma pequena diferença na concentração final de etanol, enquanto que, para o substrato pré-tratado por catálise fosfórica, os resultados foram bem semelhantes. Entretanto, uma diferença significativa foi observada para o substrato pré-tratado por catálise sulfúrica, que pode ser parcialmente atribuída à menor concentração de glucose no hidrolisado.

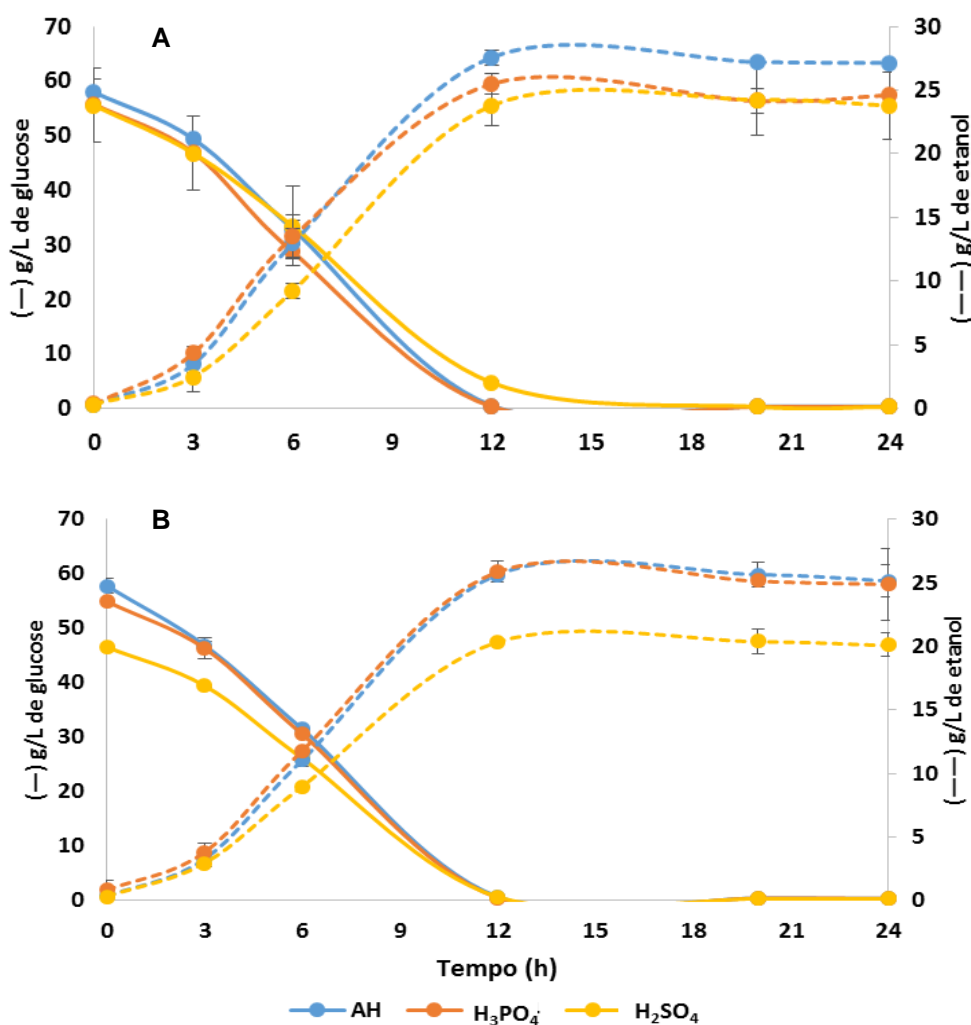


FIGURA 25 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL PARA O BLE (A) E BIN (B) NO ENSAIO DE SHF. AH – AUTO-HIDRÓLISE ; H₃PO₄ – CATÁLISE FOSFÓRICA; H₂SO₄ – CATÁLISE SULFÚRICA.

Santos *et al.* (2010) realizaram a etapa de hidrólise de amostras de bagaço explodido a vapor (200 °C por 7 min) lavado com água a partir das seguintes condições: 30 FPU g⁻¹ da enzima Celluclast 1,5L suplementada com β-glucosidase Novozym 188 e 8% de sólidos totais. Posteriormente, o hidrolisado foi

fermentado a 30 °C por 48 h usando 1 g L⁻¹ de *S. cerevisiae*. Apesar de usar uma carga enzimática maior, este processo resultou em uma produção de 6 g L⁻¹ de etanol, valor este inferior aos 20-27 g L⁻¹ encontrados para as amostras de BT_{FIL}. Este dados sugerem que os hidrolisados de Santos *et al.* (2010) apresentaram concentração inferior de glucose, quando comparados aos valores deste trabalho, possivelmente devido ao fato de que a Cellic CTec2 é um preparado desenvolvido especificamente para a sacarificação de matérias lignocelulósicos, ao passo que a mistura Celluclast/Novozym foi desenvolvido para a indústria de alimentos. No entanto, é preciso considerar que o teor de sólidos totais empregado na hidrólise enzimática por Santos *et al.* (2010) foi de apenas dois terços do empregado no presente trabalho.

A fração BT_{FIL} também foi submetida a um processo de SSF, onde a enzima e a levedura foram adicionadas simultaneamente ao substrato sólido utilizando a mesma carga enzimática do processo de SHF. As TABELAS 11 e 12 apresentam os valores referentes ao consumo de glucose e produção de etanol para o BLE e BIN, respectivamente.

Os valores destas tabelas estão representados na forma de gráfico na FIGURA 26. Em geral, não foram observadas diferenças significativas entre o BIN e o BLE, sendo que, neste caso, a produção de etanol variou de 15 a 18 g L⁻¹. A maior concentração de glucose foi observada no início da reação e estes foram rapidamente consumidos pelas leveduras, levando a valores de aproximadamente 1 g L⁻¹ no final da reação (48 h). Também pode-se observar que, nas horas iniciais do processo, a enzima produz uma certa quantidade de glucose que depois decresce até o final. A maior concentração de glucose nas primeiras horas do ensaio se deve ao fato da levedura ainda não ter iniciado o processo de fermentação, sendo que a partir do tempo de 12 h, a produção de etanol aumentou de modo bem semelhante para todas as amostras.

Pitarelo (2013) realizou experimentos de SSF com bagaços de cana pré-tratados por explosão a vapor (195 °C por 7,5 min) com e sem catálise fosfórica (9,5 mg g⁻¹ de substrato). Estas condições foram semelhantes às utilizadas neste trabalho, exceto o tempo de ensaio, que foi de 96 h. Seus resultados foram de 17 e 21 g L⁻¹ de etanol para auto-hidrólise e catálise fosfórica, respectivamente. Em relação à catálise fosfórica, a produção de etanol foi superior aos 16 g L⁻¹ obtidos neste trabalho e esta diferença de 2 g L⁻¹ pode ser atribuída ao tempo de

realização do ensaio. Entretanto, no caso do bagaço obtido por auto-hidrólise, os resultados foram semelhantes, demonstrando que não há necessidade de se realizar um ensaio com mais 48 h para obter a mesma concentração de etanol.

TABELA 11 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF PARA O BLE.

Tempo (h)	Consumo de glucose (g L ⁻¹)			Produção de etanol (g L ⁻¹)		
	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄
0	1,5 ±0,1	3,4 ±1,1	3,4 ±0,2	0	0	0
3	5,9 ±1,1	6,1 ±0,5	5,8 ±0,1	0,3 ±0,1	0,4 ±0,3	0,4 ±0,1
6	4,3 ±1,1	5,5 ±2,2	4,8 ±0,9	1,3 ±0,9	1,8 ±1,1	2,1 ±0,3
12	1,1 ±0,3	0,7 ±0,2	0,6 ±0,1	5,9 ±0,1	5,9 ±0,7	6,4 ±0,3
24	1,3 ±0,1	1,2 ±0,3	1,3 ±0,2	12,1 ±0,3	9,4 ±0,3	10,5 ±0,7
36	0,8 ±0,1	0,7 ±0,1	0,7 ±0,1	14,6 ±0,2	12,1 ±1,5	13,4 ±0,5
48	1,0 ±0,1	0,8 ±0,1	0,8 ±0,1	18,3 ±0,9	15,0 ±1,7	16,7 ±0,9

TABELA 12 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL POR SSF PARA O BIN.

Tempo (h)	Consumo de glucose (g L ⁻¹)			Produção de etanol (g L ⁻¹)		
	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄	AH	H ₃ PO ₄	H ₂ SO ₄
0	2,6 ±0,1	2,9 ±0,5	3,22 ±0,2	0	0	0,6 ±0,8
3	5,6 ±0,	5,7 ±0,1	4,96 ±1,3	0,4 ±0,1	0,4 ±0,3	3,0 ±3,6
6	5,3 ±0,9	4,3 ±1,5	4,25 ±0,6	2,1 ±0,7	1,9 ±1,2	1,8 ±1,0
12	1,2 ±0,3	0,8 ±0,3	0,56 ±0,1	6,2 ±0,9	6,5 ±0,9	6,7 ±0,1
24	1,1 ±0,1	1,2 ±0,2	1,54 ±0,7	10,8 ±3,2	10,5 ±1,1	11,1 ±0,3
36	0,8 ±0,1	0,7 ±0,1	0,73 ±0,1	14,9 ±1,2	13,4 ±1,5	14,9 ±0,1
48	0,9 ±0,1	0,9 ±0,2	0,82 ±0,1	18,8 ±0,3	16,9 ±1,9	18,4 ±0,4

Santos *et al.* (2010) também realizaram o processo de SSF em amostras de bagaço explodido a vapor (200 °C por 7 min) sem e com pré-sacarificação a partir das seguintes condições: 30 FPU g⁻¹ da enzima Celluclast 1,5 L suplementada com a β-glucosidase Novozym 188, 8% de sólidos totais, 1 g L⁻¹ de *S. cerevisiae* a 32 °C por 72 h, sendo que, no procedimento com pré-sacarificação a levedura foi adicionada depois de 12 h do início do processo. O rendimento obtido para o processo de SSF sem a etapa de pré-sacarificação foi de 12 g L⁻¹ de etanol, enquanto que, para a etapa com pré-sacarificação foi obtida uma concentração de 11 g L⁻¹, demonstrando que não houve a necessidade desta etapa inicial. Além do mais o presente trabalho apresentou resultados maiores

com um menor tempo de processo.

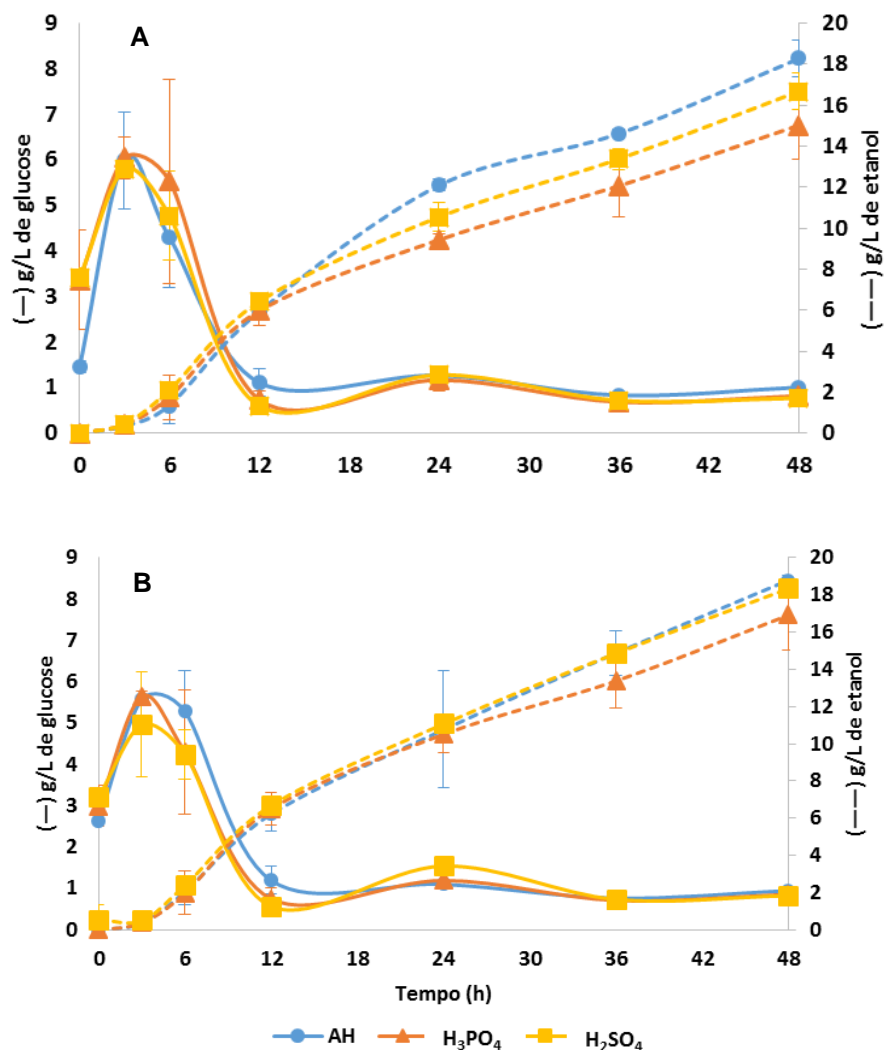


FIGURA 26 – CONSUMO DE GLUCOSE E PRODUÇÃO DE ETANOL PARA O BLE (A) E BIN (B) NO ENSAIO DE SSF. AH – AUTO-HIDRÓLISE ; H₃PO₄ – CATÁLISE FOSFÓRICA; H₂SO₄ – CATÁLISE SULFÚRICA.

Os ensaios de SHF produziram maiores concentrações de etanol do que os ensaios de SSF e isto pode ser correlacionado com condições de temperatura ótimas utilizadas para cada etapa dos ensaios de SHF, o que não ocorreu nos ensaios de SSF. No entanto, tais resultados também podem ser atribuídos à influência da lignina sobre os ensaios de SSF.

TABELA 13 – RENDIMENTO, EFICIÊNCIA E PRODUTIVIDADE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO POR SHF.

Amostra		Glc (g) ¹	Etanol teórico (g)	Etanol prático (g)	Y _{EG} (%) ²	Y _{PT} (%) ³	Produtividade (g L h ⁻¹)
BLE	AH	1,16	0,59	0,54	46,72	91,62	1,13
	H ₃ PO ₄	1,12	0,57	0,49	43,93	86,13	1,03
	H ₂ SO ₄	1,12	0,57	0,48	42,50	83,33	0,99
BIN	AH	1,16	0,59	0,50	43,45	85,19	1,05
	H ₃ PO ₄	1,10	0,56	0,50	45,27	88,77	1,04
	H ₂ SO ₄	0,94	0,48	0,40	42,77	83,85	0,84

¹ Quantidade de glucose em 20 mL de hidrolisado enzimático

² Rendimento da fermentação em g etanol produzido g⁻¹ glucose

³ Eficiência da fermentação em g etanol produzido g⁻¹ etanol teórico

TABELA 14 – RENDIMENTO, EFICIÊNCIA E PRODUTIVIDADE DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO POR SSF.

Amostra		Glc (g) ¹	Etanol teórico (g)	Etanol prático (g)	Y _{EG} (%) ²	Y _{PT} (%) ³	Produtividade (g L h ⁻¹)
BLE	AH	7,30	3,72	1,83	25,07	49,15	0,38
	H ₃ PO ₄	6,20	3,16	1,50	24,19	47,44	0,31
	H ₂ SO ₄	5,80	2,96	1,67	28,79	56,46	0,35
BIN	AH	6,60	3,37	1,88	28,48	55,85	0,39
	H ₃ PO ₄	6,40	3,26	1,69	26,41	51,78	0,35
	H ₂ SO ₄	5,80	2,96	1,84	31,72	62,20	0,38

¹ Quantidade de glucose em 12% de sólidos totais

² Rendimento da fermentação em g etanol produzido g⁻¹ glucose

³ Eficiência da fermentação em g etanol produzido g⁻¹ etanol teórico

As TABELAS 13 e 14 apresentam uma avaliação comparativa dos rendimentos obtidos para cada procedimento de fermentação. O rendimento da fermentação faz uma correlação entre a concentração de etanol produzido e a concentração de glucose presente nos hidrolisados (SHF) ou nos sólidos totais (SSF). No caso dos ensaios de SHF foi possível observar que o rendimento entre as amostras pré-tratadas do BLE e do BIN variaram entre 42,5 e 46,7%, que corresponde uma eficiência de 83,3 a 91,6% de acordo com a estequiometria da reação. Porém, o rendimento dos ensaios de SSF foi de apenas 24,2 a 31,7%, revelando eficiências de fermentação muito inferiores aos experimentos de SHF. Como ambos os ensaios apresentaram consumo total de glucose, parte desta foi provavelmente consumida pela levedura para sua fase de crescimento.

Recentemente, Santos *et al.* (2012) realizaram ensaios de sacarificação e fermentação simultâneas utilizando uma preparação enzimática de 10 FPU g⁻¹ de substrato (Celucast 1,5L) suplementado com 5% de β -glucosidases (Novozym 188) e 1 g L⁻¹ *S. cerevisiae* a 37 °C por 30 h. O ensaios foram realizados em amostras de bagaço de cana produzidas por explosão a vapor a 200 °C por 7 min. Estes autores obtiveram rendimentos de 98%, valor este superior aos obtidos no presente trabalho. Isto pode ser justificado devido a utilização de uma carga enzimática duas vezes maior, proporcionado uma maior concentração de unidades de glucose passíveis de fermentação. Por outro lado, Rudolf *et al.* (2008) obtiveram concentração final de etanol de 26,7% ao realizarem experimentos de SSF com o bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor empregando 7,5% de sólidos totais e *S. cerevisiae*.

Como ocorrem perdas durante o processo de produção do etanol celulósico, tal fato deve ser levado em consideração para se conhecer a real eficiência do processo como um todo. Assim, a FIGURA 27 apresenta a eficiência global do processo para o procedimento de SSF, onde também se levou em consideração o quanto de glucose foi recuperada após cada etapa de pré-tratamento em relação ao material de origem. Já no caso dos experimentos de SHF, foram levados em consideração o percentual de liberação de equivalentes de glucose na etapa de hidrólise e a eficiência da etapa de fermentação.

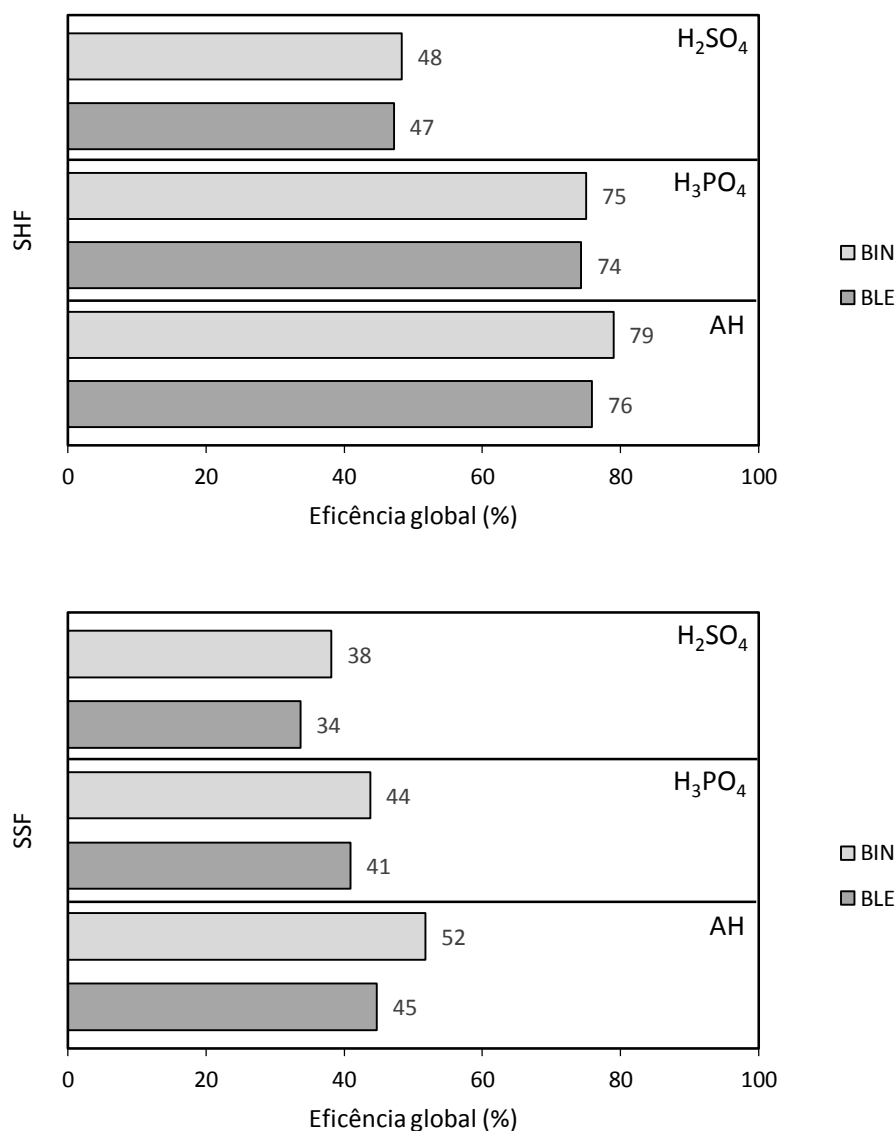


FIGURA 27 – EFICIÊNCIA GLOBAL PARA O PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO CONSIDERANDO AS PERDAS DE GLUCOSE.

Quando se leva em consideração as perdas durante o processo, é visível que o processo de SHF se sobressai diante do processo de SSF, reforçando a idéia de que apesar de maior o custo em relação aos equipamentos utilizados no SHF, as enzimas e a levedura apresentaram melhores rendimentos quando trabalhando em suas condições ótimas. Nos ensaios de SHF, comparando as amostras BIN e BLE para cada tipo de pré-tratamento, o material pré-tratado por auto-hidrólise apresentou maior eficiência, seguida da catálise fosfórica. Já o material obtido por catálise sulfúrica apresentou a menor eficiência, mesmo com uma conversão de 95% durante a hidrólise enzimática, e isto é reflexo da baixa

recuperação de glucose durante o pré-tratamento, que foi de 32% a menos em relação aos substratos pré-tratados por auto-hidrólise e catálise fosfórica. A baixa eficiência utilizando a catálise sulfúrica durante o pré-tratamento também foi observado quando realizado os ensaios de SSF, onde novamente o substrato pré-tratado por auto-hidrólise apresentou maior eficiência e, quando comparados o BIN e o BLE para auto-hidrólise, o BIN tem maior eficiência seja para os ensaios de SHF ou de SSF.

5. Conclusão

A extração etanólica do bagaço de cana removeu 50% de seu teor de extraíveis totais e 80% de seu teor de extraíveis em solventes orgânicos. Experimentos de explosão a vapor foram então realizados com o bagaço *in natura* (BIN) e com o material previamente extraído com etanol (BLE). Dentre os tipos de pré-tratamentos utilizados, a explosão a vapor por auto-hidrólise foi o que apresentou melhor rendimento de recuperação dos principais componentes presentes na biomassa para os dois tipos de bagaço. Neste sentido, os altos rendimentos de recuperação de glucose foram particularmente importantes para atender aos objetivos deste estudo.

Os pré-tratamentos por explosão a vapor forneceram rendimentos de hidrólise enzimática superiores a 90% a partir de 72 h para os diferentes pré-tratamentos, mesmo utilizando baixa carga enzimática quando comparada à literatura. Os substratos produzidos por catálise ácida apresentaram rendimentos de sacarificação semelhantes quando comparado os tipos de bagaços utilizados. Já para a auto-hidrólise, o BIN apresentou um melhor resultado.

Com relação aos processos de fermentação, os melhores rendimentos foram obtidos para a hidrólise e fermentação em separado (SHF) porque, neste processo, as enzimas e a levedura atuam em condições ótimas de temperatura e pH. No caso do SSF, é importante ressaltar que os experimentos foram realizados sem pré-hidrólise e que a ação enzimática se deu em uma condição abaixo de sua temperatura ótima.

Uma alternativa para avaliar a eficiência de cada tipo de ensaio é quando se leva em consideração as possíveis perdas durante cada etapa. Deste modo, para os ensaios de SHF, a elevada recuperação de glucose após o pré-tratamento e a conversão acima de 90% na hidrólise enzimática permitiram alcançar um rendimento global de fermentação de 74-75% para BIN ou BLE pré-tratado por auto-hidrólise e catálise fosfórica. Entretanto, a catálise sulfúrica, apesar de ter alcançado uma conversão de 95% na hidrólise enzimática, gerou rendimentos globais muito inferiores porque a recuperação de glucose após o pré-tratamento foi muito baixa.

Com base nos experimentos realizados neste estudo, envolvendo pré-tratamento por explosão a vapor ácido-catalisada ou não (auto-hidrólise), hidrólise

enzimática com Cellic CTec2 e fermentação com Thermosac Dry (*S. cerevisiae*) nas configurações SHF e SSF, conclui-se que a presença de extraíveis nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar não causou nenhum efeito inibitório sobre a produção de etanol celulósico.

Finalmente, a aplicação da cromatografia bidimensional abrangente com detecção de massas (GCxGC/TOFMS) para a determinação da composição química do extrato etanólico de bagaço de cana revelou a presença de uma diversidade de hidrocarbonetos, ésteres e ácidos graxos, compostos fenólicos, cetonas e aldeídos cuja caracterização é ainda inédita na literatura.

6. Referências Bibliográficas

- ABOLHOSSEINI, S.; HESHMATI, A.; The main support mechanisms to finance renewable energy development. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v 40, 2014, p. 879-885.
- AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H. L.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P.; Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam exploded sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 147, 2013, p. 416-423.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M. J.; NEGRO, M. J.; Pretreatment Technologies for an eficiente bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresource Technology, v. 101, 2010, p. 4851-4861.
- AMIRI, H.; KARIMI, K.; ZILOUEI, H.; Organosolv pretreatment of rice straw for efficient acetone, butanol and ethanol production. Bioresource Technology, v. 152, 2014, p. 450-456.
- AMORES, I.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; SÁEZ, F.; MICHELENA, G.; BALLESTEROS, M.; Ethanol production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion. Eletronic Journal of Energy & Environment, v. 1, 2013, p. 25-36.
- ARVANITI, E.; BJERRE, A. B.; SCHMIDT, J. E.; Wet oxidation pretreatment of rape straw for ethanol production. Biomass and bioenergy, v 39, 2012, p. 94-105.
- ATALA, R. H.; BRADY, J. W.; MATTHEWS, J. F.; DING, S-Y.; HIMMEL, M. E.; Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy. Michael Himmel (Editor), Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2008, p. 528.
- AZEVEDO, M. S.; SANTOS, R. V. O.; MAGALHÃES, T. V.; Produção de etanol no Brasil. Bolsista de valor: Revista de Divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense, 2ª Edição, ISSN: 2179-6971, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, 2012, p. 151-154.
- BACKLUND, I.; ARSHADI, M.; HUNT, A. J.; McELROY, C. R.; ATTARD, T. M.; BERGSTEN, U.; Extractive profiles of different lodgepole pine (*Pinus contorta*) fractions grown under a direct seeding-based silvicultural regime. Industrial Crops and Products, v. 58, 2014, p. 220-229.
- BALS, B.; MURNEN, H.; ALLEN, M.; DALE, B.; Ammonia fiber expansion (AFEX) treatment of eleven different forages: improvements to fiber digestibility *in vitro*. Animal Feed Science and Technology, v. 155, 2010, p. 147-155.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; CRUZ, M. P.; Composição química de extrativos lipofílicos e polares de madeira de *Eucalyptus grandis*. Ciência e Engenharia, v. 15, 2005, p. 13-20.
- BARCELOS, C. A.; BETANCUR, G. J. V.; MAEDA, R. N.; PEREIRA JR, N.; The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. Waste Biomass Valor, v. 4, 2013, p. 341-346.
- BAUDEL, H. M.; Pré-tratamento e hidrólise. Disponível em:

<<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Baudel%20Pr%C3%A9%20Tratamento%20e%20Hidr%C3%B3lise.pdf> >. Acesso em: 01 de mar. 2014.

- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S.; Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 36, 2014, p. 91-106.
- BENITES, V. M.; MENDONÇA, E. S.; SCHAEFER, C. E. R.; NETO, L. M.; Caracterização dos ácidos húmicos extraídos de um latossolo vermelho-amarelo e de um podzol por análise termodiferencial e pela espectroscopia de absorção no infravermelho. Revista Brasileira de Solos, v. 23, 1999, p. 543-551.
- BERNINI, R.; MINCIONE, E.; BARONTINI, M.; PROVENZANO, G.; SETTI, L.; Obtaining α -vinylphenols by decarboxylation of natural α -hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. Tetrahedron, v. 63, 2002, p. 9663-9667.
- BIAN, J.; PENG, F.; PENG, X-P.; XU, F.; SUN, R-C.; KENNEDY, J. F.; Isolation of hemicelluloses from sugarcane bagasse at different temperatures: Structure and properties. Carbohydrate Polymers, 2012, p. 638-645.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A.; Bioethanol production from rice straw: An overview. Bioresource Technology, v. 101, 2010, p.4767-4774.
- BORASTON, A.; BRAY, M.; BRUN, E.; CREAGH, A. L.; GILKES, N. R.; GUARNA, M. M.; JERVIS, E.; JOHNSON, P.; KORMOS, J.; MCINTOSH, L. The structure and function of cellulose binding Domains. In: Claeysens M, Nerinckx W, Piens K, editors. Carbohydrates from *Trichoderma reesei* and other microorganisms. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 1997, p.139–46.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F.; Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. Biochemical Engineering Journal, 2009, p. 199-204.
- BRINK, J. V. D.; VRIES, R. P.; Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 91, 2011, p. 1477-1492.
- BRUGNAGO, R. J.; SATYANARAYANA, K. G.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P.; The effect of steam explosion on the production of sugarcane bagasse/polyester composites. Composites: Parte A, 2011, p. 364-370.
- CABRERA, E.; MUÑOZ, M. J.; MARTÍN, R.; CARO, I.; CURBELO, C.; DÍAZ, A. B.; Alkaline and alkaline peroxide pretreatments at mild temperature to enhance enzymatic hydrolysis of rice hulls and straw. Bioresource Technology, v. 167, 2014, p. 1-7.
- CARA, C.; RUIZ, E.; BALESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E.; Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. Fuel, v. 87, 2008, p. 692-700.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C.; Production of bioethanol from

- sugarcane bagasse: Status and perspectives. Bioresource Technology, 101, 2010, p. 4754-4766.
- CARDONA, C. A.; SANCHEZ, O. J.; Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. Bioresource Technology, 98, 2007, p. 2415-2457.
- CARRASCO, C.; BAUDEL, H. M.;SENDELIUS, J.; MODIG, T.; ROSLANDE, C.; GALBE, M.; HAHN-HÄNGERDAL, B.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G.; SO₂-catalyzed pretreatment and fermentation of enzymatically hidroyzed sugarcane bagasse. Enzyme and Microbial Technology, v. 64, 2010, p. 64-73.
- CARVALHO, M. L.; Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2011, p. 18-23.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR. N.; Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. Química Nova, v. 33, 2010, p. 181-188.
- CASTRO, E.; MESA, L.; GONZÁLES, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; Preliminary evaluation of organosolv pretreatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 23 experimental design. Applied Energy, v. 87, nº 1, 2010, p. 109-114.
- CASTRO, E.; NIEVES, I. U.; MULLINNIX, M. T.; SAGUES, W. J.; HOFFMAN, R. W.; FERNÁNDEZ-SANDOVAL, M. T.; TIAN, Z.; ROCKWOOD, D. L.; TAMANG, B.; INGRAM, L. O.; Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. Applied Energy, v. 125, 2014, p. 76-83.
- CHEN, W.; TSAI, C.; LIN, C.; TSAI, P.; HWANG, W.; Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. Bioresource Technology, v. 128, 2013, p. 297-304.
- CORAL, D. del S. O.; Indicadores técnicos – econômicos das rotas termoquímicas e bioquímica para obtençãp de biocombustíveis utilizando bagaço de cana para as condições brasileiras. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Itajubá, 2009.
- COSTA, T. H. F.; MASARIN, F.; BONIFÁCIO, T. O.; MILAGRES, A. M. F.; FERRAZ, A.; The enzymatic recalcitrance of internodes of sugar cane hybrids with contrasting lignin contents. Industrial crops and products, v. 51, 2013, p. 202-211.
- DENCE, C. W.; LIN, S. Y.; Methods in Lignin Chemistry. New York: Springer Verlag, 1992.
- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P.; Método para a determinação de ácidos fenólicos na parede celular de forragens. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, 2002, p. 1634–1636.
- DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MANTELATTO, P. E.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R.; L BONOMI, A.; Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. Chemical Engineering Research and Design, v. 91, 2013, p. 1411-

1417.

- DONATE, P. M.; Síntese ambientalmente correta a partir da biomassa. Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 6, 2014, p. 101-117.
- ELIANA, C.; JORGE, R.; JUAN, P.; LUIS, R.; Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. Fuel, v. 118, 2014, p. 41-47.
- EI-SAYED, A. M.; HEPPELTHWAITE, V. J.; MANNING, L. M.; GIBB, A. R.; SUCKLING, D.M.; Volatile constituents of fermented sugar baits and their attraction to lepidopteran species. Journal of Agriculture Food Chemistry, v. 56, 2005, p. 953-958.
- ESTEVEES, P. J.; Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com H₂SO₄ diluído em reator piloto aquecido por vapor direto. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2011, p. 44.
- FENGEL, D.; WEGENER G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDEZ, M. P.; WATSON, P. A.; BREUIL, C.; Gas chromatography-mass, spectrometry method for the simultaneous determination of wood extractive compounds in quaking aspen. Journal of Chromatography, v. 922, 2001, p. 225-233.
- FERREIRA-LEITÃO, V.; PERRONE, C C.; RODRIGUES, J. FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G.; Na approach to the utilization of CO₂ as impregnating agent in stem pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. Biotechnology for biofuels, v. 3, 2010, p. 2-8.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. Journal of Food Engineering, v.74, 2006, p.78-88.
- GAO, D. CHUNDAWAT, S. P. S.; KRISHNAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.; Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. Bioresource Technology. v. 101, nº 8, 2010a, p. 2770-2781.
- GAO, M.; XU, F.; LI, S.; JI, X.; CHEN, S.; ZHANG, D.; Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. Biosystems engineering, v. 106, 2010b, p. 470-475.
- GHOSE, T.K.; Measurement of Cellulase Activities. Pure and Applied Chemistry, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, B.; Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. Bioresource Technology, v. 101, 2010, p. 4775-4800.
- GOLDEMBERG, J.; Biomassa e energia. Química Nova, v. 32, 2009, p. 582-587.
- GÓMEZ, S. M. R.; ANDRADE, R. R.; SANTANDER C. G.; COSTA, A. C.; MACIEL, F. R.; Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. In: Second international conference on industrial biotechnology, 2010. Padua, Italy.

- GOMES, J. L.; Caracterização da conversão metabólica de ácidos fenólicos em fenóis voláteis por *Brettanomyces/Dekkera*. Tese de doutorado. Universidade Católica Portuguesa, 2012.
- GONÇALVEZ, D. L.; Produção de álcool combustível a partir de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar por leveduras industriais e leveduras fermentadoras de xilose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2010, p. 12-13, 15-16, 20-23.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; Validação da metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, v. 32, 2009, p. 1500-1503.
- HAGMAN, J.; HEDBORN, L.; ISGREN, M.; LARSSON, E.; MARTENSSON, P.; Comparison of pretreatments for ethanol production from softwood. Trabalho de conclusão de curso do Department of chemical engineering, University Lund, 2012.
- HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G. V.; FAAIJ, A. PC.; Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-, and long term. Biomass and Bioenergy, v. 28, 2005, p. 384-410.
- HAWINKS, G. M.; DORAN-PETERSON, J.; A strain of *Saccharomyces cerevisiae* involved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentration and in the presence of inhibitory compounds. Biotechnonology for biofuels, v. 2, 2011, p. 2-14.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G.; Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 100, 2009, p. 10-18.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉZAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R.; Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. Bioresource Technology, v. 100, 2009, p. 1238-1245.
- HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. In: HIGUTCHI, T. Biosynthesis and biodegradation of Wood Components. London: Academic Press, 1985, p.557-577.
- HILLIS, W. E.; Formation and properties of some wood extractives. Phytochemistry, vol.11, 1972, p. 1207-1218.
- HUANG, H.; GUO, X.; LI, D.; LIU, M.; WU, J.; REN, H.; Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol improvement of fermentation at high pH and high total solids. Bioresource technology, v. 102, 2011, p. 7486-7499.
- INOUE, H.; HIDENO, A.; TSUKAHARA, K. FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S.; Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. Bioresource Technology. v. 100, n° 10, 2009, p. 2706-2711.
- INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA EM 2013. Brasil vai produzir etanol celulósico em 2015. Disponível em: <http://www.inctdobioetanol.com.br/not->

- art/7/Brasil%20vai%20produzir%20etanol%20de%20segunda%20gera%C3%A7%C3%A3o%20em%202014. Acesso em 08 de Setembro de 2014.
- ISHOLA, M. M.; ISROI; TAHERZADEH, M. J.; Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit brunches (OPEFB). Bioresource Technology, v. 165, 2014, p. 9-12.
- KASHANINEJAD, M.; TABIL, L. G.; Effect of microwave-chemical pre-treatment of compression characteristics of biomass grinds. Biosystems Engineering, v. 108, 2011, p. 36-45.
- KILULYA, K. F.; MSAGATI, T. A. M.; MAMBA, B. B.; NGILA, J. C.; BUSH, T.; Effect of site, species and tree size on the quantitative variation of lipophilic extractives in *Eucalyptus* woods used for pulping in South Africa. Industrial Crops and Products, vol. 56, 2014, p. 166-174.
- KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A.; Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. Chem Inform, v. 36, 2005, p. 36.
- KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S.; Química da Madeira. Universidade Federal do Paraná, 3ª edição revisada. Curitiba, 2005, p. 26.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR. M. J.; LYND, L. R.; A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresource Technology, v. 81, 2002, p. 33-44.
- LAURICHESSE, S.; AVÉROUS, L.; Chemical modification of lignins: towards biobased polymers. Progress in Polymer Science, v. 39, 2014, p. 1266-1290.
- LIMA, L. H. F.; SERPA, V. I.; ROSSETO, F. R.; SARTORI, G. R.; OLIVEIRA NETO, M.; MARTÍNEZ, L.; POLIKARPOV, I.; Small-angle X-ray scattering and structural modeling of full-length: cellobiohydrolase I from *Trichoderma harzianum*. Springer, v. 20, 2013, p.1573-1585.
- LINDE, M.; JAKOBSSON, E.; GALVE, M.; ZACCHI, G.; Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. Biomass and Bioenergy, v.32, 2008, p. 326-332.
- LINDEDAM, J.; BRUUN, S. JORGENSEN, H.; FELBY, C.; MAGID, J.; Cellulosic ethanol: interactions between cultivar and enzyme loading in wheat straw processing. Biotechnology for biofuels, v. 3, 2010, p. 1-10.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M.; Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Química Nova, v. 27, 2004, p. 670-673.
- LYND, L. R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S.; Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology Molecular Biology, v. 66, 2002, p. 506-577.
- MA, F.; YANG, NA.; XU, C.; YU, H.; WU, J.; ZHANG, X.; Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. Bioresource Technology, v. 101, 2010, p. 9600-9604.

- MARABEZI, K.; Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2009.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B. and THOMSEN, A. B.; Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. Enzyme and Microbial Technology. v. 40, nº 3, 2007, p. 426-432.
- MARTÍN-SAMPEDRO, R.; EUGENIO, M. E.; GARCÍA, J. C.; LOPEZ, F.; VILLAR, J. C.; DIAZ, M. J.; Steam explosion and enzymatic pre-treatments as an approach to improve the enzymatic hydrolysis of *Eucalypts globulus*. Bioamss and Bioenergy, v. 42, 2013, p. 97-106.
- MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; XAVIER, C. E. O.; KULAY, L. A.; DONKE, C. G.; MATSUURA, M. I. S. F.; RAMOS, N. P.; MORANDI, M. A. B.; BONOMI, A.; CAPITANI, D. H. D.; CHAGAS, M. F.; CAVALETT, O.; GOUVÊIA, V. L. R.; A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. Revista do BNDS, v. 41, 2014, p. 148-208.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M.; Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 27, 2013, p. 77-93.
- MORAIS, A. P. S.; BROETTO, F.; Pré-hidrólise ácida de bagaço d cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. Revista Energia na Agricultura, vol. 27, n. 4, 2012, p. 01-12.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C.; Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. Revista Árvore, v. 29, 2005, p. 461-470.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; Hidrólise enzimática de biomassa. Química Nova, vo. 33, no. 7, 2010, p. 1549-1558.
- OLIVEIRA, J. T. S.; SOUZA, L. C.; LUCIA, R. M. D.; SOUZA JÚNIOR, W. P.; Influência dos extrativos na resistência ao apodrecimento de seis espécies de madeira. Revista Árvore, v. 29, 2005, p. 819-826.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G.; A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. Biotechnology for Biofuel, v. 1, 2008, p. 1-14.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, v. 74, 2000, p. 25-33.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHIA, G.; The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Enzyme Microbiology Technology, v. 19, 1996, p. 470-476.
- PALONEN, H.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G.; TENKANEN, M.; Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam

- pretreated softwood and isolated lignin. Journal of Biotechnology, v. 107, 2004, p. 65–72.
- PAN, D. T.; TAN, C.; Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO₂ followed by alkaline hydrogen peroxide. Bioresource Technology, v. 167, 2014, p. 192-197.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.; Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 74, 2000, p. 69-80.
- PAPPAS, I. A.; KOUKOURA, Z.; TANANAKI, C.; GOULAS, C.; Effect of dilute acid pretreatment severity on the bioconversion efficiency of *Phalaris aquatic* L. lignocellulosic biomass into fermentable sugars. Bioresource Technology, v. 166, 2014, p. 395-402.
- PARK, N.; KIM, H.; KOO, B.; YEO, H.; CHOI, I.; Organosolv pretreatment with various catalysts for enhancing enzymatic hydrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). Bioresource Technology, v. 101, 2010, p. 7046-7063.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; Introdução à espectroscopia. Cengage learning, 4ª Edição, 2010, p.15-98.
- PÉREZ, J. A.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; SÁEZ, F.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; Optimizing liquid hot water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. Fuel, v. 87, 2008, p. 3640-3647.
- PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K.; Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. Biomass and Bioenergy, v. 58, 2013, p. 390-405.
- PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; Isolamento e análise estrutural de lignina. Química Nova, v. 5, 1993, p. 435-448.
- PITARELO, A. P.; DA SILVA, T. A.; PERALTA-ZAMOURA, P. G.; RAMOS, L. P.; Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova, vol. 35, no. 8, 2012, p. 1509-1509.
- 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. Universidade Federal do Paraná, 2007.
- PITARELO, A. P.; Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- PITARELO, A. P.; SZCZERBOWSKI, D.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P.; NDIAYE, P. M.; Efeito da catálise fosfórica sobre o pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática do bagaço de cana. Dossiê de pesquisa: Fontes renováveis. Organização de Thulio Cícero Guimarães Pereira – Curitiba: Copel, 2010, p. 163-182.
- PORTAL DA ÚNICA. Associadas da ÚNICA mais próximas de produzir etanol

- celulósico. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/2981091792031156797/associadas-da-unica-mais-proximas-de-produzir-etanol-celulosico/>. Acesso 08 de Setembro de 2014a.
- PORTAL DA ÚNICA. Quatro usinas inauguram era do etanol celulósico em escala comercial nos EUA. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/17629673920340056365/quatro-usinas-inauguram-era-do-etanol-celulosico-em-escala-comercial-nos-eua/>. Acesso em 08 de Setembro de 2014b.
- QIU, Z.; AITA, G. M.; WALKER, M. S.; Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. *Bioresource Technology*. v.117, 2012, p. 251-256.
- RABELO, S. C.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C.; Alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol. *Fuel*, v. 136, 2014, p. 340-357.
- RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D.; Enzymatic saccharification of cellulosic materials. In: *Methods in Biotechnology: Environmental Biology: Methods in Protocols*, Spencer, J. F. T.; Spencer, A. L. R.; eds. London: Humana Press, 2004, p. 221-235.
- RAMOS, L. P.; Steam pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* chips. Tese de Doutorado, Universidade de Ottawa, Ontario, Canada, 1992. 215 p.
- RAMOS, L. P.; The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, 2003, p.863-871.
- RAMUSSEN, H.; SORENSEN, H. R.; MEYER, A. S.; Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms. *Carbohydrates research*, v. 385, 2014, 45-47.
- RIBEIRO, M. A.; OIKAWA, H.; MORI, M. N.; NAPOLITANO, C. M.; DUARTE, C. I.; Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 84, 2013, p. 115-118.
- RIBEIRO, P. R.; CARVALHO, J. R. M.; GERIS, R.; QUEIROZ, V.; FASCIO, M.; Furfural – da biomassa ao laboratório de química orgânica. *Química nova*, v. 35, 2012, p. 1046-1051.
- ROCHA, C. F. da; Avaliação da viabilidade da bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar em metano por meio da digestão anaeróbia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande-PB, 2011, p. 27.
- ROCHA, G. J. M.; GONÇALVEZ, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSEL, C. E.V.; Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 35, 2012b, 274-279.
- ROCHA, G. J. M.; MARTÍN, C.; SILVA, V. F. N.; GÓMEZ, E. O.; GONÇALVEZ, A. R.; Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. *Bioresource Technology*, v. 111,

- 2012a, p. 447-452.
- ROCHA, G. J.; NASCIMENTO, V. M.; SILVA, V. F. N.; CORSO, D. L. S.; GONÇALVES, A. R.; Contributing to the environmental sustainability of the second generation ethanol production: delignification of sugarcane bagasse with sodium hydroxide recycling. Industrial Crops and Products, v. 50, 2014, p. 63-68.
- ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F.; O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. Revista do BNDES, v. 32, 2009, p. 117-156.
- RUDOLF, A; BAUDEL, H; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B; LIDÉN, G; Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. Bioenergy, v. 4, 2008, p. 783-790.
- SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H. de.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; RESENDE, S. T.; Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. Química Nova, vol. 35, no. 5, 2012, p. 1004-1010.
- SANTOS, I. D.; Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2008, p. 17.
- SANTOS, J. R. A. de; GOUVEIA, E. R.; Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, vol. 11, n. 1, 2009, p. 27-33.
- SANTOS, J.R.; SOUTO-MAIOR, A.M.; GOUVEIA, E.R.; MARTÍN, C.; Comparação entre processos em SHF e SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Química Nova, v. 33, 2010, p. 904-908.
- SARTO, C.; SANSIGOLO, C. A.; Cinética da remoção dos extrativos da madeira de *Eucalyptus grandis* durante polpação kraf. Acta Scientiarum Technology, v. 32, 2010, p. 227-235.
- SASAKI, H.; OKUMURA, R.; ASAKAWA, A.; ASADA, C.; NAKAMURA, Y.; Production of D-lactic acid from sugarcane bagasse using steam-explosion. Journal of Physics: Conference Series, v. 352, 2012, p. 1-10.
- SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N.; Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. Appl Microbiol Biotechnol, v. 28, 1998, p. 398-403.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M.; Phenolics in food and nutraceuticals. Editora CRC, 1ª Edição, 2006.
- SHEN, F.; KUMAR, L.; HU, J.; SADDLER, J. N.; Evaluation of hemicellulose removal by xylanase and delignification on and SSF for bioethanol production with steam-pretreated substrates. Bioresource Technology, v. 102, 2011, p. 8445-8451.
- SHESHMANI, S.; Effects of extracives on some properties of bagasse/high density polupropylene composite. Carbohydrate Polymers, v. 94, 2013, p. 416-419.

- SILVA, O. G.; Produção de bioethanol de segunda geração a partir da biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S.; Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Bioresource Technology, v. 101, 2010b, 7402-7400.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUIUS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P.; The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. Biofuels in Brazil, Springer, 1ª Edição, 2014, p. 151-172.
- SILVÉRIO, F. O.; Caracterização de extrativos de madeira de *eucalyptus* e depósitos de *pitch* envolvidos na fabricação de celulose e papel. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas, 2008, p. 6-11.
- SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U.; Chemical Composition of Wood and Pulp: Basic Constituents and Their Distribution. In: Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D.; Determination of carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory Analytical Procedure: Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, 2008b.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; Determination of ash in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy Laboratory, 2008c.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; Determination of extractives in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42619. National Renewable Energy Laboratory, 2008a.
- SOARES, L. C. S. R.; Destoxificação biológica do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para utilização em processos fermentativos. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- SOCOL, P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHANLK, L.M.F.; FERRARA, M. A.; BON, E.P.S.; MORAES, L.M.P.; ARAÚJO, J.A.; TORRES, F.A.G.; Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. Bioresource Technology, v. 101, 2010, 4820-4825.
- SOLOMONS, T. W.; Química Orgânica, Editora LTC, 10ª Edição, vol. 1, 2012.
- SOUZA, C. J. A.; COSTA, D. A.; RODRIGUES, M. Q. R. B.; SANTOS, A. F.; LOPES, M. R.; ABRANTES, A. B. P.; COSA, P. S.; SILVEIRA, W. B.; PASSO, F. M. L.; FIETTO, L. G.; The influence of presaccharification, fermentation temperature and yeast strain on ethanol production from sugarcane bagasse. Bioresource Technology, v. 100, 2012, p. 63-69.
- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; BON, E. P. S.; Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strain. Journal of Scientific & Industrial Research,

- v. 67, 2008, p. 918-926.
- SUKUMARAN, R.K.; SINGHANIA, R.R.; MATHEW, G.M.; PANDEY.; Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelluloses saccharification for bio-ethanol production. Renewable Energy, v. 34, 2009, p. 421-424.
- SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C.; Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. Polymer degradation and stability, 2004, p. 331-339.
- SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G.; Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. Critical Reviews in Biotechnology, v. 17, 1997, p. 39-67.
- SWATLOSKI, R.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D.; Dissolution of cellulose with ionic liquids. Journal American Chemistry Society Communications, v. 124, 2002, p. 4974-4975.
- SZCZERBOWSKI, D. ; PITARELO, A. P.; ZANDONÁ FILHO, A. RAMOS, L. P.; Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. Carbohydrates Polymers, accepted manuscript 2014.
- TEIXEIRA, L. P. B.; CARNEIRO, R. A. F.; Bioetanol: novos rumos e os desafios de sua regulação. Bioenergia em Revista: Diálogo, n. 1, 2013, p. 59-72.
- TODORCIUC, T.; CAPRARU, A.; KRATOCHVÍLOVÁ, I.; POPA, V. I.; Characterization of non-wood lignin and its hydroxymethylated derivatives by spectroscopy and self-assembling investigations. Cellulose Chemistry Technology, v. 43, 2009, p. 399-408.
- TOQUERO, C.; BOLADO, S.; Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. Bioresource Technology, v. 157, 2014, p. 68-76.
- UNITED STATES OF DEPARTMENT OF AGRICULTURE, FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE (USD-FAS). World Fuel Ethanol Production. Disponível em: <http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production>. Acesso em 08 de Setembro de 2014.
- UPPUGUNDLA, N.; SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. PS.; YU, X.; SIMMONS, B.; SINGH, S.; GAO, X.; KUMAR, R.; WYMAN, C. Y.; DALE, B. E.; BALAN, V.; A comparative study of ethanol production using dilute acid, ionic liquid and AFEX pretreated corn stover. Biotechnology for biofuels, 2014, p. 1-14.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gas-liquid partition chromatography. Journal Chromatography A, v. 11, 1963, 463-47.1
- VAZ JR. S.; Biorrefinarias: Cenários e Perspectivas. Editora Embrapa Agroenergia, 1ª Edição, 2011, p. 45-81.
- VILELA, C.; SANTOS, S. A. O.; COELHO, D.; SILVA, A. M. S.; FREIRE, C. S. R.; NETO, C. P.; SILVESTRE, A. J. D.; Screening of lipophilic and phenolic extractives from different morphological parts of *Halimion portulacoides*. Industrial Cops and Products, v. 52, 2014, p. 373-379.
- WANDERLEY, M. C. A.; MARTÍN, C.; ROCHA, G. J. M.; GOUVEIA, E. R.;

- Increase in ethanol production from sugarcane based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology, v. 128, 2013, p. 448-453.
- WATANABE, I.; NAKAMURA, T.; SHIMA, J.; Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 110, 2010, p.176-179.
- WEERACHANCHAI, P.; LEE, J.; Recyclability of an ionic liquid for biomass pretreatment. Bioresource Technology, v. 160, 2014, p. 336-343.
- WIJAYA, Y. P.; PUTRA, R. D. D.; WIDYAYA, V. T.; HÁ, J.; SUH, D. J.; KIM, C. S.; Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 164, 2014, p. 221-231.
- WOLF, L. D.; Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- YU, Z.; YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rive hull. Bioresource Technology. v. 100, n° 2, 2009, p. 903-908.
- YUAN, D.;RAO, K.; RELUE, P.; VARANASI, S.; Fermentation of biomass sugars to ethanol using native industrial yeast strains. Bioresource Technology, v. 102, 2011, p. 3246-3253.
- ZENG, J.; TONG, Z.; WANG, L.; ZHHU, J. Y.; INGRAM, L.; Isolation and structural characterization of surgacane bagasse lignin after dilute phosphoric acid plus steam explosion pretreatment and its effect on cellulose hydrolysis. Bioresource Technology, v. 154, 2014, p. 274-281.
- ZHOU, S. WEIMER, P. J.; HATFIELD, R. D.; RUNG, T. M.; DIGMAN, M.; Improving ethanol production from alfalfa stems via ambient-temperature acid pretreatment and washing. Bioresource Technology, v. 120, 2014, p. 286-292.