

**ANA PAULA PITARELO**

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO BAGAÇO E DA PALHA DE  
CANA-DE-AÇÚCAR À BIOCONVERSÃO VIA PRÉ-TRATAMENTO A  
VAPOR E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

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

2007

A DEUS, pela força e a coragem de continuar nos momentos mais difíceis desta caminhada.

A meus pais, Paulo e Marta, aos meus irmãos Claudia, Débora, Paulo Henrique e Rafael, e aos meus sobrinhos, pelo apoio, confiança e compreensão.

“... nunca deixe que lhe digam que não vale a pena acreditar no sonho que se tem ou que seus planos nunca vão dar certo ou que você nunca vai ser alguém...”

Quem acredita sempre alcança...

Mais uma vez

Renato Russo e Flávio Venturini

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 BAGAÇO DE CANA.....	2
1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE MATÉRIAS LIGNOCELULÓSICOS.....	3
<b>1.2.1 Celulose.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2 Hemiceluloses .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.3 Lignina.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.4 Extraíveis.....</b>	<b>13</b>
1.4 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	14
1.5 PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.....	18
1.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	29
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1. MATERIAL .....	37
3.2. MÉTODOS.....	38
<b>3.2.1. Determinação do peso seco de materiais celulósicos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.2. Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.3. Determinação de Carboidratos Totais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.4. Determinação de Carboidratos Redutores.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.5. Extraíveis.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.6 Análise química do material celulósico pelo método de Klason.....</b>	<b>39</b>
3.2.6.1 Determinação do teor de lignina pelo método de Klason.....	40
3.2.6.2 Determinação dos teores de celulose e hemiceluloses .....	40
<b>3.2.7 Condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar .....</b>	<b>41</b>
3.2.7.1 Condições de Auto-hidrólise .....	42
3.2.7.2 Catalise Fosfórica .....	43
<b>3.2.8 Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor .....</b>	<b>45</b>

<b>3.2.9 Análise química das frações derivadas do processo de explosão a vapor</b> .....	47
3.2.9.1 Análise química da fração insolúvel em água .....	47
3.2.9.2 Análise cromatográfica da fração solúvel em água .....	47
3.2.9.3 Análise espectrofotométrica no ultravioleta da fração solúvel em água .....	48
<b>3.2.10 Determinação da Atividade Celulásica Total</b> .....	49
<b>3.2.11 Determinação da Atividade Celobiásica Total</b> .....	50
<b>3.2.12 Hidrólise Enzimática</b> .....	51
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR <i>IN NATURA</i> .....	54
4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	63
4.2.1 Planejamento fatorial associado à auto-hidrólise do bagaço de cana.....	65
4.2.2 Efeito do aumento do tempo de pré-tratamento sobre a auto-hidrólise do bagaço .....	82
4.2.3 Planejamento fatorial associado ao pré-tratamento por catálise fosfórica do bagaço de cana .....	88
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>6. TRABALHOS FUTUROS</b> .....	108
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	109

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Pereira Ramos, pela orientação, ensinamentos, compreensão, amizade, dedicação e paciência durante a elaboração deste trabalho.

Ao Mário Bratek, Thiago, Carolina, Swami e Bruno, pela ajuda, atenção e disponibilidade na execução dos pré-tratamentos no reator de explosão a vapor.

Ao Prof. Dr. Patrício Peralta-Zamora pela colaboração no desenvolvimento do planejamento fatorial.

À Destilaria Melhoramentos S/A, em especial, ao Sr. João Teodorinho, pelo fornecimento do bagaço e da palha de cana-de-açúcar utilizados neste trabalho.

À Novozymes Latin América (Araucária, PR), pelo fornecimento das preparações enzimáticas comerciais utilizadas neste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Caio, Carolina, Claudiney, Emir, Fabiano, Leonardo, Graciela, Heveline, Ricardo, Thiago, Swami, pelo apoio, amizade e companheirismo ao longo destes dois anos de trabalho.

A todos os amigos e colegas do Departamento de Química da UFPR, principalmente ao Alesandro, Daiane, Doumit, Ednéia, Erica, Leandro, Tiago e Alexandre. Amigos para toda a hora.

Aos amigos que não poderia esquecer de citar, Ângela, Ariana, Celso, Cida, Cristiane, Dani, Evandro, Fernanda, Fernando, Janaína, Luciane e Ricardo, pelo apoio e estímulo nos momentos de dificuldades.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química da UFPR e a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte integrante deste processo.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE (TÍMÁR-BALÁZSY E EASTOP, 1998).....	4
FIGURA 2 REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DA CELULOSE (MODIFICADO DE GARRET e GRISHAM, 1999).....	5
FIGURA 3 ASSOCIAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR. (1) CADEIA LINEAR DA CELULOSE, COM A INDICAÇÃO DE SUA UNIDADE ESTRUTURAL ; (2) ARRANJO DAS CADEIAS NA FIBRILA ELEMENTAR; (3) CRISTALITO; (4) SEÇÃO TRANSVERSAL DA MICROFIBRILA (RAMOS, 2003).....	7
FIGURA 4 MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES. D-GLUCOSE (1), D-GALACTOSE (2), L-ARABINOSE (3), D-XILOSE (4), D-MANOSE (5), 4- <i>O</i> -METIL-D-GLUCURÔNICO 6) E L-RAMNOSE (7) (SJÖSTRÖM, 1992).....	9
FIGURA 5 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA XILANA DE GRAMÍNEA. 1,4-D-XILOPIRANOSE (1); L-ARABINOFURANOSE (2); ÁCIDO 4- <i>O</i> -METIL- $\alpha$ -D-GLUCURÔNICO (3).....	11
FIGURA 6 ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992)...	12
FIGURA 7 ESTRUTURA DA LIGNINA DE <i>Fagus</i> sp (FENGEL E WEGENER, 1989).....	13
FIGURA 8 REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE HETEROXILANAS E DESIDRATAÇÃO DE PENTOSAS A FURFURAL E OUTROS PRODUTOS (FENGEL e WEGENER, 1989).	20
FIGURA 9 REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE GLUCANAS E DESIDRATAÇÃO DE HEXOSAS A HIDROXIMETILFURFURAL E OUTROS PRODUTOS (FENGEL e WEGENER, 1989).....	21
FIGURA 10 MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO DE <i>T. reesei</i> .....	30
FIGURA 11 ESPECTRO DE FTIR DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENO (ET) E ETANOL (EtOH) DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	58
FIGURA 12 ESPECTRO DE FTIR DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENO (ET) E ETANOL (EtOH) DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	59
FIGURA 13 CROMATOGRAMA DOS HIDROLISADOS DE KLASON DO BAGAÇO MECANIZADO (MEC), DO BAGAÇO MANUAL (MAN) E DA PALHA DE	

CANA-DE-AÇÚCAR, COM DETECÇÃO POR REFRACTOMETRIA DIFERENCIAL.....	62
FIGURA 14 PERFIL CROMATOGRÁFICO DO HIDROLISADO DE KLASON COM DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV EM 280 nm, COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) E FURFURAL (F).....	62
FIGURA 15 EXEMPLO TÍPICO DA EVOLUÇÃO DA TEMPERATURA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO BAGAÇO DE CANA NO REATOR.....	64
FIGURA 16 DIAGRAMA DE REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS RENDIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEIS (BES, A) E INSOLÚVEL (BEI, B) EM ÁGUA.....	68
FIGURA 17 ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DECORRENTE DO PROCESSO DE AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA: (A) SECO E (B) ÚMIDO.....	69
FIGURA 18 PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE PARA BAGAÇO SECO (A) E BAGAÇO ÚMIDO (B).....	70
FIGURA 19 PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE PARA O BAGAÇO SECO (A) E BAGAÇO ÚMIDO (B), OBTIDOS COM DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV.....	71
FIGURA 20 QUANTIDADE DE EQUIVALENTES DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OS SUBSTRATOS ORIGINADOS DO PRÉ-TRATAMENTO REALIZADAS PARA O BAGAÇO SECO AO AR (A) E BAGAÇO ÚMIDO (B).....	80
FIGURA 21 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO, OBTIDO COM DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) PARA EXPERIMENTOS REALIZADOS POR UM TEMPO DE RESIDÊNCIA DE 15 MIN.....	84
FIGURA 22 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO, OBTIDO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA (UV) PARA EXPERIMENTOS REALIZADOS POR UM TEMPO DE RESIDÊNCIA DE 15 MIN.....	84
FIGURA 23 QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR AUTO-HIDRÓLISE PELO TEMPO DE 15 MIN.....	87
FIGURA 24 DIAGRAMA DE REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS RENDIMENTOS OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEIS (BES, A) E INSOLÚVEL (BEI, B) AO LONGO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.....	92
FIGURA 25 PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS	



CATALISADOS POR ÁCIDO FOSFÓRICO, OBTIDOS COM DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (A) E DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV (B).....	95
FIGURA 26 ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA (BES) DERIVADOS DOS PROCESSOS DE EXPLOSÃO A VAPOR DO (A) BAGAÇO UMEDECIDO COM ÁGUA E DO (B) BAGAÇO IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	96
FIGURA 27 QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OS SUBSTRATOS ORIGINADOS DOS EXPERIMENTOS REALIZADAS COM A IMPREGNAÇÃO DO BAGAÇO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.	102

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 MATERIAIS E CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.....	23
TABELA 2 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> , DESENVOLVIDO PARA IDENTIFICAR AS MELHORES CONDIÇÕES DE AUTO-HIDRÓLISE DE AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA CONTENDO DIFERENTES TEORES DE UMIDADE.....	43
TABELA 3 PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>3</sup> , DESENVOLVIDO PARA IDENTIFICAR AS MELHORES CONDIÇÕES DE EXPLOSÃO A VAPOR DE AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA PREVIAMENTE IMPREGNADAS COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	44
TABELA 4 CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS, AÇÚCAR TOTAL E AÇÚCAR REDUTOR ENCONTRADOS NO BAGAÇO MECANIZADO E MANUAL POR SOLUBILIZAÇÃO COM ÁGUA QUENTE E ÁGUA FRIA.....	55
TABELA 5 PERCENTUAL DE COMPOSTOS EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO E DA PALHA.....	57
TABELA 6 PERCENTUAL MÁSSICO DOS COMPONENTES CONSTITUINTES DE AMOSTRAS SECAS E LIVRES DE EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO MECANIZADO. BAGAÇO MANUAL E DA PALHA DE CANA.....	61
TABELA 7 RENDIMENTOS OBTIDOS PARA A AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DA CANA, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO 2 <sup>3</sup> DESCRITO NA TABELA 2.....	66
TABELA 8 EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE DESCRITOS NA TABELA 2.....	67
TABELA 9 ANÁLISE QUANTITATIVA BASEADA NOS HIDROLISADOS SULFÚRICOS DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA (BES), PREPARADAS ATRAVÉS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.....	73
TABELA 10 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS EM ÁGUA (BEI), PREPARADAS ATRAVÉS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO. ....	75
TABELA 11 BALANÇO DE MASSA DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.....	77
TABELA 12 QUANTIDADES DE CELOBIOSE E XILOSE PRODUZIDAS PELA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR.....	81
TABELA 13 RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA SECO AO AR (8% DE UMIDADE) SOB O MESMO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO REATOR (15 MIN).....	83
TABELA 14 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS DERIVADOS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.....	86

TABELA 15 RENDIMENTOS OBTIDOS PARA A EXPLOSÃO A VAPOR COM CATÁLISE FOSFÓRICA DO BAGAÇO DE CANA, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO 2 <sup>3</sup> DESCRITO NA TABELA 3.....	90
TABELA 16 EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS EXPERIMENTOS DA TABELA 3 RELACIONADOS À EXPLOSÃO A VAPOR DE BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	91
TABELA 17 ANÁLISE QUANTITATIVA BASEADA NA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DOS HIDROLISADOS SULFÚRICOS DAS FRAÇÕES BES, PREPARADAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	94
TABELA 18 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS EM ÁGUA (BEI), PREPARADAS ATRAVÉS DA EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.....	98
TABELA 19 BALANÇO DE MASSA DO PRÉ-TRATAMENTO VIA CATÁLISE FOSFÓRICA.....	100
TABELA 20 QUANTIDADES DE CELOBIOSE E XILOSE PRODUZIDAS PELA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRODUZIDOS POR EXPLOSÃO A VAPOR VIA CATÁLISE FOSFÓRICA.....	105

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AnAra** = anidroarabinose

**AnGlc** = anidroglucose

**AnXyl** = anidroxilose

**AQ** = água quente

**Ara** = arabinose

**BEI** = fração insolúvel do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor

**BES** = fração solúvel do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor

**C** = concentração

**CBH** = celobiohidrolase

**CLAE** = cromatografia a líquido de alta eficiência

**DCM** = diclorometano

**EG** = endoglucanase

**ET** = etanol-tolueno 1:2 (v/v)

**EtOH** = etanol

**F** = furfural

**FTIR** = espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier

**Glc** = glucose

**GP** = grau de polimerização

**HMF** = hidroximetilfurfural

**MAN** = bagaço oriundo da colheita manual

**MEC** = bagaço oriundo da colheita mecanizada

**PCA** = ponto central do planejamento fatorial de auto-hidrólise

**PCF** = ponto central do planejamento fatorial de catálise fosfórica

**RID** = índice de refração

**SSF** = sacarificação e fermentação simultâneas

**TAPPI** = Associação Técnica das Indústrias de Papel e Celulose

**UFP/g** = unidades de papel de filtro por grama de substrato

**UV** = espectrofotometria de absorção no ultravioleta

**Xyl** = xilose

## RESUMO

A cana-de-açúcar constitui uma fonte de energia abundante e renovável. Além do aproveitamento de seu caldo para a produção de etanol e do emprego do bagaço para fins energéticos em processos de combustão e gaseificação, seus polissacarídeos constituintes (celulose e hemiceluloses) podem ser liberados por hidrólise ácida para serem fermentados a etanol e outros produtos químicos de maior valor agregado. No entanto, para obter uma conversão efetiva dos principais componentes da fitobiomassa, é necessário que os mesmos sejam separados de forma seletiva e eficiente. Há, portanto, a necessidade de se submeter a biomassa, na forma de bagaço, palhas ou materiais de menor granulometria, a um processo de pré-tratamento. Dos métodos de pré-tratamento até hoje estudados, a explosão a vapor tem se revelado um dos mais promissores para o fracionamento da fitobiomassa, paralelamente a um aumento significativo da susceptibilidade da celulose à sacarificação ácida ou enzimática.

Amostras de bagaço oriundas de colheita manual e mecanizada apresentaram composição química muito semelhante. Porém, a composição química da palha diferiu muito em relação aos bagaços, principalmente em relação ao teor de anidroglicose, lignina total e cinzas. Tais fatores desmotivaram a avaliação da palha da cana-de-açúcar como matéria-prima para bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.

A explosão a vapor do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada na ausência (auto-hidrólise) e na presença de ácido fosfórico como catalisador. Os experimentos de auto-hidrólise foram executados utilizando planejamentos fatoriais do tipo  $2^3$  cujas variáveis, em dois níveis, foram: umidade do bagaço de cana (8 e 50%, m/m), temperatura (195 e 210°C) e tempo de residência no reator (4 e 8 min). A explosão ácido-catalisada foi realizada nestas mesmas condições após impregnação do bagaço com solução diluída de ácido fosfórico, correspondente a 3,8 mg de ácido fosfórico/g de bagaço seco no limite superior do planejamento fatorial. Para avaliar a repetibilidade dos procedimentos experimentais realizados neste estudo, quatro pré-tratamentos foram efetuados no ponto central dos planejamentos fatoriais e os rendimentos derivados destas replicatas se caracterizaram por um desvio padrão relativo de apenas 1,65%.

Os parâmetros utilizados para avaliar a melhor condição de pré-tratamento corresponderam aos percentuais de recuperação da celulose e das hemiceluloses e ao aumento da acessibilidade à hidrólise enzimática dos substratos produzidos. Os experimentos de auto-hidrólise realizados com o bagaço seco ao ar (8% de umidade) mostraram-se mais vantajosos em relação ao bagaço umedecido (50% de umidade). Ao todo, foram realizados 12

experimentos independentes de auto-hidrólise, sendo que o substrato de maior acessibilidade foi obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana com 8% de umidade a 210°C por 8 min. Nesta condição, rendimentos praticamente quantitativos foram obtidos após 72 h de hidrólise enzimática do substrato, empregando 25 UPF/g de substrato seco (Celluclast 1.5L FG e Novozym 188, 10:3 vol/vol). Porém, a melhor condição para a recuperação de celulose (88%) e hemiceluloses (96%) foi obtida em menores tempos de residência no reator (210°C por 4 min). Este e outros resultados obtidos para o bagaço auto-hidrolisado demonstraram que os experimentos realizados em temperaturas maiores e tempos de residência menores favoreceram a recuperação dos principais componentes do bagaço de cana, celulose, hemicelulose e lignina.

Os experimentos realizados na presença de ácido fosfórico mostraram-se mais apropriados para a separação dos principais componentes do bagaço de cana, em comparação com os experimentos de auto-hidrólise. Todos os substratos derivados da catálise fosfórica apresentaram alta reatividade à hidrólise enzimática. O substrato que apresentou maior acessibilidade foi pré-tratado a 210°C por 4 min, de onde se obteve 100% de hidrólise do componente celulósico em 72 h de reação (carga enzimática 25 UPF/g substrato seco). Nesta mesma condição, também foram obtidos os maiores índices de recuperação de celulose (93%) e hemiceluloses (98%), em relação à composição química do bagaço não tratado. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o pré-tratamento associado à catálise fosfórica, além de recuperar os carboidratos presentes no bagaço de cana em rendimentos quantitativos, produz substratos com elevada reatividade à hidrólise enzimática, proporcionando rendimentos de sacarificação da celulose de até 80% em apenas 8 h de reação, fato que oferece grandes perspectivas para o sucesso das etapas subseqüentes de fermentação.

## ABSTRACT

Sugarcane is one of the most promising sources of renewable energy on Earth. Mature technologies are available for the production of ethanol from cane juices, pulp from cane fibers and energy from cane bagasse (cogeneration). Besides these applications, structural polysaccharides found in the cane bagasse may be acid or enzymatically hydrolysed to fermentable sugars, offering a new venue for the production of second-generation biofuels such as bioethanol from lignocellulosics. However, for the optimal conversion of cane polysaccharides to fuels and chemicals, a pretreatment method is required to open up the chemical association that exists among the main constituents of the plant cell wall, cellulose, hemicelluloses (polyoses) and lignin. Among the several pretreatment methods available to date, steam explosion is by far the most widely investigated. The current literature on biomass pretreatment indicates that steam explosion is one of the most efficient methods for fractionating a wide variety of lignocellulosic materials because high pretreatment yields are achieved and good substrates for hydrolysis are produced.

In this work, cane bagasse from both manual and mechanized harvesting were initially characterized and subsequently utilized as a raw material for steam explosion. Cane straw (mainly dry leaves) was also considered for the same purpose but its high ash and low cellulose contents were proved inadequate for bioethanol production. On the other hand, both bagasse samples displayed almost identical chemical compositions, indicating that the harvesting strategy would not be a critical factor for the utilization of this raw material for bioconversion.

Steam explosion was carried out in the absence (auto-hydrolysis) and in the presence (acid-catalysed steam explosion) of phosphoric acid as the main pretreatment catalyst. The auto-hydrolysis experiments were carried out based on a  $2^3$  factorial design with the following variables in two levels: bagasse moisture content (8 and 50 wt%), temperature (195 and 210°C) and residence time in the steam reactor (4 and 8 min). The acid-catalysed steam explosion of cane bagasse was also carried out under a similar range of pretreatment variables, with the exception that bagasse moisture content was replaced by two levels of phosphoric acid impregnation (zero and 3,8 mg  $H_3PO_4$ /g dry bagasse) of bagasse fibers with a 50 wt% moisture content. Four replicates were carried out at the center point of each factorial design to evaluate the repeatability of the overall experimental procedures. Pretreatment yields for these four replicates had a relative standard deviation of only 1.65%.



The best pretreatment conditions were defined as those in which the highest recovery yields of cellulose, hemicelluloses and lignin were achieved together with the greatest accessibility of the cellulose component to enzymatic hydrolysis. Experiments carried out with cane bagasse of low moisture content were more advantageous than those realized with cane bagasse of relatively high moisture content (50 wt%). The best auto-hydrolysis conditions for enzymatic hydrolysis were derived from pretreatment at 210°C for 8 min of cane bagasse with 8 wt% moisture content. Under these conditions, the cellulose content of water-washed steam-treated fibers was almost completely hydrolysed after 72 h using a total cellulase activity of 25 FPU/g dry bagasse (Celluclast 1.5L FG plus Novozym 188, 10:3 vol/vol). However, the best recovery yields of cell wall polysaccharides (88% of cellulose and 96% of hemicelluloses) were obtained at shorter residence times into the steam reactor (4 min at 210°C). These and other data indicated that high pressure steaming at short residence times are preferable than longer residence times at lower pretreatment temperatures for optimal performance.

The addition of phosphoric acid as an additional pretreatment catalyst enhanced the recovery yield of bagasse polysaccharides and improved the accessibility of the steam-treated fibers to enzymatic hydrolysis. The highest accessibility of water-washed steam-treated fibers was derived from the steam explosion of acid-impregnated cane bagasse at 210°C for 4 min. Nearly 100% of the cellulose component was hydrolysed in 72 h by the concerted action of fungal cellulases (25 FPU/g). Under these same conditions, the highest recovery yields of cell wall polysaccharides (93% of cellulose and 98% of hemicelluloses) were obtained in relation to the chemical composition of the original cane bagasse fibers. In general, we have clearly demonstrated that the association of phosphoric acid with steam explosion not only results in an almost quantitative recovery of cane polysaccharides in steam-treated fractions but also produces steam-treated fibers that are high amenable to enzymatic hydrolysis. These findings may represent a substantial addition to the present knowledge about bagasse pretreatment because nearly 80% of the cellulose component could be hydrolysed in only 8 h under the action of a relatively low enzyme loading.

## 1. INTRODUÇÃO

O aproveitamento de recursos renováveis representa importante atividade econômica para países em desenvolvimento. Porém, estes recursos, naturais e de grande potencial energético, não são explorados adequadamente como fonte de energia e de insumos para a indústria química. Também é fato que a expansão da fronteira agrícola vem sendo considerada como essencial para fomentar o desenvolvimento do mercado interno de produtos industrializados.

A maior fronteira para o desenvolvimento do mercado para produtos agrícolas diz respeito à aplicações de natureza não-alimentícia. Várias alternativas desta natureza têm sido propostas para vários tipos de produtos agrícolas, como a soja, a cana-de-açúcar, o milho, o sorgo e a mandioca (FONTANA *et al.*, 2003). A maior parte destas aplicações tem sido orientada ao aproveitamento de seus resíduos de processamento, geralmente apresentados na forma de bagaço e de outros tipos de fitobiomassa residual. No entanto, algumas propostas também versam sobre aplicações não convencionais de produtos agro-industriais nobres, como a fécula de mandioca, o óleo de soja (ou de outros tipos de oleaginosas), o caldo de cana, o farelo de oleaginosas e os cereais *in natura*, como no caso de farinhas e produtos afins.

Não há dúvidas de que o Brasil dispõe, em face de suas inúmeras atividades agro-industriais, de uma grande disponibilidade de fitobiomassa nativa e/ou residual que representa um enorme potencial energético. Nela figuram alternativas como o bagaço de laranja, os resíduos de fecularias (bagaço de mandioca), o bagaço de cana, as palhas de aveia, de cana, de trigo e de milho, as cascas de arroz e de aveia, a serragem de madeira e outros resíduos de natureza agro-florestal.

## 1.1 BAGAÇO DE CANA

Dos resíduos agrícolas de maior importância no território nacional, o bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de grande destaque. No ano 2006, a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 300 usinas, processou  $3,84 \times 10^8$  toneladas de cana para produzir  $1,6 \times 10^7$  m<sup>3</sup> de álcool. A quantidade de cana processada gerou cerca de  $10^8$  toneladas de bagaço e  $8,9 \times 10^7$  toneladas de palha (base úmida) (CERQUEIRA *et al.*, 2007; UDOP, 2007). Em geral, o processamento de uma tonelada de cana-de-açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço. Embora boa parte deste bagaço seja utilizada para fins energéticos, essa quantidade representa uma grande oportunidade para a agroindústria nacional. Há, portanto, um amplo reconhecimento de que a produção anual de bagaço de cana atinge cifras vultuosas e que o aproveitamento deste resíduo é uma necessidade nacional, com amplo espaço para o desenvolvimento de atividades mais nobres do que a geração direta de energia por combustão ou gaseificação. Portanto, muito se tem investido no desenvolvimento de novas tecnologias para o aproveitamento integral da cana-de-açúcar, particularmente no que tange à produção de etanol e de outros produtos de maior valor agregado. Segundo alguns autores, a utilização do bagaço excedente viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo (GÁMEZ *et al.*, 2006).

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar vem sendo relatada na literatura como matéria-prima para vários processos e produtos. Como exemplos, citam-se a

produção direta de energia por combustão ou gaseificação, a produção de polpa celulósica para produção de papel e papelão, a obtenção de produtos baseados em processos fermentativos, como etanol, polióis (xilitol) e ácidos orgânicos, a produção de furfural por hidrólise ácida mineral e o preparo de outros produtos de interesse econômico, como ração animal e compósitos (LOBO *et al.*, 2006; GÁMEZ *et al.*, 2005; DESCHAMPS, 1996; BAUDEL, 2005; GALVÃO *et al.*, 2001).

## 1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DE MATÉRIAS LIGNOCELULÓSICAS

A dificuldade de converter o bagaço de cana e outros materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às características morfológicas existentes entre os três principais componentes da parede celular de plantas superiores (PURI, 1984; FAN *et al.*, 1987). Estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matrix composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação enzimática e/ou microbiana. A compreensão da complexidade estrutural desses materiais requer o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes.

### 1.2.1 Celulose

A celulose é um homopolissacarídeo de ocorrência natural, constituído por unidades de anidroglicopiranosose ( $\beta$ -D-glicopiranosose) ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) formando uma cadeia linear (Figura 1). Duas unidades adjacentes formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4. Esta estrutura

dissacarídica recebe o nome de celobiose (FENGEL e WEGENER, 1989). A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glucose representa tão somente a unidade fundamental das cadeias do homopolímero (TÍMÁR-BALÁZSY e EASTOP, 1998; MEDVE, 1997).

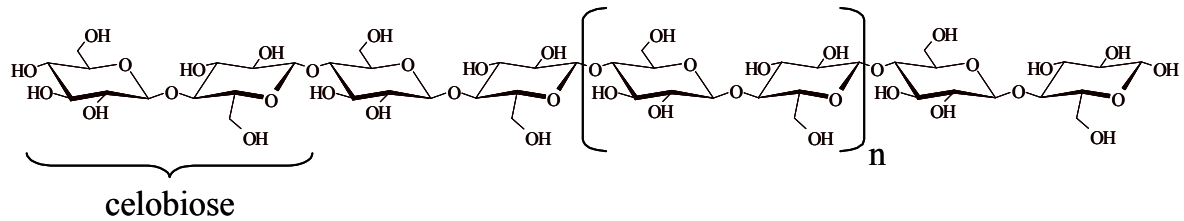


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA CADEIA LINEAR DA CELULOSE, FORMADA POR VÁRIAS UNIDADES CONSECUTIVAS DE CELOBIOSE (TÍMÁR-BALÁZSY E EASTOP, 1998)

A liberdade rotacional da cadeia linear da D-glucose permite que o carbono 1 seja atacado pela hidroxila do carbono 5, em reação intramolecular que resulta na formação de um hemiacetal. Após a reação de fechamento do anel, as hidroxilas do carbono anomérico (quiral) podem assumir duas possíveis orientações, axial ou equatorial, donde resultam os anômeros  $\alpha$  e  $\beta$ . Em solução aquosa, as formas  $\alpha$  e  $\beta$  se interconvertem por abertura e fechamento do anel (mutarrotação) até o momento em que se estabelece um equilíbrio, onde a  $\beta$ -D-glucopiranosose corresponde a 62%, a  $\alpha$ -D-glucopiranosose a 38% e a forma aberta, a menos de 0,5% (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A disposição da cadeia macromolecular da celulose assume uma disposição linear devido a três fatores: a hidroxila no carbono anomérico possui orientação equatorial, a conformação do anel piranosídico assume disposição em cadeira  ${}^4C_1$  e

cadeias adjacentes formam uma rede de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que estabilizam o agregado (Figura 2) (FENGEL e WEGENER, 1989).

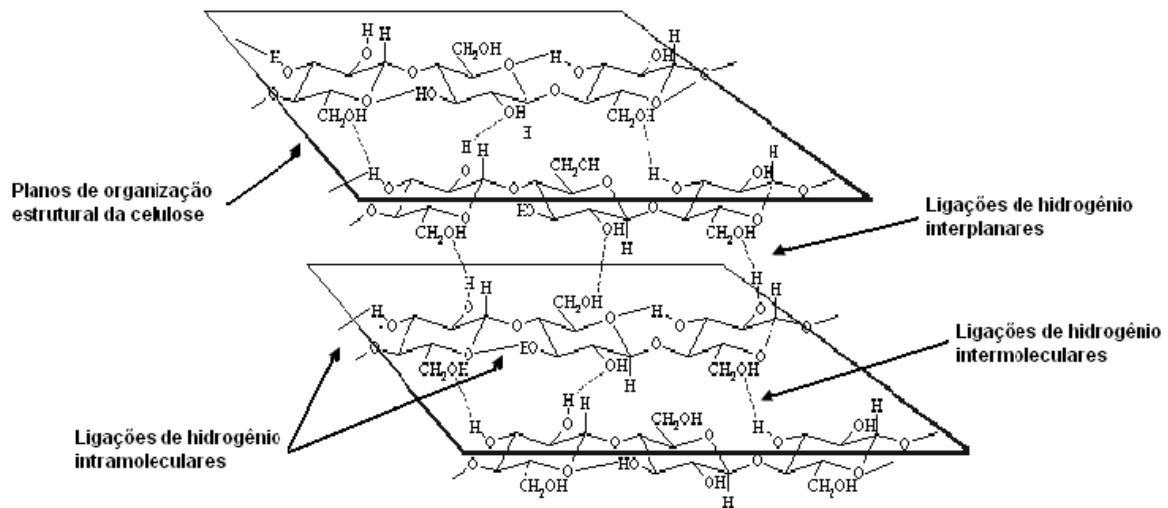


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO DAS LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO NA ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DA CELULOSE (MODIFICADO DE GARRET e GRISHAM, 1999)

O tamanho ou extensão da cadeia de celulose é medido através de seu grau de polimerização (GP), que representa o número de unidades de anidroglicose (AnGlc) que forma a cadeia polissacarídica. Este valor varia de acordo com a fonte, o grau de maturação da parede celular, o processamento a que as fibras foram submetidas e o seu tempo de envelhecimento (FENGEL e WENEGGER, 1989). Em plantas superiores, o GP da celulose nativa varia de 10000 a 15000 unidades de AnGlc. No entanto, todos os processos que envolvem o seu isolamento para fins industriais geram uma diminuição de uma a duas ordens de grandeza nestes valores de GP. Por exemplo, nos processos de polpação alcalina (processo Kraft), o GP da celulose decresce até a faixa

de 1000 a 1300 unidades de AnGlc, enquanto que, nos processos de hidrólise ácida para obtenção de celulose microcristalina, a queda de GP atinge valores da ordem de 250 a 300 unidades de AnGlc (FAN *et al.*, 1987; FENGEL e WENEGER, 1989).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 2), e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FAN *et al.*, 1987). A proporção da parte cristalina é normalmente expressa em porcentagem (índice de cristalinidade ou CrI) e depende da origem e processo de obtenção da celulose. Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina.

A celulose nativa cristalina é constituída por duas fases alomórficas: a celulose  $I_{\alpha}$  (triclínica) e a celulose  $I_{\beta}$  (monoclínica), sendo que cada espécie vegetal apresenta uma composição característica entre estas duas fases. Diferenças no arranjo de ligações de hidrogênio, que determinam as suas respectivas estruturas supramoleculares, resultam em agregados de diferente estabilidade química que apresentam diferentes propriedades físico-mecânicas (ÅKERHOLM *et al.*, 2004; HORII, 2001). A estrutura monoclínica é termodinamicamente mais estável que a estrutura triclínica. Por conseqüência, durante procedimentos de conversão termo-química da fitobiomassa a altas temperaturas (*e.g.*, explosão a vapor), a forma  $I_{\alpha}$  é parcialmente convertida na forma  $I_{\beta}$  que, pelo menos a princípio, permanece inalterada no produto final do processo de conversão (HORII, 2001; FOCHER *et al.*; 1988).

Devido à linearidade do esqueleto celulósico, cadeias adjacentes formam um conjunto de agregados insolúveis em água de vários comprimentos e larguras, denominadas fibrilas elementares (D'ALMEIDA, 1988). De acordo com Fengel e Wegner (1989), diversas fibrilas elementares, com uma espessura média de 3,5 nm, se associam uma com as outras formando cristalitos de celulose cujas dimensões dependem da origem e do tratamento da amostra. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem através de uma monocamada de hemiceluloses, gerando estruturas de 25 nm que são envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e protolignina. O composto natural que resulta dessa associação é chamado de microfibrila de celulose (Figura 3).

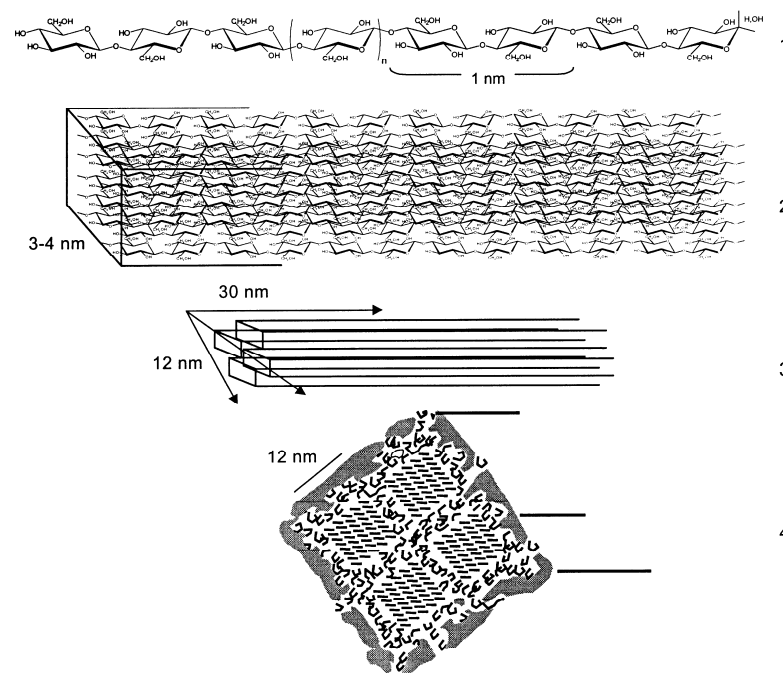


FIGURA 3 - ASSOCIAÇÃO DOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR. (1) CADEIA LINEAR DA CELULOSE, COM A INDICAÇÃO DE SUA UNIDADE ESTRUTURAL; (2) ARRANJO DAS CADEIAS NA FIBRILA ELEMENTAR; (3) CRISTALITO; (4) SEÇÃO TRANSVERSAL DA MICROFIBRILA (RAMOS, 2003).



### 1.3.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são definidas como heteropolissacarídeos não-amiláceos e não-celulósicos que podem ser extraídos da parede celular dos vegetais superiores (SJÖSTRÖM, 1992; FENGEL e WEGENER, 1989). São formadas por uma variedade de unidades monossacarídicas, como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose, hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-*O*-metil-glucurônico e ácido galacturônico) (Figura 4). São estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003). Comparada à celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter relativamente amorfo destes polissacarídeos, que apresentam grande polidispersidade e GP bastante inferior ao da celulose nativa, geralmente não ultrapassando o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcar (SCHUERCH, 1963; FENGEL e WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1992).

As cadeias de hemiceluloses podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como é o caso das xilanas, ou por duas ou mais unidades, como no caso das 4-*O*-metil-glucuronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas (FENGEL e WEGENER, 1989). A natureza química das hemiceluloses varia, nas plantas, em relação ao tipo de tecido vegetal e espécie a que pertencem. Em geral, as

hemiceluloses participam nas madeiras em 20 a 30% da composição total, enquanto que, nas gramíneas, estes valores podem variar de 20 a 40% (SJÖSTRÖM, 1992).

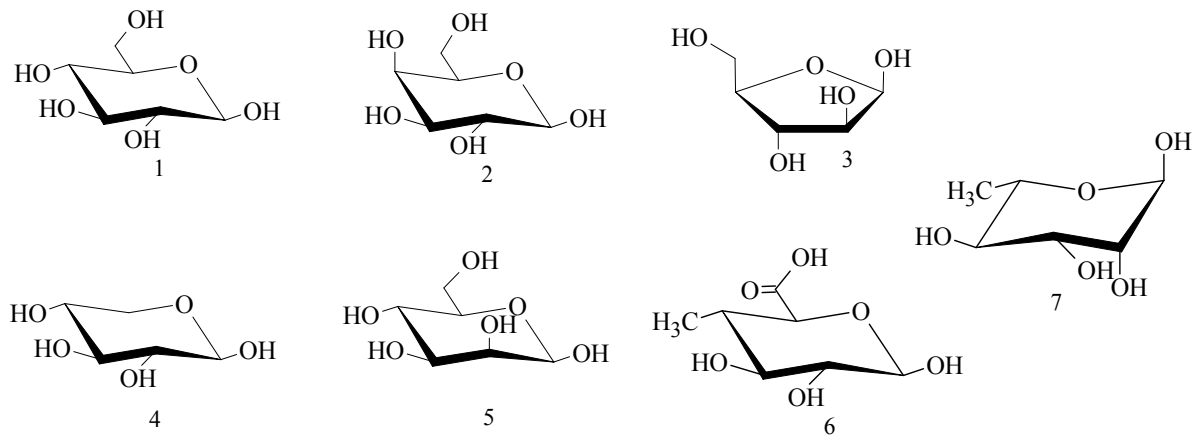


FIGURA 4 - MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES. D-GLUCOSE (1), D-GALACTOSE (2), L-ARABINOSE (3), D-XILOSE (4), D-MANOSE (5), 4-*O*-METIL-D-GLUCURÔNICO (6) E L-RAMNOSE (7) (SJÖSTRÖM, 1999).

As hemiceluloses de coníferas ou gimnospermas e folhosas ou angiospermas dicotiledôneas diferem significativamente entre si. As hemiceluloses características de coníferas são as *O*-acetil-galactoglucomananas, as arabino-4-*O*-metil-glucuronoxilanas (heteroxilanas) e, eventualmente, as arabinogalactanas (FENGEL e WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1992, TERASHIMA *et al.*, 1993). A cadeia principal das galactoglucomananas está formada por unidades de D-glucopiranoose associadas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) entre si e as unidades de D-manopiranoose. As unidades de galactose se associam à cadeia principal através de ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6) e o grupamento acetil se encontra presente nas hidroxilas de C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> de algumas hexoses. As xilanas são formadas por unidades de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-xilopiranoose parcialmente substituídas por unidades de 4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurônico e unidades de  $\alpha$ -L-arabinofuranose. Já as

arabinogalactanas são componentes minoritários, solúveis em água, apresentando como cadeia principal as unidades de D-galactopiranosose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Esta cadeia apresenta-se parcialmente substituída em C<sub>6</sub> por unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose ou L-arabinose, que assume as formas  $\alpha$  ou  $\beta$  em conformação furanosídica ou piranosídica.

As hemiceluloses de folhosas são compostas majoritariamente por heteroxilanas altamente acetiladas, geralmente classificadas com 4-*O*-metilglucuronoxilanas (FENGEL e WEGENER, 1989; SJÖSTRÖM, 1992). A substituição em C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> das unidades de xilose por grupamentos *O*-acetil é a principal característica que diferencia as xilanas de folhosas daquelas de coníferas. A quantidade de grupamento *O*-acetil nessa estrutura é de aproximadamente sete para cada dez unidades de xilose. O segundo substituinte em C<sub>2</sub> das unidades da cadeia principal é o ácido-4-*O*-metil- $\alpha$ -D-glucurônico, cuja frequência é de uma unidade para cada dez de xilose. As madeiras de folhosas também contêm hexosanas como glucomanas, mas em quantidades muito pequenas. Devido a sua característica ácida e suas propriedades químicas, as xilanas de folhosas são mais lábeis à hidrólise ácida e podem sofrer autohidrólise sob condições relativamente brandas. Como resultado disso, as hemiceluloses de folhosas (praticamente pentosanas) são mais lábeis à hidrólise ácida do que as hemiceluloses de coníferas (RAMOS, 2003).

As hemiceluloses de gramíneas apresentam os mesmos tipos de polissacarídeos presentes nas folhosas, diferenciando-se obviamente na composição percentual e em algumas peculiaridades estruturais, de acordo com a espécie ou parte

a planta que está sendo estudada. A Figura 5 mostra a representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas (McDOUGALL, 1993).

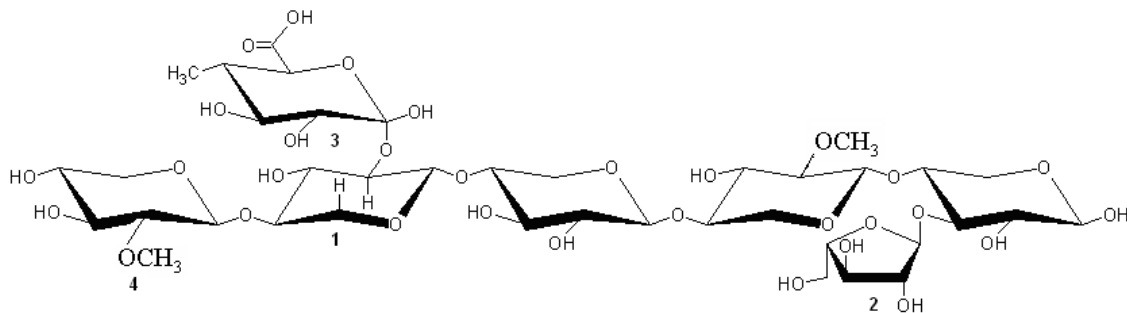


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA XILANA DE GRAMÍNEA. 1,4-D-XILOPIRANOSE (1); L-ARABINOFURANOSE (2); ÁCIDO 4-O-METIL- $\alpha$ -D-GLUCURÔNICO (3); GRUPO ACETIL (4).

### 1.3.3 Lignina

Depois da celulose, a lignina, é um dos polímeros orgânicos mais abundantes e importantes na natureza. A lignificação é uma das etapas finais da diferenciação de células do xilema, onde a lignina é depositada juntamente com os carboidratos, formando ligações covalentes com unidades monossacarídicas das hemiceluloses. A lignina está presente na madeira em cerca de 20 a 30%, agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular (FENGEL e WEGENER, 1989).

A lignina pode ser definida como um material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (Figura 6) (DENCE e LIN, 1992). A estrutura da lignina é bastante complexa e possui vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas, sendo as mais abundantes as  $\beta$ -O-4 e  $\alpha$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ -1, 5-5,

$\beta$ - $\beta$  e  $\beta$ -O-5 (HIGUCHI, 1984). Um modelo proposto para lignina de *Fagus* sp é mostrado na Figura 7.

As ligninas presentes nos vegetais diferem entre si pelo grau de metoxilação dos monômeros e pelo grau de ligação carbono-carbono entre os mesmos (GOLDSTEIN, 1981). As ligninas de coníferas são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico e são frequentemente denominadas de ligninas guaiacilas (lignina do tipo G), enquanto as ligninas das folhosas contêm resíduos derivados dos álcoois coniferílico e sinapílico e são denominadas de ligninas guaiacil-siringilas (lignina tipo GS). Em contraste, as ligninas derivadas de gramíneas contêm os três precursores básicos citados acima (lignina tipo HGS). Como consequência, as ligninas das folhosas possuem alta quantidade de grupos metoxílicos, são menos condensadas e são mais suscetíveis à conversão química do que as ligninas derivadas das coníferas (RAMOS, 2003).

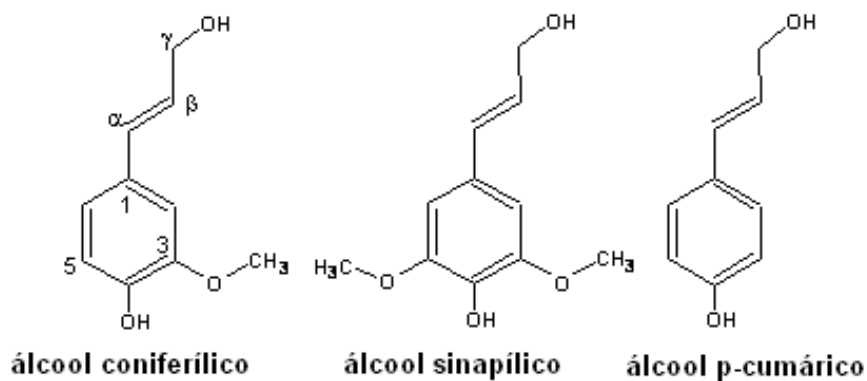


FIGURA 6 - ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992)

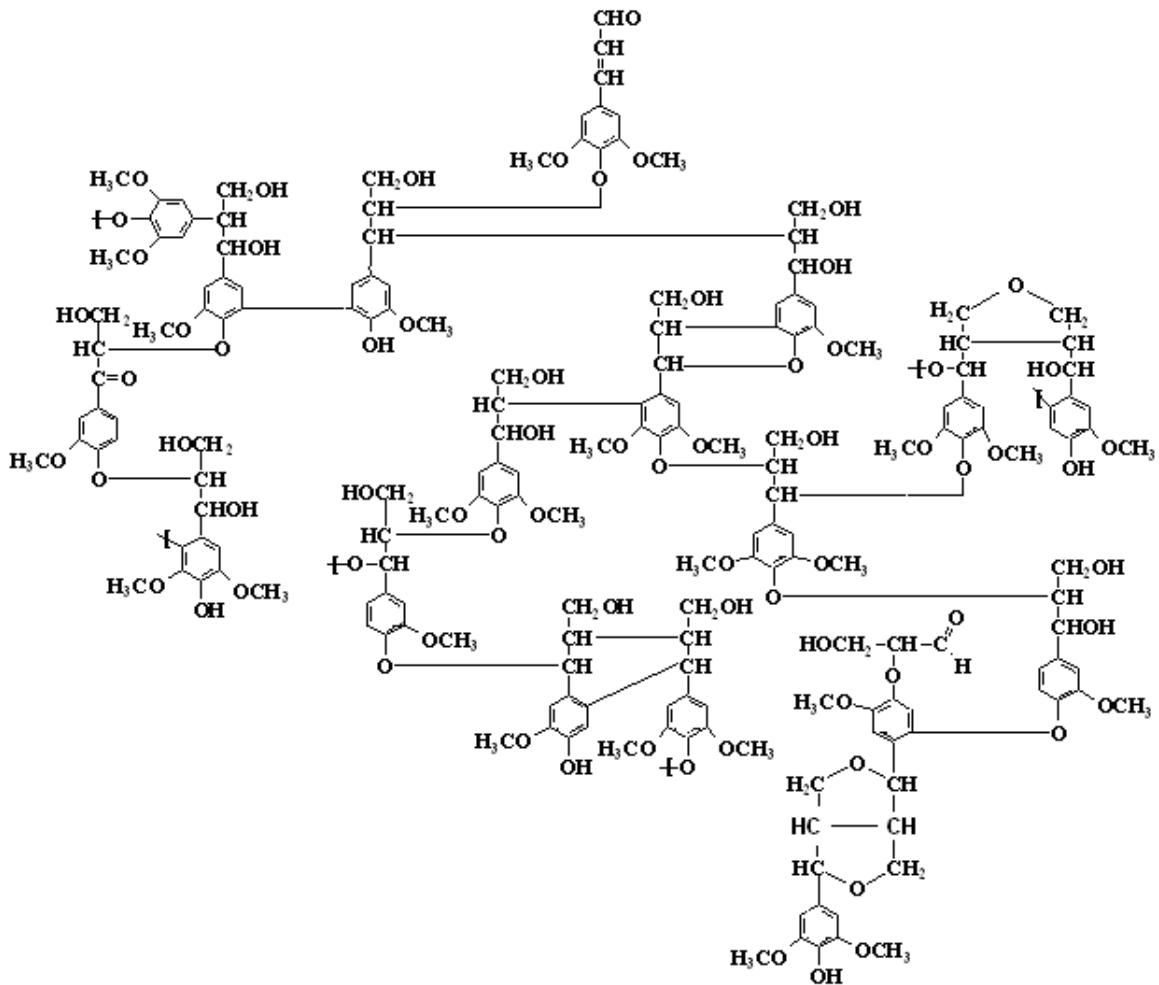


FIGURA 7 - ESTRUTURA DA LIGNINA DE *Fagus sp* (FENGEL e WEGENER, 1989)

### 1.3.4 Extraíveis

Os componentes de menor massa molar presentes na fitobiomassa incluem uma variedade de compostos orgânicos, cuja presença relativa é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos por serem solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor. A segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por

exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas (RAMOS, 2003).

O teor de extrativos em madeira de folhosas corresponde a 3 a 10%, estando este valor em torno de 5 a 8% para as madeira de coníferas. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1988). É comum a denominação de resina para uma determinada classe de extrativos. Porém, este termo se aplica a um conjunto de substâncias químicas que inibem a cristalização e, portanto, caracteriza mais a condição física do que a composição química da fração. Deste modo, os seguintes compostos podem ser encontrados em resinas de madeiras: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides e outros aromáticos. Além dessas substâncias, outros compostos orgânicos também podem estar presentes nos extrativos, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de elevada massa molar.

#### 1.4 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Como resultado da íntima associação que existe entre os três componentes poliméricos majoritários da fitobiomassa, juntamente à interveniência dos extrativos, a caracterização desses materiais constitui uma difícil tarefa experimental que, muitas vezes, exige a utilização de mais de um tipo de metodologia analítica, quer puramente química (como em métodos de extração seletiva para preparação de alfa-celulose e holocelulose), quer cromatográfica ou espectroscópica. Por outro lado, este mesmo grau de associação molecular dificulta a utilização destes materiais como matérias-

primas para processos químicos e biotecnológicos, razão pela qual há a necessidade do emprego de um método de pré-tratamento que amenize a interação entre os principais componentes da fitobiomassa e os torne susceptíveis à conversão em (bio)combustíveis e/ou insumos para a indústria química (RAMOS, 2003; GÁMEZ *et al.*, 2006; CUNHA, 2001).

Vários 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. Dos vários processos descritos na literatura, os mais comuns são baseados no emprego de álcali, hidrólise ácida, explosão a vapor, água quente, fluido supercrítico, amônia líquida (*Ammonia Fibre Explosion* ou AFEX) e hidróxido de sódio, todos com o propósito de desagregar a estrutura associativa da lignocelulose para produzir combustíveis renováveis ou insumos químicos a partir da biomassa (GÁMEZ *et al.*, 2005; LASER *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 2001).

No pré-tratamento com água quente, também conhecido como solvólise não-catalítica, a biomassa fica em contato com água comprimida durante 1 a 15 min sob temperaturas entre 170 e 230°C. Neste processo, 90% das hemiceluloses são recuperadas quando um ácido é empregado como catalisador, a remoção da celulose varia de 4-22% e, durante o pré-tratamento, uma grande quantidade de lignina pode ser removida (35-60%). A desvantagem desse processo está relacionada com grande consumo de água, que produzem hidrolisados muito diluídos, gerando problemas nas etapas subseqüentes de bioconversão (LASER *et al.*, 2002; SUN e CHENG, 2002).



O processo de hidrólise com ácido diluído consiste em aquecer uma solução de ácido e biomassa no reator. São utilizadas temperaturas que variam de 140 a 200°C, onde cerca de 80-90% das hemiceluloses são recuperadas majoritariamente na forma de monômeros e 30-50% de lignina é passível de extração alcalina. A hidrólise com ácido diluído demanda da utilização de uma matéria-prima com reduzido teor de cinzas e impurezas, devido o efeito tamponante das mesmas, sendo necessário a lavagem da biomassa antes do pré-tratamento. O ácido sulfúrico é utilizado frequentemente como agente hidrolítico, embora outros ácidos possam ser utilizados, como ácido nítrico, ácido clorídrico e fosfórico (GÁMEZ *et al.*, 2002; SUN e CHENG, 2002; ESTEGHLALIAN, 1997). Embora o pré-tratamento com ácido diluído hidrolise aproximadamente toda a hemicelulose, seu custo é normalmente mais elevado que outros processos como a explosão a vapor ou amônia líquida (AFEX). Também é necessária a neutralização do hidrolisado para as etapas subseqüentes de hidrólise enzimática ou fermentação (SUN e CHENG, 2002).

Algumas bases também podem ser utilizadas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito desse processo depende da quantidade de lignina presente nos materiais (McMILLAN, 1994). Processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com sistemas ácidos. Segundo Baudel (2006), o principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um “inchamento” da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. O tratamento de madeira de folhosas

com hidróxido de sódio (NaOH) aumentou a digestibilidade de 14% para 55% com a diminuição de 24-55% para 20% de lignina no material pré-tratado (SUN e CHENG, 2002). A desvantagem do sistema alcalino está parcialmente associada à dificuldade de recuperação do álcalis, de modo a garantir a necessária economicidade do processo.

O processo AFEX consiste na versão alcalina do processo de pré-tratamento por explosão a vapor. Neste caso, a biomassa é submetida à ação de amônia líquida (2 Kg/Kg biomassa seca) a 160-180°C, sob pressão de 9 a 17 bar e por um período de 10 a 20 min. Dentre as vantagens deste método, está a elevada reatividade da fibra, a geração mínima de inibidores de fermentação além da facilidade na recuperação da amônia. Entretanto, este processo não promove uma elevada solubilização das hemiceluloses como os processos ácidos, sendo difícil a recuperação das mesmas (HOLTZAPPLE *et al.*, 1991).

No pré-tratamento alcalino oxidativo; a biomassa é tratada com água quente e oxigênio a temperaturas superiores a 120°C. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) também pode ser utilizado como agente oxidante, sob temperaturas entre 30-70°C, com tempos de reação que variam de 2 a 8 h. Neste processo, carbonato de sódio, hidróxido de cálcio ou hidróxido de sódio são utilizados como agentes de hidrólise e deslignificação. São produzidas neste pré-tratamento polpas com elevada reatividade da fibra. O uso da oxidação alcalina úmida para o tratamento de palha de trigo (20 g de palha/L, 170°C, 5-10 min) alcançou índices de sacarificação enzimática da celulose de 85%. Um dos problemas associados a esse processo é a geração de inibidores de fermentação nos hidrolisados, tais como ácidos orgânicos e compostos fenólicos (MARTÍN *et al.*, 2007).

O pré-tratamento por explosão a vapor tem sido proposto como um dos métodos mais promissores para separar os principais constituintes dos materiais lignocelulósicos (BROWNELL, 1989; EXCOFFIER *et al.*, 1991; RAMOS, 1992, 2003; RAMOS e SADDLER, 1994a, BAUDEL, 2006; CUNHA, 2001). Este processo atua tanto química como fisicamente na transformação do material lignocelulósico e envolve o tratamento da biomassa com vapor saturado a temperaturas entre 160 e 240°C durante um tempo de reação que varia de 2 a 30 min, sendo que, após o tempo de reação, ocorre a descompressão explosiva do sistema e o material pré-tratado é coletado em um tanque de expansão. Durante o processo, as hemiceluloses são hidrolisadas a açúcares solúveis e a lignina é parcialmente modificada, tornando a biomassa mais susceptível à solvatação e, por conseguinte, aos processos de hidrólise ácida ou enzimática (SUN e CHENG, 2002).

## 1.5 PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR

Os materiais lignocelulósicos, quando submetidos a altas pressões de vapor por um determinado período de tempo, sofrem um processo que é comumente descrito auto-hidrólise (EXCOFFIER *et al.*, 1991). Estas reações ocorrem em temperaturas superiores à temperatura de amolecimento da lignina e das hemiceluloses. Ao longo do processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em partes quebradas, de forma que, no momento da descompressão, o material é desfibrado e reduzido a partículas menores. Isto explica o aumento da susceptibilidade do material ao ataque de enzimas e reagentes químicos.

Durante o processo de pré-tratamento a vapor, todos os componentes da biomassa sofrem hidrólise, mas as hemiceluloses são as mais susceptíveis a este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão do vapor, os grupamentos acetil presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses que são facilmente removidas por extração aquosa. A fração insolúvel em água contém celulose e lignina parcialmente modificada, sendo que a maior parte desta lignina pode ser removida por extração com álcali, etanol ou dioxano.

O aumento da severidade do pré-tratamento (aumento da temperatura e/ou do tempo de residência do material no reator) favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses, provoca o início das reações de desidratação das pentoses e hexoses, com a formação de furfural (Figura 8) e hidroximetilfurfural (Figura 9) (BROWNELL *et al.*, 1986; SILVA, 1995; RAMOS, 2003) e aumenta as reações de condensação dos taninos e outras subestruturas que compõem os extraíveis (LOMAX *et al.*, 1994). O pré-tratamento a vapor também favorece a quebra de ligações mais termolábeis da lignina, principalmente as ligações  $\beta$ -O-4, levando à formação de novas ligações e à fragmentação de partes do componente lignínico (TANAHASHI, 1990).

O processo de explosão a vapor foi primeiramente introduzido por Mason em 1928 (MASON, 1928) para desfibrar resíduos da indústria madeireira para a produção de papelão. Em 1932, Babcock mostrou que este processo podia ser utilizado para produzir açúcares fermentescíveis e álcool a partir da madeira (BABCOCK, 1932). Já em 1953, Asplund produziu polpas pelo processo de explosão a vapor que

apresentavam boas propriedades para a fabricação de papel, trabalhando a temperaturas que variavam de 100 a 160°C (ASPLUND, 1953). Desde então, surgiram outros processos similares ao descritos anteriormente, com o propósito de viabilizar comercialmente a conversão da biomassa em produtos químicos, energia e ração animal.

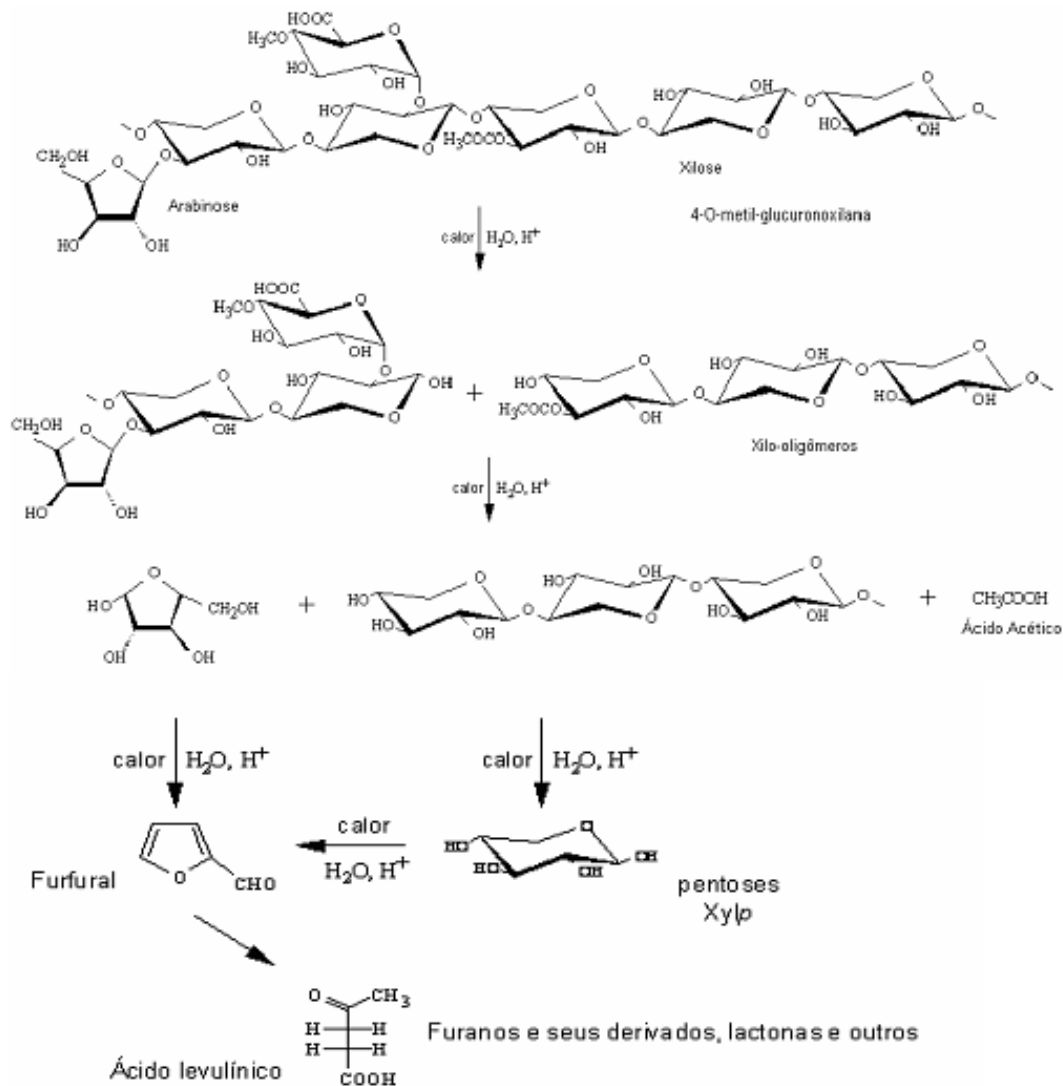


FIGURA 8 - REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE HETEROXILANAS E DESIDRATAÇÃO DE PENTOSAS A FURFURAL E OUTROS PRODUTOS (FENGEL e WEGENER, 1989).

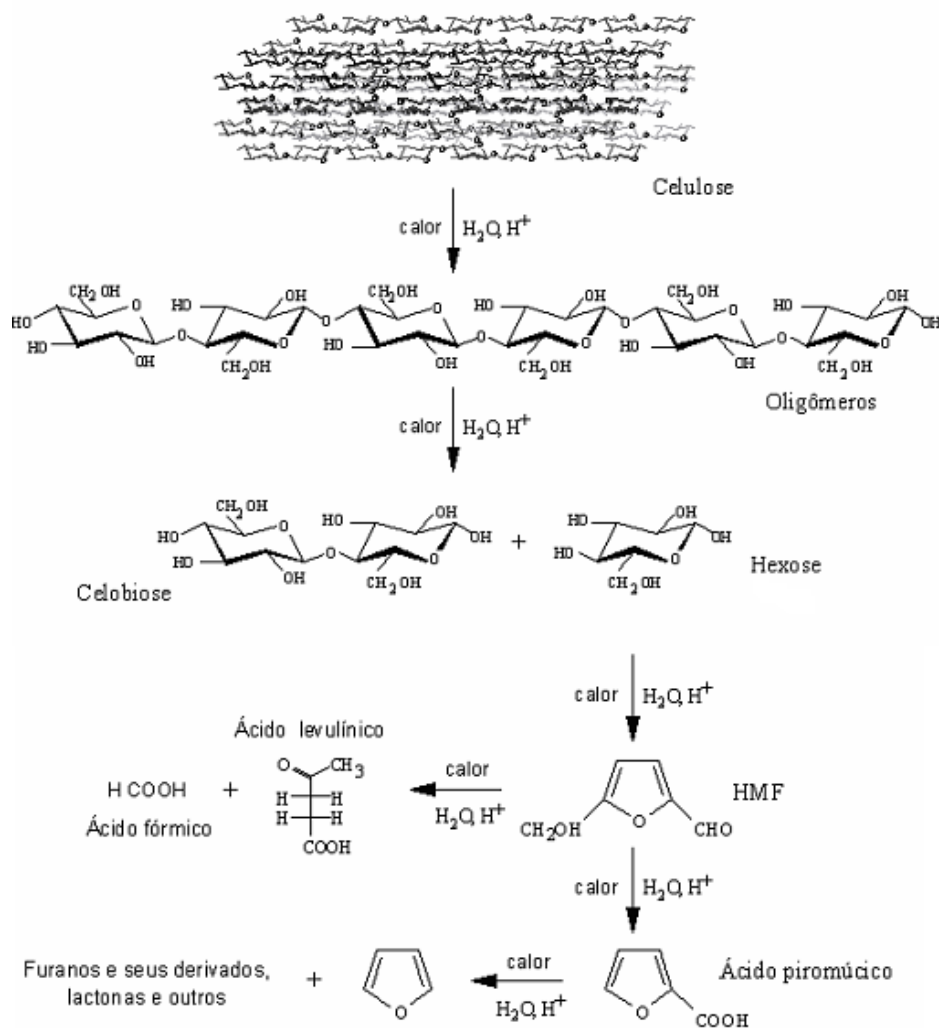


FIGURA 9 - REAÇÕES DE HIDRÓLISE DE GLUCANAS E DESIDRATAÇÃO DE HEXOSES A HIDROXIMETILFURFURAL E OUTROS PRODUTOS (FENGEL e WEGENER, 1989).

Pré-tratamentos realizados por Silva (1995) para o bagaço de cana na ausência de catalisador, a  $210^{\circ}C$  por 15 min, apresentaram solubilização de 42% do bagaço, dos quais 67% foram perdidos para compostos não identificados. Ocorreu um aumento na remoção da celulose e das hemiceluloses, cujas quantidades foram de 77 e 2,8% na fração insolúvel, respectivamente. Reações de desidratação foram favorecidas durante o pré-tratamento, sendo que a quantidade de hidroximetilfurfural foi de 0,51% e a de

furfural foi de 3,16% no hidrolisado de bagaço. O balanço de massas mostrou um acréscimo de 17% na massa da lignina recuperada ao final do processo, indicando a ocorrência de reações de condensação da lignina com outros compostos presentes no meio reacional para formar polímeros insolúveis de alta massa molar. Também foram realizados experimentos à 210°C por 30 min; neste caso, a solubilização do bagaço foi de 42,9%, sendo que, deste total, somente 34,5% foi identificado. Nesta condição de pré-tratamento, 43% da celulose foi hidrolisada, bem como praticamente toda a fração hemicelulósica contida no bagaço original. Os resultados obtidos nesta condição de pré-tratamento indicaram perdas de bagaço por reações de decomposição dos derivados da celulose (16%) e das hemiceluloses (19%), que corresponderam a cerca de 38% e 76% dos respectivos compostos de origem.

Outros estudos foram realizados para o pré-tratamento do bagaço de cana na ausência de catalisador. Kaar *et al.* (1999) pré-tratou o bagaço de cana em várias condições de auto-hidrólise, onde a temperatura variou de 188°C a 230°C e os tempos de residência, de 0,5 a 44 min. Os rendimentos totais para estes experimentos variaram de 78 a 99% em relação à massa, sendo que a recuperação foi favorecida para experimentos realizados em condições mais suaves de pré-tratamento. Já o rendimento obtido para glucose variou de 41 a 67%, sendo que o melhor rendimento foi obtido em temperaturas mais elevadas (216°C). A recuperação de xilose foi de 17 a 85% para os experimentos realizados em condições de menor severidade. A auto-hidrólise do bagaço de cana a 200°C por 4 min permitiu a solubilização de 90% das hemiceluloses, paralelamente à obtenção de fibras de alta susceptibilidade à hidrólise enzimática (DEKKER *et al.*, 1983).

A Tabela 1 apresenta condições empregadas para o pré-tratamento a vapor de vários tipos de materiais lignocelulósicos

TABELA 1 - MATERIAIS E CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O PRÉ-TRATAMENTO POR EXPLOSÃO A VAPOR.

<b>Materiais</b>	<b>Catalisador</b>	<b>T (°C)</b>	<b>t (min)</b>	<b>Referência</b>
Palha de trigo	0,1% NaOH	180	20	Montane <i>et al.</i> , 1995
		205	2	Montane <i>et al.</i> , 1995
Bagaço de cana	0,2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	190	10	Galbe <i>et al.</i> , 2002
		188-230	0,5-44	Kaar <i>et al.</i> , 1998
	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	220	0,5	Morjanoff <i>et al.</i> , 1987
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	118-222	4,1-59	Mattos <i>et al.</i> , 2001
		165-210	5-30	Silva, 1995
	SO <sub>2</sub>	180-205	5-10	Galbe <i>et al.</i> , 2002
		205	10	Martín <i>et al.</i> , 2002
	200	4	Dekker <i>et al.</i> , 1983	
<i>Picea albis</i>	0,5-1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	170-230	1-46	Laser <i>et al.</i> , 2002
		190-200	2-5	Galbe <i>et al.</i> , 2002
	2,5% SO <sub>2</sub>	190-200	2-5	Galbe <i>et al.</i> , 2002
<i>Salix caprea</i>		195-210	10-14	Galbe <i>et al.</i> , 2002
		180-205	4-8	Galbe <i>et al.</i> , 2002
Palha de milho	3% SO <sub>2</sub>	190-200	5	Öhgren <i>et al.</i> , 2005
	3% SO <sub>2</sub>	170	9	Öhgren <i>et al.</i> , 2005
		190-220	3-5	Datar <i>et al.</i> , 2006
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	180-210	1-3	Datar <i>et al.</i> , 2006
<i>Eucalyptus grandis</i>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200-210	2-5	Emmel <i>et al.</i> , 2002
	1-2,5% SO <sub>2</sub>	210	0,8-2,5	Ramos <i>et al.</i> , 1992
		220-240	2	Ramos <i>et al.</i> , 1991
<i>Populus tremuloides</i> (álamo)		190-240	0,3-100	Brownell <i>et al.</i> , 1987
	1,6% SO <sub>2</sub>	210-227	2	Mackie <i>et al.</i> , 1985
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	217-225	2	Excoffier <i>et al.</i> , 1991
<i>Pinus taeda</i>		195-210	2,5-5	Ramos <i>et al.</i> , 2001



O uso de catalisadores durante o pré-tratamento aumenta a seletividade das reações de hidrólise dos polissacarídeos, propicia a redução da temperatura e do tempo de pré-tratamento e melhora os rendimentos de sacarificação. Na presença de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como catalisador a  $217^\circ\text{C}$  por 2 min, 70% das hemiceluloses de madeira de álamo pode ser recuperada como monômeros de xilose e, a  $225^\circ\text{C}$  por 2 min, rendimentos de 70% de glucose foram obtidos a partir da hidrólise enzimática (24 h) do material pré-tratado (EXCOFFIER *et al.*, 1991). Ando *et al.* (1988) compararam o efeito do uso dos ácidos peracético, clorídrico e acético e de peróxido de hidrogênio no pré-tratamento de cedro (*Cryptomeria japonica*) por explosão a vapor a  $231^\circ\text{C}$  por 10-30 min e obtiveram melhores resultados de sacarificação com o uso de ácido peracético, em comparação com os outros catalisadores. Outros reagentes e/ou catalisadores têm sido igualmente empregados no processamento de madeiras e de outros materiais lignocelulósicos. Destacam-se o  $\text{SO}_2$  (LOMAX *et al.*, 1994; RAMOS *et al.*, 1992a; 1992b; CLARK *et al.*, 1989; HOHLBERG *et al.*, 1989; SCHWALD *et al.*, 1989),  $\text{HNO}_3$  (SADDLER *et al.*, 1982a),  $\text{NH}_3$  (MES-HARTREE *et al.*, 1988) e  $\text{NaOH}$  (FOX *et al.*, 1989; PURI e PEARCE, 1986; SCHULTZ *et al.*, 1984).

Dentre uma variedade de catalisadores ácidos descritos na literatura,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluído e  $\text{SO}_2$  são os mais amplamente utilizados. Experimentos realizados em Lund (Suécia) com o pré-tratamento do bagaço da cana por explosão a vapor, utilizando-se processos auto-catalíticos e catalíticos ( $\text{SO}_2$  e  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) com material contendo 50-70% de umidade, resultaram na remoção de 60 a 80% xilose (fração aquosa) com reduzida perda de glucose (3-5%), produzindo polpas com elevada reatividade das fibras, apesar da pequena quantidade de lignina dissolvida na fase aquosa. Tais experimentos

evidenciaram que a remoção das hemiceluloses exerce maior influência sobre a reatividade das fibras de bagaço, em comparação com a deslignificação, sugerindo uma possível vantagem dos processos ácidos que extraem preferencial as hemiceluloses sobre os processos alcalinos que extraem preferencialmente a lignina (BAUDEL, 2006).

A impregnação de materiais lignocelulósicos com ácidos minerais, antes do pré-tratamento por explosão a vapor, tem sido proposta como alternativa para produzir substratos de maior área superficial, devido, particularmente, aos maiores índices de remoção de hemiceluloses e lignina (MICHALOWCZ *et al.*, 1991; GALBE *et al.*, 2002; SÖDERSTRÖM *et al.*, 2002). Por exemplo, o pré-tratamento a vapor de palhas de milho a 190°C por 5 min, utilizando SO<sub>2</sub> como catalisador, produziu altos rendimentos de glucose (90%) após 72 h de hidrólise empregando enzimas comerciais em dosagens de atividade relativamente baixas (ÖHGREN *et al.*, 2005).

Martín *et al* (2002) investigaram a explosão a vapor do bagaço de cana a 105°C por 30 min sem qualquer impregnação (auto-hidrólise) e com adição de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) ou ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como catalisadores. Os materiais pré-tratados a vapor foram submetidos à hidrólise enzimática e os maiores rendimentos de xilose (16,2 g/100 g de bagaço seco), arabinose (1,5 g por 100g) e carboidratos totais (52,9 g/100 g) foram obtidos a partir da hidrólise do bagaço inicialmente impregnado com SO<sub>2</sub>. O bagaço impregnado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resultou no maior rendimento de glucose (35,9 g/100 g) dentre os três experimentos, contrastando com o menor dentre os rendimentos de carboidratos totais (42,3 g/100 g). Esse menor rendimento de carboidratos totais foi atribuído a maior formação de subprodutos, como furfural e

hidroximetilfurfural, formados por reações de desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente. Outro estudo, realizado com bagaço de cana a 220°C por um tempo de residência de 30 s e 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, produziu 65,1 g de açúcar por 100 g de bagaço.

Estudos realizados sobre a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) do bagaço de cana, após pré-tratamento a vapor na presença de SO<sub>2</sub> (GALBE *et al.*, 2002) e de ácido sulfúrico diluído (BAUDEL *et al.*, 2004), demonstraram que a taxa de bioconversão do bagaço tende a decrescer com o aumento da concentração de carboidratos e de etanol no meio reacional, pois, a partir de determinadas concentrações, estes compostos causam inibição da atividade enzimática, sendo que, comparada ao etanol, a glucose exerce uma influência maior sobre as enzimas. Apesar disto, devido a maior tolerância das enzimas ao etanol, a utilização de sistemas SSF possibilita o incremento da atividade enzimática, aumentando o rendimento hidrolítico final.

Laser *et al.* (2002) realizaram estudos comparativos entre o pré-tratamento com água quente e o pré-tratamento a vapor para o bagaço da cana, visando a bioconversão a etanol. A temperatura de reação e tempo de pré-tratamento foram variados de 170 a 230°C e de 1 a 46 min, respectivamente. Ambos pré-tratamentos proporcionaram conversão igual ou superior a 90% por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). A conversão aumentou significativamente quando a temperatura passou de 200°C para 220°C e tempo de residência permaneceu em 2 min: de 43 para 84% para o pré-tratamento com água quente e de 20 a 85% para o pré-tratamento a vapor.

Naturalmente, outros tipos de materiais lignocelulósicos também têm sido investigados em relação aos processos de explosão a vapor e hidrólise enzimática.

Amostras de *Pinus taeda* foram pré-tratados por explosão a vapor a temperaturas entre 195 e 210°C, tempo de residência de 2,5 a 5 min e 0,5-1,0% de ácido sulfúrico. O balanço de massa após o pré-tratamento mostrou recuperação de 90% do material (peso seco), o qual corresponde à recuperação de 66% em fração insolúvel em água (fibras), 23% em fração solúvel em água (hidrolisado) e 11% em perda de massa por voláteis não identificados (RAMOS *et al.*, 2001).

A explosão a vapor de *Eucalyptus grandis* foi investigada em várias condições de pré-tratamento (200-210°C, 2-5 min), com impregnação da madeira com 0,087 e 0,175% (m/m) de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O material impregnado com ácido a 0,175% (m/m) e pré-tratado a 210 °C por 2 min foi obtido como melhor condição para a recuperação das hemiceluloses na fração solúvel (70%). Já pré-tratamentos realizados em temperaturas mais baixas (200°C) resultaram em conversão de 90% da celulose em 48 h de hidrólise enzimática. O aumento da temperatura e da impregnação ácida resultou em aumento no rendimento de lignina solúvel por extração alcalina (EMMEL *et al.*, 2003).

A utilização de soluções diluídas de ácido sulfúrico em temperaturas mais brandas (134°C, 60 min) foi proposta para a produção de ração animal a partir de resíduos agrícolas (CASTRO *et al.*, 1993). Os principais efeitos dos tratamentos resultaram em solubilização parcial das hemiceluloses e da lignina, com o subsequente inchamento da parede celular. Estas alterações favoreceram a digestibilidade do material pré-tratado, que aumentou de 56,3 para 69,1% para experimentos envolvendo 96 h de incubação.

A maioria dos trabalhos sobre pré-tratamento a vapor que se encontram na literatura estão direcionados à hidrólise enzimática da celulose para a obtenção de glucose e etanol, mas, recentemente, as técnicas de explosão a vapor vêm sendo estudadas para processos de polpação de materiais lignocelulósicos. Neste processo, o material é pré-tratado em temperaturas que variam de 180 a 200°C e, após o processo, o substrato é refinado para produção de polpa. A comparação da polpação de faia por processos quimiomecânicos convencionais e por explosão a vapor mostrou que o rendimento e qualidade das polpas foram praticamente iguais em ambos os processos (CHAUDHURI,1989). Kokta e Ahmed (1992) compararam as polpas de bagaço de cana produzidas a partir da polpação por explosão a vapor, por processo quimiomecânico e por processos quimiotermodomecânico, usando Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>/NaOH. Os resultados mostraram que a polpação por explosão produziu polpas com excelentes propriedades mecânicas e em altos rendimentos (81%). Em outro trabalho, Tomasec e Kokta (1991) obtiveram polpas com rendimentos de 90% através da polpação de faia pelos mesmos processos, usando a mesma quantidade de reagentes químicos. As polpas por explosão a vapor apresentaram as melhores propriedades mecânicas sob o menor consumo de energia de refinamento. Os resultados indicaram que as temperaturas altas e a pressão empregadas na polpação por explosão a vapor promoveram o amolecimento das fibras, o aumento da quantidade de celulose cristalina (celulose I) e uma melhor separação entre as fibras.

A versatilidade e ampla aplicação da explosão a vapor a vários tipos de fitobiomassa têm facultado a esta tecnologia uma grande compatibilidade com o conceito de biorrefinarias, mediante as quais uma grande variedade de precursores e de

insumos químicos podem ser produzidos a partir de recursos renováveis. Dentre estas substâncias figuram o furfural, o furano, o ácido *p*-hidroxibenzóico, uma variedade de fenóis importantes como a vanilina e o catecol, óleos essenciais, solventes orgânicos como acetona e butanol, etanol (e, por conseguinte, o eteno por desidrogenação catalítica), carboidratos para processos fermentativos (pentoses e hexoses), ácidos orgânicos, polióis com propriedades edulcorantes (xilitol, sorbitol), dentre tantos outros oriundos quer da porção polissacarídica, quer da porção aromática (lignina e extrativos) presentes na fitobiomassa (RAMOS, 2003). Como excelente método de separação, o emprego da explosão a vapor pode favorecer qualquer uma das estratégias acima, contribuindo para a substituição parcial de derivados de petróleo na indústria química.

## 1.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FAN *et al.*, 1987). Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários tipos de microrganismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixa massa molar como a glucose e a celobiose (MEDVE, 1997; CARRASCO, 1992; CONVERSE, 1994).

Em face desta heterogeneidade, a sacarificação enzimática da fitobiomassa depende de uma multiplicidade de atividades específicas complementares cujo sinergismo é essencial para que todo o carboidrato nela disponível seja hidrolisado. Atualmente, sabe-se que o complexo celulásico secretado por fungos filamentosos é formado por três componentes enzimáticos majoritários, as endoglucanases, as celobiohidrolases (exoglucanases) e as  $\beta$ -glucosidases (FAN *et al.*, 1987; CLAEYSSSENS e TOMME, 1989), cuja ação catalítica encontra-se apresentada na Figura 10.

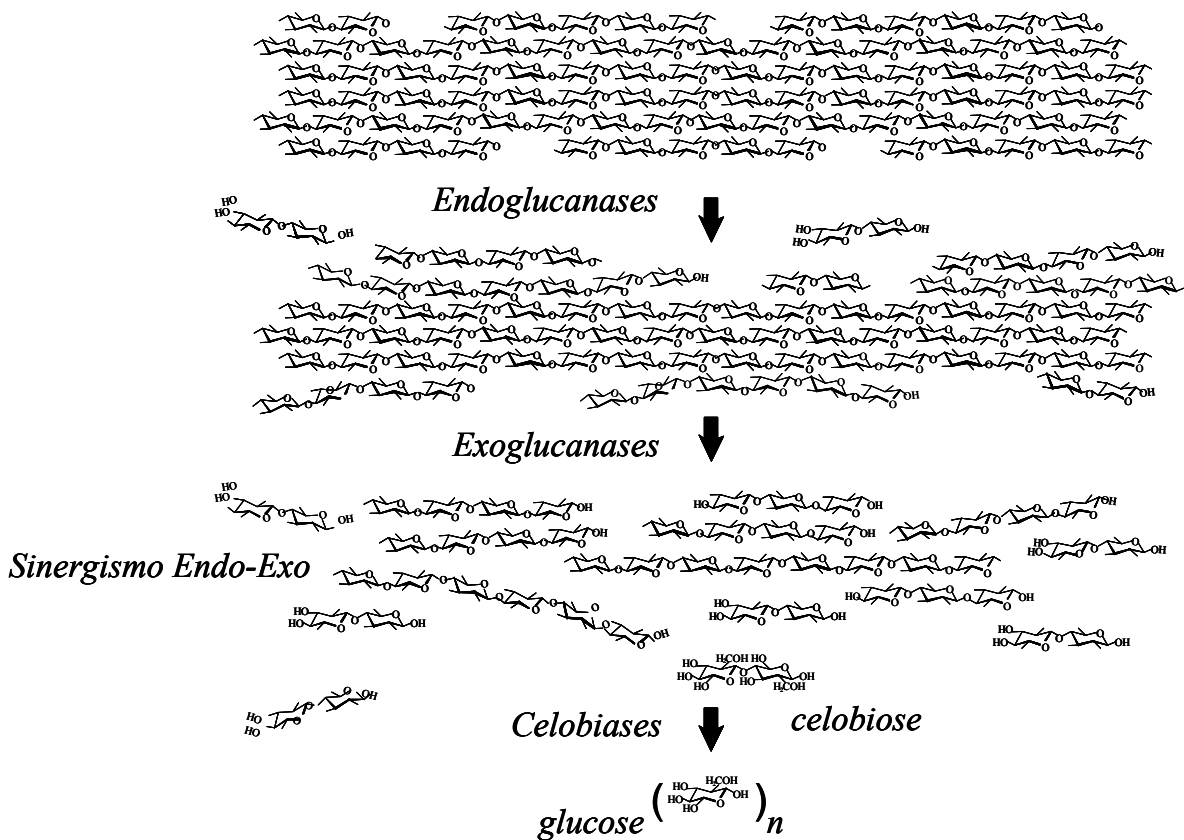


FIGURA 10 - MODO DE AÇÃO DO COMPLEXO CELULÁSICO DE *T. reesei*

As endoglucanases atuam randomicamente ao longo da molécula de celulose, gerando um decréscimo significativo de seu grau de polimerização. Por sua vez, as celobiohidrolases, cuja ação catalítica é capaz de hidrolisar preparações celulósicas microcristalinas, atuam nas regiões terminais das moléculas de celulose, promovendo a sua despolimerização gradativa através da remoção de unidades de celobiose terminais. Finalmente, as  $\beta$ -glucosidases hidrolizam celobiose a glucose, reduzindo assim o efeito inibidor da celobiose sobre as endo- e exoglucanases (RAMOS *et al.*, 1993a). Estas três classes de enzimas, através de suas propriedades complementares, apresentam um alto grau de sinergismo durante a hidrólise da celulose (BELDMAN *et al.*, 1988). No entanto, apenas as endo e exoglucanases são capazes de adsorver sobre o substrato, sendo assim consideradas como celulases verdadeiras (KLYOSOV, 1990).

Devido a suas propriedades, as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) podem ser facilmente isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade, razão pela qual seus domínios catalíticos e de ligação ao substrato ("binding domain") já foram cristalizados e parcialmente caracterizados com relação a sua estrutura tridimensional (DIVNE *et al.*, 1994). Pelo menos dois tipos de celobiohidrolases (CBH I e CBH II) já foram identificadas no complexo celulásico secretado pelo fungo filamentoso *Trichoderma reesei*. Estas enzimas podem ser separadas através de isoeletrofocalização ou por eletroforese (COUGHLAN, 1985; FAN *et al.*, 1987; GOYAL *et al.*, 1991) e apresentam similaridades no modo de ação catalítica, apesar de mostrarem significativas diferenças na composição em carboidratos e aminoácidos, no ponto isoelétrico e na massa molar. Por outro lado, pelo menos cinco enzimas com atividade endoglucanásica já foram identificadas em culturas deste mesmo fungo (EG



I, II, III, IV e V). Tal multiplicidade tem sido justificada por alguns autores como decorrente de modificações pós-translacionais tais como proteólise ou outro mecanismo qualquer (glicosilação). No entanto, existem fortes evidências de que estas enzimas sejam biomoléculas não relacionadas e que, como tal, possuam funções distintas durante o processo de sacarificação da celulose (CLAEYSSSENS e TOMME, 1989; GOYAL *et al.*, 1991).

Dos sistemas celulásicos melhor estudados, as celobiohidrolases, particularmente a CBH I de *Trichoderma reesei*, têm sido consideradas como enzimas essenciais à sacarificação eficiente da celulose. Evidências experimentais indicam que a remoção do gene que codifica para a produção de CBH I reduz em 70% a atividade do complexo sobre a celulose cristalina (KARHUNEN *et al.*, 1993). Além disso, as celobiohidrolases apresentam grande interação sinérgica com outras celulasas, principalmente aquelas de atividade reconhecidamente endoglucanásica (BELDMAN *et al.*, 1988). Dos vários tipos de sinérgismo descritos na literatura, a cooperação entre CBH I e CBH II de *T. reesei* é certamente um dos mais curiosos.

Wood *et al.* (1989) interpretaram o sinérgismo exo/exo postulando que a CBH I tem estereo-especificidade diferente da CBH II e que estas enzimas atacam dois grupos não redutores estereoquimicamente diferentes na superfície da celulose cristalina. A remoção seqüencial de unidades de celobiose do final não redutor da cadeia, pela ação da CBH I, pode expor numa cadeia vizinha um grupo final não redutor com configuração correta para ser atacado pela CBH II e vice-versa. No entanto, a concepção atualmente aceita para este sinérgismo é a de que a CBH I atua

no terminal não redutor da cadeia, enquanto que a CBH II restringe-se aos seus terminais redutores (BELDMAN, 1988; NIDETZKI, 1993).

Nidetzky *et al.* (1993) demonstrou que a ação sinérgica de celulases purificadas de *T. reesei* diminui com o aumento da concentração do substrato e que tal efeito depende fortemente do tipo de celulose testado, sendo máximo para a celulose microcristalina. Foi também comprovado que a atividade destas celulases purificadas aumentava quando substratos “amorfos” eram utilizados e as combinações binárias de CBH I/EG III e CBH I/CBH II exibiram os mais notáveis graus de sinérgismo sobre a celulose microcristalina.

Vários fatores podem influenciar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos e estes podem ser associados à característica do substrato e ao comportamento das enzimas durante a sacarificação. Dentre os fatores relacionados ao substrato, vale citar alterações em sua porosidade e área superficial durante a hidrólise (SUY Y *et al.*, 2002; MAMERS *et al.*, 1981; MANSFIELD *et al.*, 1999), o acúmulo de lignina no meio reacional (para substratos ricos em lignina) (PAN *et al.*, 2004; ADSUL *et al.*, 2005; SCHEWCHENKO *et al.*, 1999; MOONEY *et al.*, 1999) e mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose (FAN *et al.*, 1987; MARTÍN *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 1992). Já os fatores associados às enzimas correspondem à inibição retroativa devida ao acúmulo dos produtos (glucose e celobiose) no meio reacional (LASER *et al.*, 2002; PALMQVIST *et al.*, 1996; KADAM *et al.*, 2004; CANTARELLA *et al.*, 2004), à desnaturação térmica das enzimas em reações usualmente muito longas, ao efeito da agitação mecânica (cisalhamento) sobre a atividade enzimática (RAMOS e SADDLER, 1994a;

TENGBORG *et al.*, 2001; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005) e à adsorção irreversível sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (TENGBORG *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2002; GALBE *et al.*, 1990; PALONEN *et al.*, 2004).

Segundo Palonen *et al.* (2004), a inibição das enzimas envolvidas na sacarificação de materiais lignocelulósicos pré-tratados a vapor está em grande parte associada a interações hidrofóbicas não específicas entre a lignina e o domínio de ligação da enzima à celulose. Por outro lado, outros autores preferem argumentar que as hemiceluloses, ligadas ou não à lignina, formam uma barreira física ao redor do material celulósico que diminui a afinidade da enzima pelo seu principal substrato, a celulose (HSU, 1996; SCHEWCHENKO *et al.*, 1999). Portanto, apesar de geralmente apresentarem boa susceptibilidade à bioconversão, materiais celulósicos pré-tratados a vapor também possuem, ainda que em menor escala, várias características estruturais que restringem a velocidade com que podem ser decompostos pela ação de enzimas (SADDLER *et al.*, 1993; RAMOS e SADDLER, 1994a; RAMOS e FONTANA, 2004; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005). Estruturas microfibrilares de celulose ainda encontram-se parcialmente embebidas em uma matrix amorfa, composta por lignina e hemiceluloses parcialmente modificadas que agem como barreiras naturais à decomposição. Com efeito, uma das maiores dificuldades na implantação de um processo de bioconversão de fitobiomassa reside no alto custo e na baixa atividade específica das enzimas necessárias à sacarificação da celulose (NGUYEN *et al.*, 1999; HAMENLICK *et al.*, 2005).

Além das dificuldades e/ou barreiras descritas acima, o pré-tratamento a vapor também produz inibidores enzimáticos importantes, como, por exemplo, furfural,

hidroximetilfurfural e ácidos fenólicos, que são oriundos da desidratação de pentoses e hexoses e da hidrólise e modificação química da lignina durante o processo. Apesar de que a maior parte destes inibidores possa ser eliminada do material fibroso por simples lavagem aquosa após o pré-tratamento, parte ainda permanece no interior das fibras devido a sua baixa solubilidade ou por mera ineficiência do procedimento de lavagem que, naturalmente, sofre com problemas relacionados à transferência de massas em direção à fase líquida. Durante a hidrólise, compostos inibidores como estes podem ser liberados no meio reacional, aumentando o impacto de fatores que levam à inibição e subsequente perda de eficiência da sacarificação enzimática (MOSIER *et al.*, 2005; TENGBORG *et al.*, 2001; PALMQVIST *et al.*, 1996).

## 2. OBJETIVO

Investigar o pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática de substratos celulósicos obtidos da cana-de-açúcar, na presença e ausência de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) de modo a facultar o aproveitamento integral de fitobiomassa residual por processos químicos e biotecnológicos. Tal objetivo deverá ser alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar quimicamente a palha e o bagaço da cana-de-açúcar para avaliar a adequação destas matérias-primas ao processo de pré-tratamento a vapor;
- Avaliar o efeito da umidade sobre a susceptibilidade do bagaço de cana à explosão a vapor (auto-hidrólise), empregando planejamentos fatoriais do tipo 2<sup>3</sup>;
- Avaliar o efeito da adição de ácido fosfórico diluído ( $H_3PO_4$ ) sobre a susceptibilidade do bagaço de cana à explosão a vapor (auto-hidrólise), empregando planejamentos fatoriais do tipo 2<sup>3</sup>;
- Caracterizar quimicamente as diferentes frações obtidas durante o processo de explosão a vapor e determinar a condição capaz de produzir os melhores rendimentos de recuperação;
- Determinar a condição capaz de produzir o melhor substrato para a hidrólise enzimática de substratos pré-tratados a vapor, empregando preparações enzimáticas comerciais.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

O bagaço e palha de cana-de-açúcar utilizados neste estudo foram obtidos junto à Indústria Sucroalcooeira Melhoramentos S/A (Jussara, PR).

As análises foram realizadas com a palha e com dois tipos de bagaço, oriundos das colheitas mecanizada e manual da cana. A palha seca foi colhida a facção durante a limpeza da cana para a produção de mudas, enquanto que os bagaços foram oriundos de material previamente queimado antes da colheita. O bagaço manual foi produzido a partir de canas cortadas a facção que foram submetidas a uma lavagem antes do processo de moagem, enquanto que o bagaço mecanizado foi colhido por colheitadeiras especiais que cortam a cana em pedaços de 25 cm e que, por esta razão, não são submetidos à lavagem para não haver perda de sacarose no processo.

As enzimas comerciais empregadas neste trabalho corresponderam às preparações Celluclast 1.5L FG<sup>®</sup> e Novozym 188<sup>®</sup> (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), ambas fornecidas pela Novozymes Latin América (Araucária, PR). Celluclast 1.5L FG é uma preparação celulásica produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, enquanto que a Novozym 188 corresponde a uma preparação  $\beta$ -glucosidásica de *Aspergillus niger*.

Todos os reagentes, solventes, padrões cromatográficos e insumos de laboratório envolvidos neste trabalho foram adquiridos em grau analítico e não sofreram qualquer tratamento antes de sua utilização nos procedimentos experimentais descritos abaixo.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Determinação do peso seco de materiais celulósicos

Uma quantidade conhecida de material celulósico foi colocada em pesa filtro previamente pesado. Este material foi colocado em estufa a 105°C por 2 h para a eliminação da umidade. Logo após, o material foi esfriado em dessecador sob vácuo, pesado e o peso seco foi calculado em relação à massa seca do material original.

### 3.2.2. Determinação do teor de cinzas em materiais celulósicos

Uma quantidade conhecida de material celulósico foi acondicionada em um cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, sendo então calcinada em mufla a uma temperatura de 700°C por 2 h, segundo a norma TAPPI T211 om-93. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial.

### 3.2.3. Determinação de Carboidratos Totais

Os carboidratos totais, presentes no extrato aquoso do bagaço original, foram determinados através do método do fenol-sulfúrico descrito por Chaplin *et al.* (1994). As leituras foram efetuadas por espectrofotometria de absorção no visível, empregando o comprimento de onda de 490 nm e a D-glucose como padrão de referência. A faixa de sensibilidade do método foi de 1 a 60 µg, e o volume final da reação foi de 1,4 mL.

### **3.2.4. Determinação de Carboidratos Redutores**

Carboidratos redutores foram determinados no extrato aquoso do bagaço original pelo método de Somogyi-Nelson, como descrito por Chaplin *et al.* (1994). As leituras foram efetuadas por espectrofotometria no visível em 520 nm, usando a D-glucose como padrão de referência. A faixa de sensibilidade do método foi de 10 a 100 µg, e o volume final da reação foi de 6,0 mL.

### **3.2.5. Extraíveis**

Uma quantidade conhecida de bagaço *in natura* ou de palha de cana-de-açúcar foi submetida a um processo de extração em aparelho Soxhlet, com uma seqüência de solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano (DCM), etanol:tolueno (1:2, v/v) (ET) 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 em evaporador rotativo na temperatura de 50°C e o resíduo foi seco em balão previamente tarado. Por diferença de massas, pode-se obter o percentual de cada extrato em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio.

### **3.2.6 Análise química do material celulósico pelo método de Klason**

Para todos os ensaios de análise química, as amostras foram previamente secas em estufa a vácuo na temperatura de 50°C, com posterior determinação gravimétrica dos seus respectivos teores de umidade em estufa a 105°C.



### 3.2.6.1 Determinação do teor de lignina pelo método de Klason

Uma quantidade conhecida de bagaço ou de palha seca, ambos livres de extraíveis (vide 3.2.1), foi tratada com ácido sulfúrico 72% a 20°C por um período de 1 h sob agitação constante. Após este tempo, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% em ácido sulfúrico e a suspensão aquecida em autoclave (118°C) por 1 h para promover a hidrólise total de oligo e polissacarídeos. Posteriormente, filtrou-se a mistura em cadinho de Gooch previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel em ácido, ou lignina de Klason, foi determinada em relação à massa seca de amostra (GOMIDE e DEMUNER, 1986). O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 250 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectroscopia no ultravioleta, através da equação

$$C(g/L) = \frac{4,53(A_l - A_c)}{300},$$

onde  $A_l$  e  $A_c$  corresponde à absorvância em 205 e 280 nm (DENCE e LIN, 1992).

### 3.2.6.2 Determinação dos teores de celulose e hemiceluloses

Alíquotas dos hidrolisados de Klason foram centrifugadas a 10000g, filtradas em membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas em sistema cromatográfico Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, degaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detectores modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp com rede de

fotodiodos para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cation-H e eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. A quantificação foi efetuada por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural (ZANDONÁ, 2001), levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida. Estes fatores, que foram de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético, serviram para converter cada componente nos seus respectivos derivados anidro. Por outro lado, os fatores referentes ao hidroximetilfurfural e furfural, que foram de 0,70 e 0,64, serviram para converter estes compostos em seus respectivos carboidratos de origem (glucose e xilose ou arabinose, respectivamente). Os resultados obtidos para anidrogucose (computados glucose, celobiose e hidroximetilfurfural nesta operação), anidroxilose, anidroarabinose (computados 50% do valor correspondente ao furfural para cada anidroaçúcar) e grupo acetil foram, então, expressos em relação ao peso seco do material original. Finalmente, é importante observar que apenas o ácido fórmico não foi incluído nestas operações, porque sua formação tem origem em reações envolvendo tanto carboidratos quanto a lignina.

### **3.2.7 Condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar**

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar foram pré-tratadas por explosão a vapor sob diferentes condições de temperatura, tempo e teor de umidade, com e sem a adição de ácido fosfórico para catalisar a hidrólise ácida das hemiceluloses.

### 3.2.7.1 Condições de Auto-hidrólise

As condições realizadas para o processo de auto-hidrólise estão dispostas na Tabela 2, onde as quatro primeiras foram executadas com o bagaço seco ao ar (8% de umidade), enquanto que, nas condições 5-8, o bagaço foi umedecido por borrifamento com 200 mL de água destilada. As amostras que foram umedecidas com água, para atingir aproximadamente 50% de umidade, foram acondicionadas em saco plástico selado e conservadas em geladeira por no máximo 24 h. Finalmente, para garantir uma melhor homogeneidade da 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.

A última condição da Tabela 2 foi definida como o ponto central do planejamento fatorial para as condições de auto-hidrólise (PCA), ou seja, 202,5°C por 6 min com o bagaço umedecido com 100 mL de água para atingir aproximadamente 29% de umidade. No entanto, a umidade medida no material umedecido correspondeu a 33% e este foi o dado inserido como referência no planejamento experimental. Para facilitar a determinação da variância do sistema, estas condições centrais foram então realizadas em quadruplicata (experimentos de 9 a 12).

Três experimentos complementares foram realizados para avaliar o efeito de maiores tempos de residência no reator sobre o rendimento de auto-hidrólise do bagaço de cana. O tempo selecionado para estes experimentos (15 min) correspondeu ao sugerido por Silva (1995) em estudos preliminares de otimização da auto-hidrólise do bagaço. As temperaturas de auto-hidrólise ensaiadas foram as de 170, 195 e 210°C (experimentos de 13 a 15) e, como citado acima, o tempo de residência do bagaço de

cana no reator foi mantido em 15 min. Vale ressaltar que estes experimentos foram realizados tão somente para o bagaço de cana de baixo teor de umidade (8%).

TABELA 2 - PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$ , DESENVOLVIDO PARA IDENTIFICAR AS MELHORES CONDIÇÕES DE AUTO-HIDRÓLISE DE AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA CONTENDO DIFERENTES TEORES DE UMIDADE.

<b>Limites</b>	<b>Variáveis</b>		
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Umidade (%)
Limite inferior (-)	4	195	8
Ponto central (0)	6	202,5	33
Limite superior (+)	8	210	50
<b>Experimento</b>	<b>Valores assumidos pelas variáveis do sistema</b>		
1	-1	-1	+1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	+1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	-1
7	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1
Ponto central (PCA)	0	0	0

### 3.2.7.2 Catalise Fosfórica

As condições de pré-tratamento para o bagaço impregnado com ácido fosfórico estão representadas na Tabela 3. A impregnação ácida consistiu no borrifamento de 200 mL de ácido fosfórico 0,5 mol/L (38 mg de ácido/g de bagaço seco) sobre o bagaço de cana seco ao ar, elevando o teor de umidade do mesmo para 50,1%. As amostras impregnadas com ácido fosfórico foram então acondicionadas em saco

plástico selado, que foi conservado e manuseado da mesma forma como anteriormente descrito para o processo de auto-hidrólise.

TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL  $2^3$ , DESENVOLVIDO PARA IDENTIFICAR AS MELHORES CONDIÇÕES DE EXPLOÇÃO A VAPOR DE AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA PREVIAMENTE IMPREGNADAS COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

<b>Limites</b>	<b>Variáveis</b>		
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (mg/g)
Limite inferior (-)	4	195	0
Ponto central (0)	6	202,5	19
Limite superior (+)	8	210	38
<b>Experimento</b>	<b>Valores assumidos pelas variáveis do sistema</b>		
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	-1
7	-1	+1	-1
8	+1	+1	+1
16	-1	-1	+1
17	+1	-1	-1
18	-1	+1	-1
19	+1	+1	+1
Ponto central (PCF)	0	0	0

O ponto central do planejamento fatorial para as condições de catálise fosfórica (PCF) foi também realizado em quadruplicata (experimentos de 20 a 23), na temperatura de 202,5°C por 6 min com impregnação do bagaço de cana com 200 mL de ácido fosfórico 0,25 mol/L (19 mg de ácido/g de bagaço seco).

### 3.2.8 Pré-tratamento do bagaço por explosão a vapor

O pré-tratamento foi realizado utilizando-se um reator de aço inox com capacidade para 5 L, provido de sensores para o acompanhamento da pressão e da temperatura, além de válvulas de controle para entrada de vapor e sua subsequente descompressão. Ao reator está acoplada uma caldeira geradora de vapor, um compressor de ar e um ciclone, empregado para descarga do material e escape de vapores. Este reator está situado no prédio da Usina Piloto B da Universidade Federal do Paraná.

Cerca de 250 g (peso seco) de bagaço de cana, preparado na presença ou na ausência do catalisador (ácido fosfórico), foram introduzidos no reator pré-aquecido. A válvula superior do reator foi então fechada e as válvulas de admissão do vapor foram imediatamente abertas. A partir deste momento, o aumento da temperatura foi acompanhado até que a temperatura desejada fosse atingida; somente então, a contagem do tempo de pré-tratamento foi iniciada. Ao término do tempo de residência do material no reator, as válvulas de entrada do vapor foram fechadas e a válvula de esfera, localizada na base do reator, foi imediatamente aberta através de um atuador pneumático para promover a descompressão do material (explosão). O material pré-tratado foi então arrastado e/ou expandido para o interior de um ciclone, de onde a amostra pré-tratada foi recuperada pela lavagem das paredes internas com água corrente. Em seguida, o bagaço de cana pré-tratado, recuperado do ciclone em suspensão aquosa, foi mantido sob agitação mecânica por 1 h na temperatura ambiente, a uma consistência de aproximadamente 5% (m/v). A suspensão foi então filtrada em um funil de Büchner e as fibras, retidas em uma tela de nylon, foram re-

suspensas em água para serem submetidas a uma nova etapa de lavagem aquosa, nas mesmas condições de extração empregadas anteriormente. Após agitação e posterior filtração para a eliminação dos açúcares solúveis residuais, decorrentes da hidrólise da biomassa durante o pré-tratamento, o material foi novamente lavado com água morna, drenado até o menor gotejamento de líquido em funil de Büchner e reservado para determinação de seu teor de umidade. Os rendimentos das frações insolúveis em água, doravante denominadas BEI, foram determinados gravimetricamente em relação ao peso seco do bagaço de cana inicialmente submetido ao processo.

Os extratos aquosos obtidos após o pré-tratamento, contendo particularmente os açúcares derivados das hemiceluloses por hidrólise ácida, foram recuperados por filtração do bagaço pré-tratado em funil de Büchner sob pressão reduzida. Após medição do volume total do extrato aquoso, alíquotas de 50 mL foram retiradas e imediatamente liofilizadas em liofilizador Jouan, modelo LP3, para determinação dos seus respectivos teores de sólidos totais. Desta forma, os rendimentos das frações solúveis em água, doravante denominadas BES, foram determinados gravimetricamente e expressos em relação ao peso seco do bagaço *in natura*.

Os materiais fibrosos, retidos no funil de Büchner, foram armazenados a 4°C em sacos plásticos selados. Uma quantidade destes materiais foi seca em estufa a 50°C, moída em moinho de facas do tipo Wiley e analisada quimicamente, conforme a metodologia descrita abaixo. Da mesma forma, alíquotas do extrato aquoso foram congeladas a -10°C para subsequente análise dos açúcares livres e de oligômeros remanescentes por cromatografia de fase líquida (CLAE); neste caso, o rendimento de

cada componente identificado também foi expresso em relação ao peso seco do material original, visando o fechamento do balanço de massas do processo.

### **3.2.9 Análise química das frações derivadas do processo de explosão a vapor**

A análise dos principais componentes da fração solúvel em água foi realizada por CLAE. Esta análise foi complementada pela obtenção do espectro no ultravioleta de alíquotas dos extratos aquosos, de onde foi possível avaliar a presença de produtos de desidratação de açúcares e da hidrólise parcial da lignina.

#### **3.2.9.1 Análise química da fração insolúvel em água**

A análise química das frações insolúveis em água (frações BEI), derivadas dos diferentes pré-tratamentos a vapor do bagaço de cana, foi realizada de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.6, somente que, diferentemente do bagaço *in natura*, não houve a necessidade de submetê-las à remoção de extrativos. Os resultados obtidos foram inicialmente expressos em relação ao peso seco do material analisado (fração BEI) e, posteriormente, empregados para o fechamento do balanço de massas do sistema, com base na composição química no material de origem.

#### **3.2.9.2 Análise cromatográfica da fração solúvel em água**

Primeiramente, alíquotas das frações solúveis em água (frações BES), derivadas do bagaço pré-tratado por extração aquosa, foram centrifugadas a 10000G, filtradas em membrana de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas empregando o mesmo sistema



cromatográfico descrito acima. Esta análise foi igualmente realizada para os extratos derivados da primeira e da segunda etapa de lavagem aquosa do bagaço pré-tratado, seja por auto-hidrólise ou por explosão a vapor ácido-catalisada. Os componentes identificados e quantificados nestas duas frações foram convertidos nos seus respectivos derivados anidro (vide item 3.2.6.2) e expressos em relação ao peso seco do material original. Alternativamente, estes resultados foram expressos em relação ao teor de cada componente no material original, o que permitiu determinar, juntamente com os resultados da análise cromatográfica dos hidrolisados de Klason, o balanço de massas de todo o processo de pré-tratamento.

Como todas as frações hidrossolúveis geradas pela explosão a vapor apresentaram alguma presença de oligossacarídeos em sua constituição, foi necessária a realização de uma etapa complementar de pós-hidrólise para garantir uma análise consistente para o fechamento do balanço de massas do sistema. Assim, um volume conhecido do extrato aquoso, oriundo da primeira água de lavagem, foi transferido para um tubo de ensaio ao qual foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 0,5 mol/L. A mistura foi deixada por 2 h em estufa a 105 °C para hidrólise completa dos oligômeros presentes no extrato. Posteriormente, o hidrolisado foi analisado por CLAE conforme o procedimento descrito acima.

### 3.2.9.3 Análise espectrofotométrica no ultravioleta da fração solúvel em água

Os espectros no ultravioleta (UV) dos extratos aquosos (frações BES), obtidos após o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana, foram gerados em espectrofotômetro Varian, modelo Cary-100, mediante varredura entre os comprimentos de onda de 190 a

400 nm. Os espectros obtidos foram normalizados em relação à área para uma melhor comparação entre os diferentes perfis.

### **3.2.10 Determinação da Atividade Celulásica Total**

A IUPAC recomenda a utilização do papel de filtro Whatman #1 como substrato ideal para a determinação da atividade celulásica total. O método realizado neste estudo foi adaptado do procedimento descrito por Ghose (1986).

Tiras de aproximadamente 1 x 8 cm (70 mg) de papel de filtro Whatman #1, recortadas e enroladas, foram adicionadas a tubos de ensaio pré-incubado a 50°C contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L (pH 4,8). A esta mistura foi incorporado 1 mL de solução enzimática em, no mínimo, três diluições diferentes e suficientes para produzir em torno de 1 mg/mL de açúcares redutores. Após 1 h de incubação, a hidrólise foi interrompida com a adição de 3 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e colocada em água fervente por exatamente 5 min para, em seguida, ser resfriada em banho de gelo. Após a homogeneização do meio mediante a inversão dos tubos, uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída para possibilitar a medição da absorvância. A absorvância da solução foi medida em 540 nm e a concentração de açúcares redutores foi determinada contra uma curva de calibração onde a glucose foi utilizada como padrão. A partir destes valores, foi construído um gráfico semilog relacionando as diluições da enzima e suas respectivas concentrações de açúcar redutor (determinadas por DNS), que serviu para determinar, por regressão linear (interpolação), a diluição da enzima necessária para liberar 1 mg/mL de glucose no meio reacional ( $E_{dil}$ ).

A atividade enzimática foi calculada em UPF/mL (unidades de papel de filtro por mL de preparação enzimática) através da seguinte equação,

$$\text{UPF/mL} = \frac{E_{\text{dil}} \cdot V_T \text{ (mL)}}{t \text{ (min)} \cdot 1 \mu\text{mol de glucose (mg)} \cdot V_E \text{ (mL)}}$$

onde  $V_T$  é o volume total da reação (2 mL),  $t$  é o tempo da reação (60 min), 1  $\mu\text{mol}$  de glucose corresponde a 0,18 mg e  $V_E$  é o volume da diluição da enzima que foi empregado no ensaio.

### 3.2.11 Determinação da Atividade Celobiásica Total

A atividade celobiásica foi determinada segundo as recomendações da IUPAC (GHOSE, 1986). Alíquotas de 1 mL da solução enzimática, preparada em três diluições diferentes com capacidade para produzir em torno de 1 mg/mL de glucose, foram pré-incubadas a 50°C e a reação foi iniciada com a adição de 1 mL de uma solução de celobiose a 15 mmol/L em tampão acetato 50 mM, pH 4,8. Após 30 min, reação foi terminada com a imersão dos tubos em água fervente por 5 min. Depois de resfriadas à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10000 rpm, diluídas apropriadamente e os açúcares solúveis produzidos foram analisados por cromatografia de troca iônica (CLAE). Estes dados serviram para construir um gráfico semilog, relacionando as diluições da enzima e suas respectivas concentrações de açúcar redutor (determinadas por DNS), de onde a  $E_{\text{dil}}$  foi determinada por regressão linear (interpolação).

A atividade enzimática foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{UCB/mL} = \frac{E_{\text{dil}} \cdot V_{\text{T}} \text{ (mL)}}{t \text{ (min)} \cdot 2 \text{ } \mu\text{mol glucose (mg)} \cdot V_{\text{E}} \text{ (mL)}}$$

onde  $V_{\text{T}}$  é o volume total da reação (2 mL),  $t$  é o tempo da reação (60 min), 1  $\mu\text{mol}$  de glucose corresponde a 0,36 mg e  $V_{\text{E}}$  é o volume da diluição da enzima que foi empregado no ensaio.

### 3.2.12 Hidrólise Enzimática

A preparação enzimática empregada para a sacarificação dos substratos pré-tratados a vapor continha 50 mL de Celluclast 1.5L FG e 15 mL de Novozym 188, que foram avolumados a 500 mL em balão volumétrico com tampão acetato 50 mM, pH 4,8. Esta preparação foi homogeneizada cuidadosamente para evitar a formação de bolhas e dela foram retiradas alíquotas de 25 mL para as reações de hidrólise, conforme descrito abaixo. A atividade celulásica total desta solução foi determinada em UPF/mL (vide item 3.2.10) e a carga enzimática empregada na hidrólise foi calculada em UPF/g (unidades de papel de filtro por grama de substrato seco) pela seguinte expressão:

$$\text{UPF/g} = \frac{V_{\text{A}} \text{ (mL)} \cdot A \text{ (UPF/mL)}}{M \text{ (g)}}$$

onde  $V_{\text{A}}$  corresponde ao volume total da preparação enzimática empregada na reação,  $A$  é a sua atividade celulásica em UPF/mL e  $M$  é a massa de substrato seco submetida à hidrólise.

A hidrólise enzimática de substratos pré-tratados em diferentes condições foi realizada a uma concentração de 2% (m/v) em relação à massa seca do bagaço pré-tratado (RAMOS, 2004). As amostras foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL e adicionadas de água destilada até um volume de 37,5 mL, incluindo o teor de umidade contido inicialmente na amostra. A esta mistura foram adicionados 37,5 mL de tampão acetato (ácido acético/acetato de sódio) 100 mM, pH 4,8, obtendo um volume de 75 mL em tampão acetato 50 mM. Em seguida, 25 mL da preparação enzimática foram adicionados ao sistema, a partir do que iniciou-se a contagem do tempo de hidrólise.

Os experimentos foram conduzidos por 72 h, sob agitação de 140 rpm, em uma incubadora de agitação orbital pré-aquecida à temperatura de 45°C, sendo que cada hidrólise foi realizada em duplicada e acompanhada pelos respectivos brancos do substrato e da enzima. A carga enzimática utilizada foi de 15 UPF/g de substrato. A liberação de açúcares durante o processo hidrolítico foi monitorada por CLAE, utilizando uma coluna Aminex HPX-87H nas condições descritas no item 3.2.6.2. Aliquotas de aproximadamente 1 mL foram coletadas nos tempos de 4, 8, 24, 48 e 72 h, fervidas por 5 min em banho-maria, centrifugadas a 10000G e imediatamente conduzidas para análise cromatográfica. A diluição empregada em todas as amostras foi de 10 vezes, ou seja, 0,2 mL de amostra para um volume total de 2 mL.

Os componentes monitorados por CLAE foram a celobiose, a glucose e a xilose. Estes valores foram expressos em relação aos seus polissacarídeos de origem, através da multiplicação por seus respectivos fatores de hidrólise. Os rendimentos de

hidrólise foram, então, calculados em relação à quantidade de celulose e hemicelulose presentes no bagaço de cana pré-tratado a vapor.

Para elaboração dos gráficos de hidrólise enzimática da celulose, as concentrações de anidrocelobiose e anidrogucose foram reunidas e expressas em termos de equivalentes de glucose (EqGlc), já que ambas são carboidratos oriundos da celulose propriamente dita. A correlação entre os pontos cartesianos, relacionando tempo de hidrólise com liberação de EqGlc no meio reacional, foi calculada por regressão logarítmica utilizando ferramentas do programa computacional Microsoft Excel 2003.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO E DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR *IN NATURA*

As análises foram realizadas na palha e nos dois tipos de bagaço, denominados manual e mecanizado. É importante salientar que ambos os bagaços foram obtidos pelo mesmo processo, sendo que a diferença entre eles está na forma da colheita da cana. O bagaço manual, após o corte convencional, passou por uma etapa de lavagem antes da moagem, enquanto que o bagaço mecanizado foi do corte diretamente para a moagem. Por esta razão, o bagaço mecanizado é mais escuro, fruto da retenção nas fibras de materiais residuais oriundos da queima da palhada da cana, antes da colheita.

Com o intuito de determinar a quantidade de açúcares livres (principalmente sacarose) nas amostras de bagaço, foram realizadas análises de açúcar total e de açúcar redutor nos extratos aquosos derivados das duas amostras. A Tabela 4 mostra o valor dos sólidos totais, açúcar total e açúcar redutor dos extratos aquosos derivados dos bagaços por lavagem com água fria e água quente. Vale esclarecer que a palha da cana não foi submetida a este procedimento de extração porque seu conteúdo em sacarose é relativamente negligenciável. Além disto, materiais foliares como estes contêm quantidade expressiva de metabólitos secundários que podem interferir no resultado da análise.

A diferença entre açúcar total e açúcar redutor nos extratos aquosos com água fria forneceu uma estimativa da quantidade de sacarose retida nas fibras, porque a sacarose é um dissacarídeo não redutor de alta solubilidade em água. Com base nesta premissa, a quantidade de sacarose residual correspondeu a 0,7 e 1,13% nos bagaços

mecanizado e manual, respectivamente. Além de representar uma pequena perda de processo, estes valores revelam que o bagaço oriundo da colheita mecanizada proporciona um melhor aproveitamento do conteúdo de sacarose da cana, provavelmente devido a uma maior facilidade na moagem dos fragmentos de 25 cm gerados no processo de colheita. Por outro lado, as concentrações de açúcar redutor foram baixas, tanto no bagaço mecanizado (0,13%) quanto no bagaço manual (0,17%), o que pode estar parcialmente relacionado à hidrólise da sacarose, que apresenta uma labilidade hidrolítica bastante pronunciada.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS, AÇÚCAR TOTAL E AÇÚCAR REDUTOR ENCONTRADOS NO BAGAÇO MECANIZADO E MANUAL POR SOLUBILIZAÇÃO COM ÁGUA QUENTE E ÁGUA FRIA.

<b>Extração com:</b>	<b>Bagaço Mecanizado</b>	<b>Bagaço Manual</b>
<b>Água Fria</b>		
Sólidos totais	1,25 %	1,64 %
Açúcar total	0,83 %	1,30 %
Açúcar redutor	0,13 %	0,17 %
<b>Água Quente</b>		
Sólidos totais	13,86%	14,60%
Açúcar total	10,44%	10,94%
Açúcar redutor	1,52%	2,22%

As concentrações de açúcar total e açúcar redutor para a extração com água quente foram consideravelmente maiores do que as obtidas com água fria. Os valores de açúcar total foram de 10,42% para o bagaço mecanizado e de 10,94 % para o bagaço manual, enquanto que os açúcares redutores corresponderam a 1,52 e 2,22%,



respectivamente. Naturalmente, o uso de água quente proporciona a extração parcial de outros componentes oligo- ou polissacarídicos do bagaço, diversificando a natureza química dos carboidratos recuperados no extrato aquoso. Tal resultado evidencia a alta acessibilidade química de pelo menos parte dos carboidratos presentes no bagaço, sugerindo a necessidade de cuidados especiais quando de sua submissão a processos termoquímicos de conversão, já que estes carboidratos de maior acessibilidade serão os primeiros a sofrer reações de desidratação e/ou decomposição no meio reacional.

Na composição química do bagaço e da palha de cana, existem componentes não glicídicos que não estão ligados diretamente à parede celular. Estes metabólitos secundários, denominados extrativos, são substâncias de baixa massa molar que estão envolvidas em várias atividades metabólicas da planta, como a defesa contra organismos invasores e a síntese de macromoléculas de função estrutural ou de reserva (D'ALMEIDA, 1988).

Com o intuito de caracterizar estes metabólitos secundários, foram realizadas extrações com solventes de diferentes polaridades. A Tabela 5 representa a porcentagem de extraíveis obtida em cada solvente a partir das amostras de palha e de bagaço de cana. O total de compostos extraíveis foi de 6,7, 6,8 e 11,5% para o bagaço mecanizado, o bagaço manual e a palha de cana, respectivamente. O solvente que extraiu a maior quantidade de substâncias das amostras de bagaço foi a mistura etanol:tolueno, seguido pelo etanol, enquanto que, para a palha, a água quente gerou o maior percentual de extraíveis.

Para identificar os grupos funcionais presentes nos extraíveis de cada solvente utilizado para extração, foram realizadas análises por espectrometria no infravermelho

com transformada de Fourier (FTIR). Para cada tipo de solvente de extração, os espectros de FTIR dos extraíveis isolados das duas amostras de bagaço (mecanizado e manual) foram muito semelhantes, razão pela qual um único conjunto de espectros se encontra apresentado na Figura 11.

TABELA 5 - PERCENTUAL DE COMPOSTOS EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO E DA PALHA.

<b>Solventes</b>	<b>Bagaço Mecanizado</b>	<b>Bagaço Manual</b>	<b>Palha</b>
DCM	1,1 ± 0,2%	1,2 ± 0,1%	1,7 ± 0,1%
EtOH:Tol	2,8 ± 0,1%	2,5 ± 0,2%	3,1 ± 0,2%
EtOH 95%	1,7 ± 0,2%	1,9 ± 0,2%	0,6 ± 0,1%
Água	1,1 ± 0,1%	1,2 ± 0,2%	6,1 ± 0,3%

A análise por FTIR demonstrou que os compostos extraídos em diclorometano e etanol:tolueno pertencem à famílias semelhantes, de baixa polaridade, como pode ser notado pela predominância de deformações axiais de CH em CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> em 2920 e 2850 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, e pelas deformações angulares em CH<sub>3</sub> e CH<sub>2</sub> em 1423 e 1463 cm<sup>-1</sup> (Figura 11). Em 1604 e 1514 cm<sup>-1</sup>, observam-se vibrações estruturais de anel aromático, confirmado pela deformação axial de C-H de anel em 2953 cm<sup>-1</sup>. A banda localizada na região de 3400-3300 cm<sup>-1</sup> foi atribuída às deformações axiais de O-H associado, enquanto que bandas na região de 1029 e 1168 cm<sup>-1</sup> correspondem provavelmente às deformações axiais de C-O em álcoois primários e de O-C-O em acetais e éteres glicéricos, respectivamente.

Nos espectros de FTIR dos extratos em etanol (Figura 11), foi observada a predominância de deformações axiais de O-H na região centrada em 3331 cm<sup>-1</sup>,

característica de hidroxilas fortemente associadas. Esta evidência é confirmada pela detecção de bandas de deformação axial de CO-H em  $1035$  e  $1109\text{ cm}^{-1}$ , relativa à presença de álcoois primários e secundários, respectivamente. Associando a esses sinais as bandas de deformação axial de CH em  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  (em  $2918$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ ) e de deformação angular de CH em  $\text{CH}_3$  e  $\text{CH}_2$  ( $1404$  e  $1462\text{ cm}^{-1}$ ), podemos inferir que este extrato etanólico é composto majoritariamente por carboidratos.

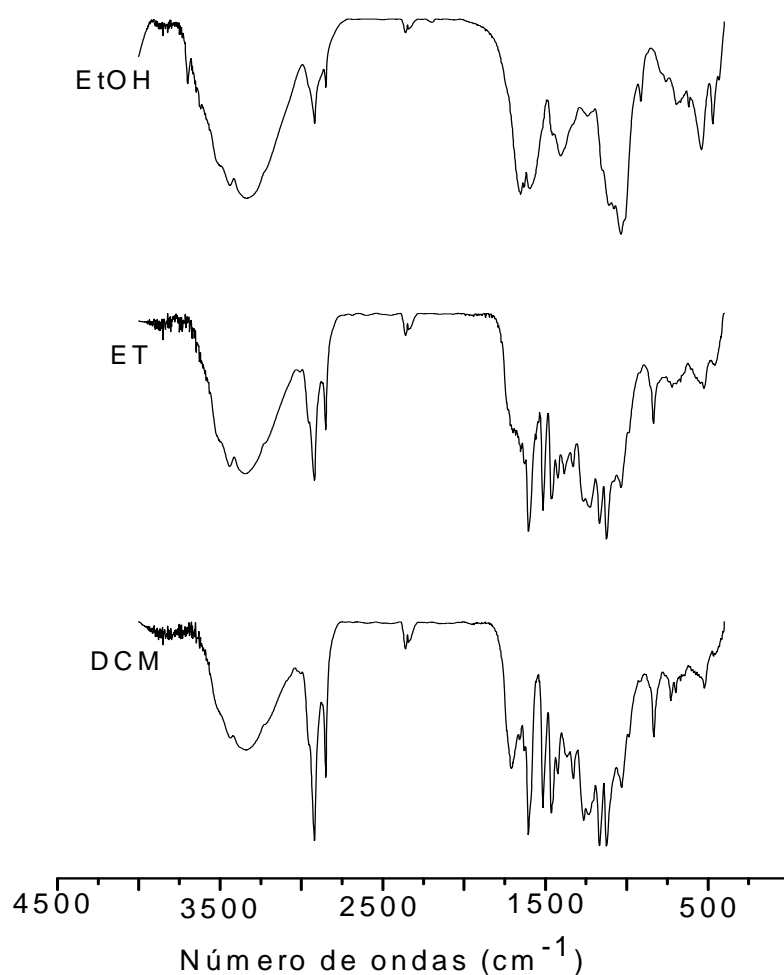


FIGURA 11 - ESPECTRO DE FTIR DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENO (ET) E ETANOL (EtOH) DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Para as análises de FTIR realizadas para os extraíveis da palha (Figura 12), notou-se grande semelhança entre os espectros oriundos da extração com diclorometano (DCM), etanol:tolueno (ET) e etanol (EtOH). O único fator que diferenciou um espectro do outro foi a intensidade das bandas, cujas atribuições foram análogas às já apresentadas para os extratos das amostras de bagaço.

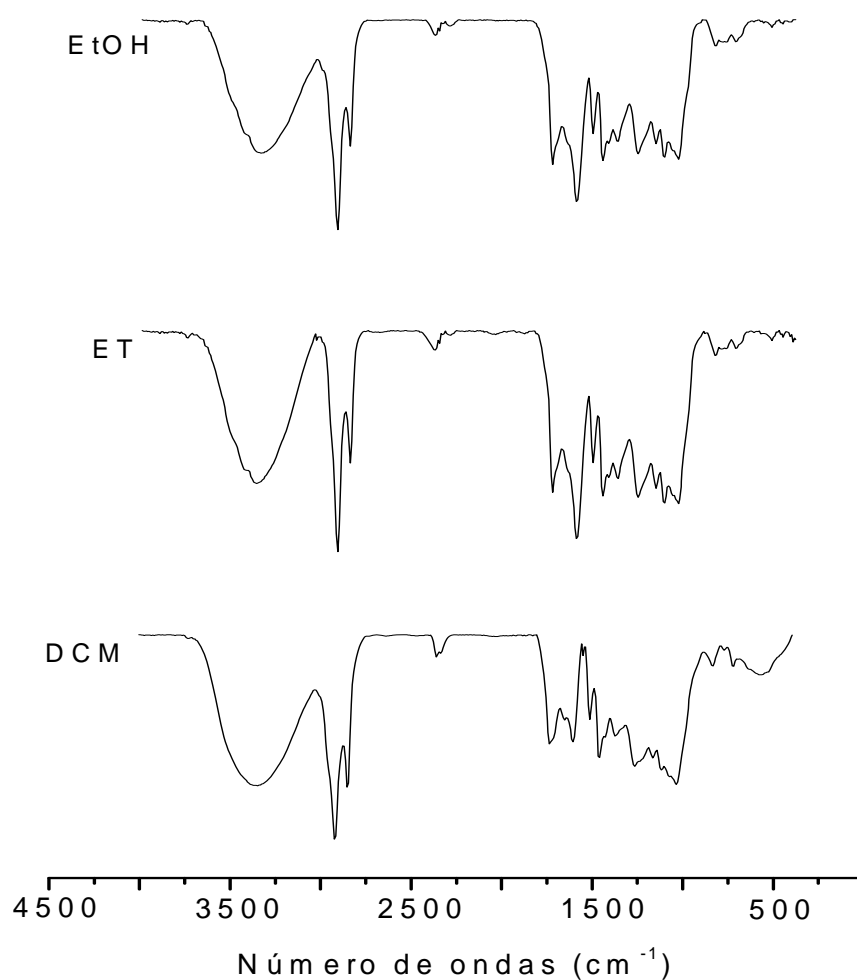


FIGURA 12 - ESPECTRO DE FTIR DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENO (ET) E ETANOL (EtOH) DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Pelo método de determinação de lignina proposto por Klason e modificado por Gomide e Demuner (1986), foi possível determinar a quantidade de lignina total das amostras de bagaço e de palha livres de extrativos, bem como quantificar os principais monômeros constituintes dos polissacarídeos por análise cromatográfica dos hidrolisados de Klason. Na Tabela 6, encontram-se registrados os teores percentuais de anidrogucose, anidroxilose, anidroarabinose e grupo acetil para os bagaços e para a palha da cana. Percebe-se, novamente, que os resultados relativos aos bagaços foram muito semelhantes entre si, enquanto que os da palha foram bastante diferentes. As porcentagens de celulose (anidrogucose) foram de 41,8%, 41,1% e 34,4% para o bagaço mecanizado, o bagaço manual e a palha, respectivamente. Os teores de anidroxilose (xilanas) nestas mesmas amostras foram de 17,5%, 17,2% e 13,4%, respectivamente, enquanto que as porcentagens de anidroarabinose (presente como substituintes da cadeia principal de xilanas) foram de 2,5%, 2,6% e 1,9%. Finalmente, os teores de hemiceluloses totais presentes no bagaço mecanizado, no bagaço manual e na palha foram de 22,9%, 22,7% e 18,4%, respectivamente, sendo que os teores de grupamentos acetil, sempre em relação à massa seca de amostra, foram de 3,2%, 3,1% e 2,1%.

O furfural (F) observado no hidrolisado das amostras de bagaço e de palha de cana resultou da hidrólise e desidratação de unidades de xilose e arabinose presentes nas hemiceluloses (Figura 8). Da mesma forma, a quantidade de hidroximetilfurfural (HMF) presente nos hidrolisados teve origem na desidratação de hexoses como a glucose (Figura 9).

TABELA 6 - PERCENTUAL MÁSSICO DOS COMPONENTES CONSTITUINTES DE AMOSTRAS SECAS E LIVRES DE EXTRAÍVEIS DO BAGAÇO MECANIZADO. BAGAÇO MANUAL E DA PALHA DE CANA.

<b>Componente</b>	<b>Bagaço Mecanizado</b>	<b>Bagaço Manual</b>	<b>Palha</b>
Anidroglucose <sup>1</sup>	41,8 ± 0,2	42,1 ± 0,3	34,4 ± 0,2
Anidroxilose <sup>2</sup>	17,5 ± 0,2	17,2 ± 0,2	13,4 ± 0,1
Anidroarabinose <sup>2</sup>	2,5 ± 0,1	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,1
Grupo Acetil <sup>2</sup>	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Lignina Insolúvel <sup>3</sup>	29,4 ± 0,1	30,0 ± 0,2	39,7 ± 0,2
Lignina Solúvel	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Hidroximetilfurfural	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1
Furfural	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	3,1 ± 0,2
<b>Total</b>	<b>99,0</b>	<b>99,7</b>	<b>95,8</b>

<sup>1</sup> Presente no bagaço e na palha como componente das  $\beta$ -(1-4)-D-glucanas (celulose)

<sup>2</sup> Presente no bagaço e na palha como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses)

<sup>3</sup> Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído

Os cromatogramas dos hidrolisados de Klason estão apresentados na Figura 13, onde se percebe que os dois bagaços e a palha possuem perfis cromatográficos semelhantes, quando analisados com detector de índice de refração. O cromatograma mostra quatro picos, sendo o primeiro referente à glucose (Glc), o segundo à xilose (Xyl), o terceiro à arabinose (Ara) e o quarto ao ácido acético. Os cromatogramas obtidos com o detector de absorção no ultravioleta (Figura 14) não mostraram diferenças em relação ao perfil cromatográfico dos bagaços e da palha, sendo que, neste caso, observa-se a presença isolada de dois picos, correspondentes ao furfural (F) e ao hidroximetilfurfural (HMF). Estes resultados demonstram, ao menos qualitativamente, que há equivalência entre a natureza química dos polissacarídeos presentes no bagaço e na palha da cana.

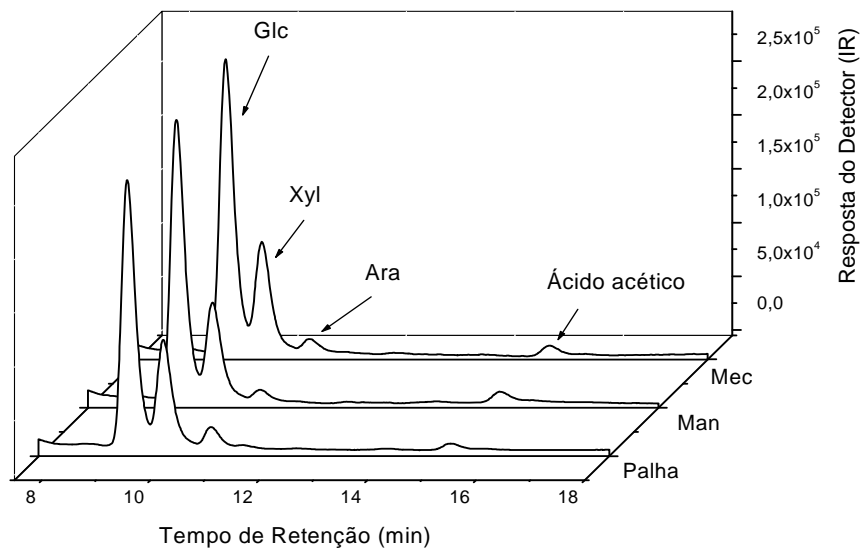


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DOS HIDROLISADOS DE KLASON DO BAGAÇO MECANIZADO (MEC), DO BAGAÇO MANUAL (MAN) E DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, COM DETECÇÃO POR REFRACTOMETRIA DIFERENCIAL.

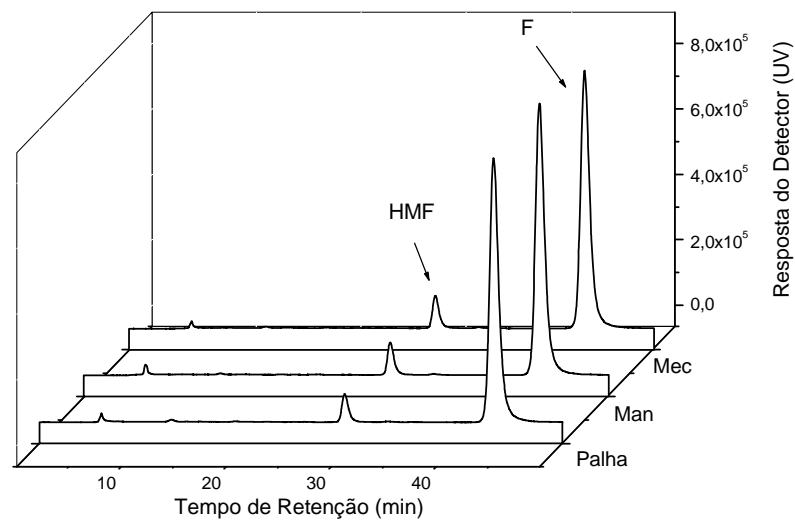


FIGURA 14- PERFIL CROMATOGRÁFICO DO HIDROLISADO DE KLASON COM DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV EM 280 nm, COM IDENTIFICAÇÃO DOS PICOS DE HIDROXIMETILFURFURAL (HMF) E FURFURAL (F).

Os teores de cinzas no bagaço mecanizado, no bagaço manual e na palha foram, respectivamente, de 3,1%, 2,4% e 11,7%. Assim, a diferença relativamente pequena entre as amostras de bagaço persistiu. No entanto, o teor de cinzas na palha foi muito grande, se comparado ao dos bagaços, e isto está particularmente relacionado à presença de sílica na estrutura pilosa disposta na superfície das folhas.

Comparativamente ao bagaço de cana, o alto teor de cinzas presente na palha (11,7%) pode ser considerado um problema para o pré-tratamento a vapor, pois além de diminuir o potencial energético da matéria-prima para o processo de fermentação, acarreta um aumento na capacidade tamponante da matéria-prima, levando a uma neutralização parcial dos catalisadores ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa. Além disso, o alto teor de cinza pode causar maior abrasão e corrosão do equipamento. Outro fator interessante a ser observado é o alto teor de lignina da palha, que se mostrou consideravelmente superior ao do bagaço. Portanto, a palha da cana-de-açúcar deve apresentar uma menor susceptibilidade ao pré-tratamento e subsequente conversão via processos fermentativos. Esta hipótese não foi investigada neste trabalho porque, além dos fatores citados acima, as amostras obtidas junto à empresa não foram consideradas suficientemente representativas do processo por estarem excessivamente secas e danificadas pelo transporte.

#### 4.2 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Todos os experimentos de pré-tratamento a vapor foram realizados com o bagaço mecanizado devido a sua maior disponibilidade e facilidade de coleta junto à empresa que forneceu matéria-prima para este trabalho.



Após submissão das amostras de bagaço da cana ao pré-tratamento por explosão a vapor, as mesmas foram lavadas e filtradas para a separação da fração solúvel (BES) e fração insolúvel (BEI) em água. A eficiência do pré-tratamento foi, então, avaliada baseando-se no rendimento de recuperação destas frações ao longo do processo. O rendimento para cada pré-tratamento foi obtido através da diferença de massa entre o bagaço pré-tratado e o bagaço inicial. Por outro lado, outros métodos de análise, tanto cromatográfica quanto espectrométrica, permitiram a determinação da composição química destas frações, cujos valores serviram para fechar o balanço de massas de todo o sistema.

Durante o período pré-estabelecido para o pré-tratamento, a evolução da temperatura no reator foi avaliada a cada 15 s, desde o momento da abertura das válvulas de pressurização. A Figura 15 apresenta um comportamento típico da temperatura no interior do reator. O tempo médio para a evolução da temperatura em todos os experimentos realizados neste estudo foi de  $65 \pm 17$  s.

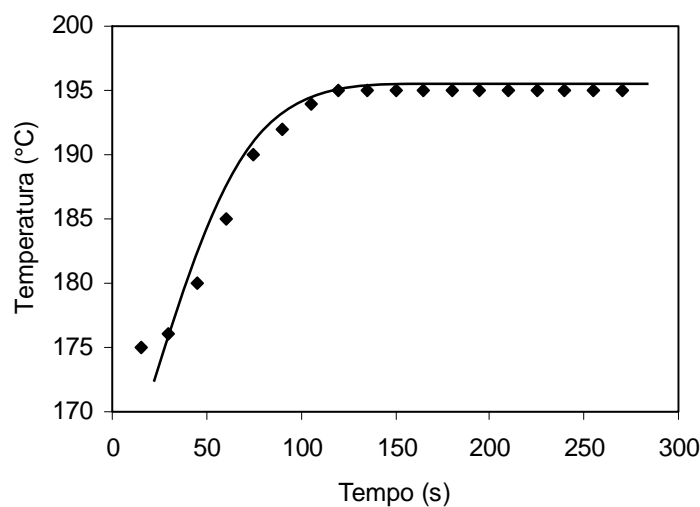


FIGURA 15 - EXEMPLO TÍPICO DA EVOLUÇÃO DA TEMPERATURA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO BAGAÇO DE CANA NO REATOR.

#### 4.2.1 Planejamento fatorial associado à auto-hidrólise do bagaço de cana

Os efeitos sobre o rendimento de auto-hidrólise das variáveis temperatura, tempo de residência no reator e umidade das amostras de bagaço foram avaliados utilizando um planejamento fatorial do tipo  $2^3$ . Os limites estabelecidos para as variáveis estudadas (Tabela 2) foram definidos a partir de estudos realizados anteriormente (RAMOS, 2003; GALVÃO, 2001).

Em geral, os rendimentos totais de recuperação decresceram com o aumento da drasticidade do pré-tratamento (Tabela 7). As amostras submetidas a condições de pré-tratamento mais suaves resultaram em um maior rendimento percentual de fibras (BEI), indicando uma menor solubilização do material lignocelulósico. Nestes experimentos, o maior rendimento de recuperação, em relação ao peso seco do bagaço *in natura*, foi de 86,3%, que correspondeu a 65,5% em BEI, 20,8% em BES e 13,7% em perdas por volatilização de eventuais sub-produtos da reação (hidroximetilfurfural, furfural, etc.). A condição que proporcionou este rendimento envolveu a auto-hidrólise do bagaço úmido (50% de umidade) por 4 min a 195°C.

No ponto central do planejamento realizado para a auto-hidrólise do bagaço (Tabela 7), pode-se observar uma média de  $72,7 \pm 1,2\%$  para o rendimento total de recuperação do processo, o que implica em um desvio padrão relativo de apenas 1,65% para pré-tratamentos realizados em quadruplicata. Portanto, os rendimentos obtidos no ponto central demonstraram que o procedimento empregado neste trabalho apresenta uma boa repetibilidade.

TABELA 7 - RENDIMENTOS OBTIDOS PARA A AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DA CANA, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO 2<sup>3</sup> DESCRITO NA TABELA 2.

Exp.	Massa (g)	t <sub>0</sub> <sup>1</sup> (s)	Condições	Rendimento (%) <sup>2</sup>		
				BES <sup>3</sup>	BEI <sup>3</sup>	Total
1	224,6	81	4 min, 195°C, 8% umidade	21,0	60,2	81,2
2	225,8	67	8 min, 195°C, 8% umidade	20,1	59,0	79,1
3	223,9	72	4 min, 210°C, 8% umidade	19,7	60,4	80,1
4	224,1	69	8 min, 210°C, 8% umidade	17,0	57,8	74,8
5	224,2	78	4 min, 195°C, 50% umidade	20,8	65,5	86,3
6	225,1	66	8 min, 195°C, 50% umidade	20,9	64,4	85,3
7	227,4	60	4 min, 210°C, 50% umidade	21,6	64,7	76,1
8	227,0	75	8 min, 210°C, 50% umidade	21,3	54,5	75,8
9	226,2	78	6 min, 203°C, 33% umidade	19,8	52,6	72,4
10	226,7	76	6 min, 203°C, 33% umidade	18,8	54,3	73,1
11	226,4	80	6 min, 203°C, 33% umidade	17,9	53,2	71,1
12	226,7	79	6 min, 203°C, 33% umidade	18,6	55,4	74,0
PCA <sup>4</sup>	226,5±0,2	78	6 min, 203°C, 33% umidade	18,8±0,8	53,9±1,3	72,7±1,2

<sup>1</sup> t<sub>0</sub> = tempo para atingir a temperatura de explosão

<sup>2</sup> Calculado em relação ao peso seco do bagaço

<sup>3</sup> BES = bagaço explodido a vapor, fração solúvel; BEI: bagaço explodido a vapor, fração insolúvel

<sup>4</sup> PCA = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para a auto-hidrólise do bagaço.

A Tabela 8 apresenta a influência das principais variáveis do processo sobre o rendimento de recuperação das frações BEI e BES, abordando tanto os efeitos principais quanto os decorrentes de interações secundárias e terciárias entre estas variáveis. A partir destes valores, foi possível observar que todos os efeitos principais foram estatisticamente significativos em relação à fração BEI, sendo que o tempo (-2,9 pontos percentuais) e a temperatura (-3,5 pontos percentuais) influenciaram negativamente os rendimentos de recuperação, enquanto que o teor de umidade apresentou um efeito positivo de 2,9 pontos percentuais. Já em relação à fração BES, o

único efeito principal estatisticamente significativo foi o teor de umidade, que influenciou positivamente a recuperação do extrato aquoso em 1,7 pontos percentuais. Por outro lado, pode se observar que os efeitos de segunda ordem influenciaram negativamente a recuperação da fração BEI, enquanto que, para a fração BES, nenhuma interação de 2 fatores apresentou qualquer significado estatístico. Finalmente, os valores obtidos para a interação de 3 fatores (efeitos de terceira ordem) não foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o desvio padrão do planejamento.

TABELA 8 - EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE DESCRITOS NA TABELA 2.

<b>Efeito</b>	<b>Fração BES</b>	<b>Fração BEI</b>	<b>Rendimento Total</b>
$2\Sigma (E^+ + E^-)/N$	DP = 1,4	DP = 2,3	DP = 1,2
<i>Efeitos principais</i>			
Tempo (t)	-1,0	-3,8	-2,9
Temperatura (T)	-1,0	-2,9	-3,5
Umidade (U)	1,7	2,9	2,3
<i>Interação de 2 fatores</i>			
t x T	-0,6	-2,6	-2,4
t x U	1,0	-1,9	-2,3
T x U	1,4	-2,4	-2,8
<i>Interação de 3 fatores</i>			
t x T x U	0,7	-1,9	0,2

$E^+$  = efeito dos níveis positivos;  $E^-$  = efeito dos níveis negativos;

N = números de experimentos; DP = desvio-padrão

A Figura 16 mostra o diagrama de representação geométrica dos rendimentos obtidos para as frações solúvel (BES, Figura 16A) e insolúvel (BEI, Figura 16B) em

água. O aumento da temperatura e do tempo de residência do bagaço no reator (tempo de pré-tratamento) diminuiu o rendimento de recuperação das frações BES e BEI em alguns pontos percentuais (Tabela 8) e isto foi observado em praticamente todas as situações envolvidas neste estudo. Tal comportamento não era esperado, pois menores rendimentos da fração BEI deveriam ter acarretado maiores rendimentos da fração BES. Este comportamento foi atribuído a perdas por volatilização de subprodutos formados durante o pré-tratamento que, provavelmente, estão associadas a reações de hidrólise e desidratação de pentoses e hexoses.

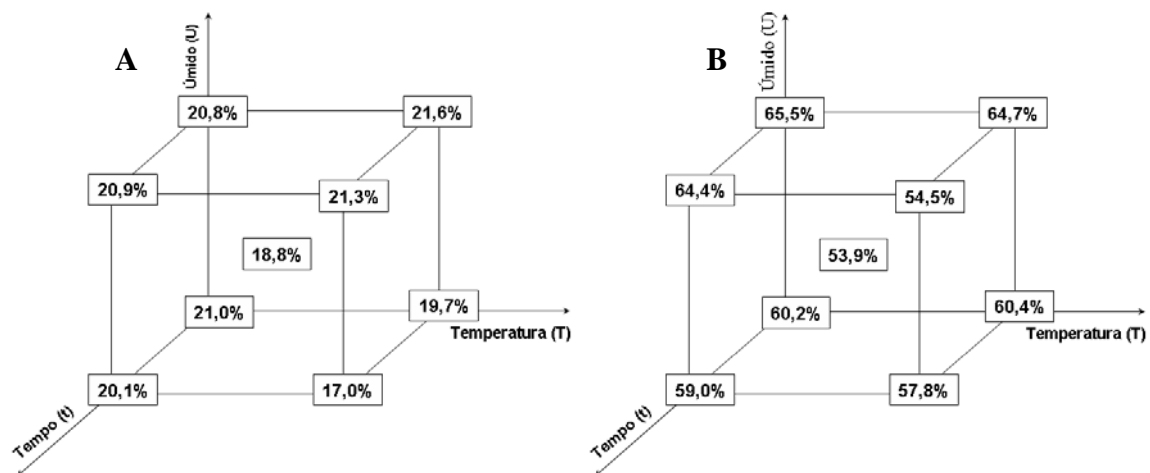


FIGURA 16 - DIAGRAMA DE REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS RENDIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEIS (BES, A) E INSOLÚVEIS (BEI, B) EM ÁGUA.

A Figura 17 mostra os espectros no ultravioleta (UV) das frações solúveis em água obtidas a partir dos substratos pré-tratados. Através destes espectros, pode-se observar que a intensidade de absorção a 280 nm sofreu um aumento significativo com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, indicando maiores índices de hidrólise e

subseqüente desidratação dos carboidratos presentes na biomassa. Tais reações induzem à formação de furfural e hidroximetilfural, que possuem absorção máxima em 280 nm e apresentam absorvidades molares ( $\epsilon_{\text{máx}}$ ) de 3239 L.cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup> e 20156 L.cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, compostos aromáticos derivados da lignina também podem ter sido liberados em solução, contribuindo, portanto, com o aumento na intensidade do perfil espectral. A maior absorção ocorreu na auto-hidrólise do bagaço seco (8% de umidade) a 210°C por 8 minutos, que, a priori, seria a condição de maior drasticidade dentre todas as testadas nestes estudos.

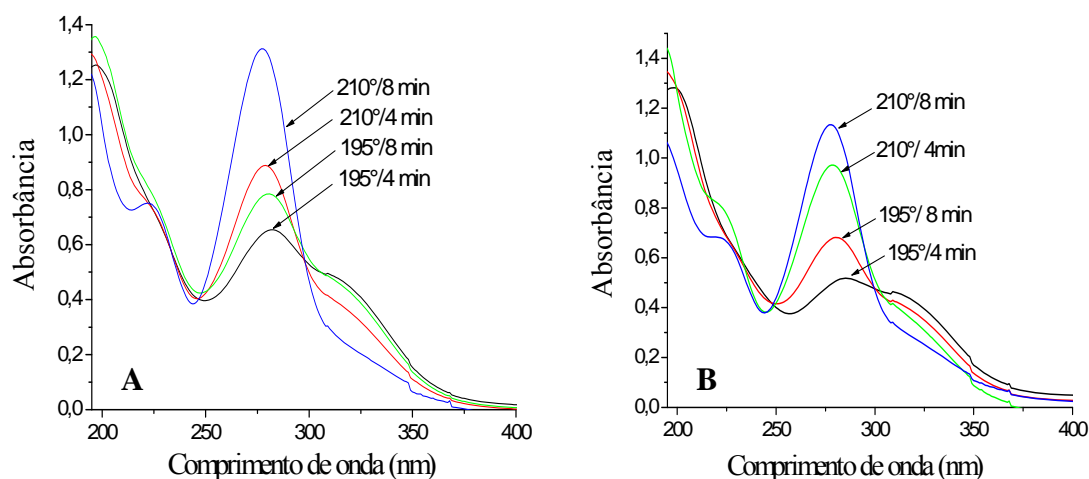


FIGURA 17 - ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DECORRENTE DO PROCESSO DE AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA: (A) 8% DE UMIDADE E (B) 50% DE UMIDADE.

Os extratos aquosos (1<sup>a</sup>. e 2<sup>a</sup>. filtrações) derivados da auto-hidrólise do bagaço foram submetidos à análise cromatográfica com o intuito de determinar suas respectivas composições químicas. As Figuras 18 e 19 apresentam os perfis cromatográficos dos extratos aquosos obtidos da primeira filtração, registrados com

detectores de índice de refração (RID) e de espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV).

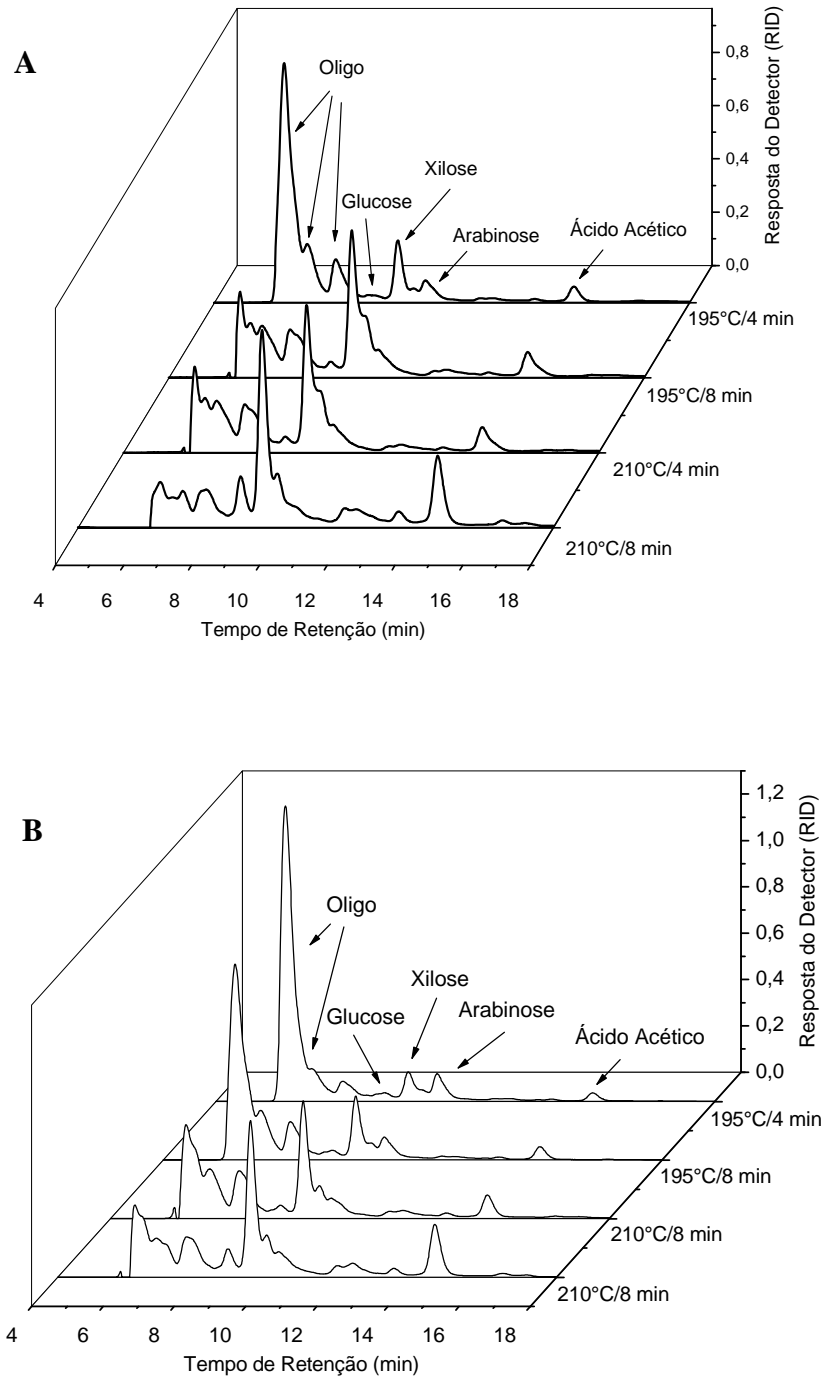


FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE PARA BAGAÇO SECO (8% UMIDADE) (A) E BAGAÇO ÚMIDO (50% DE UMIDADE) (B).

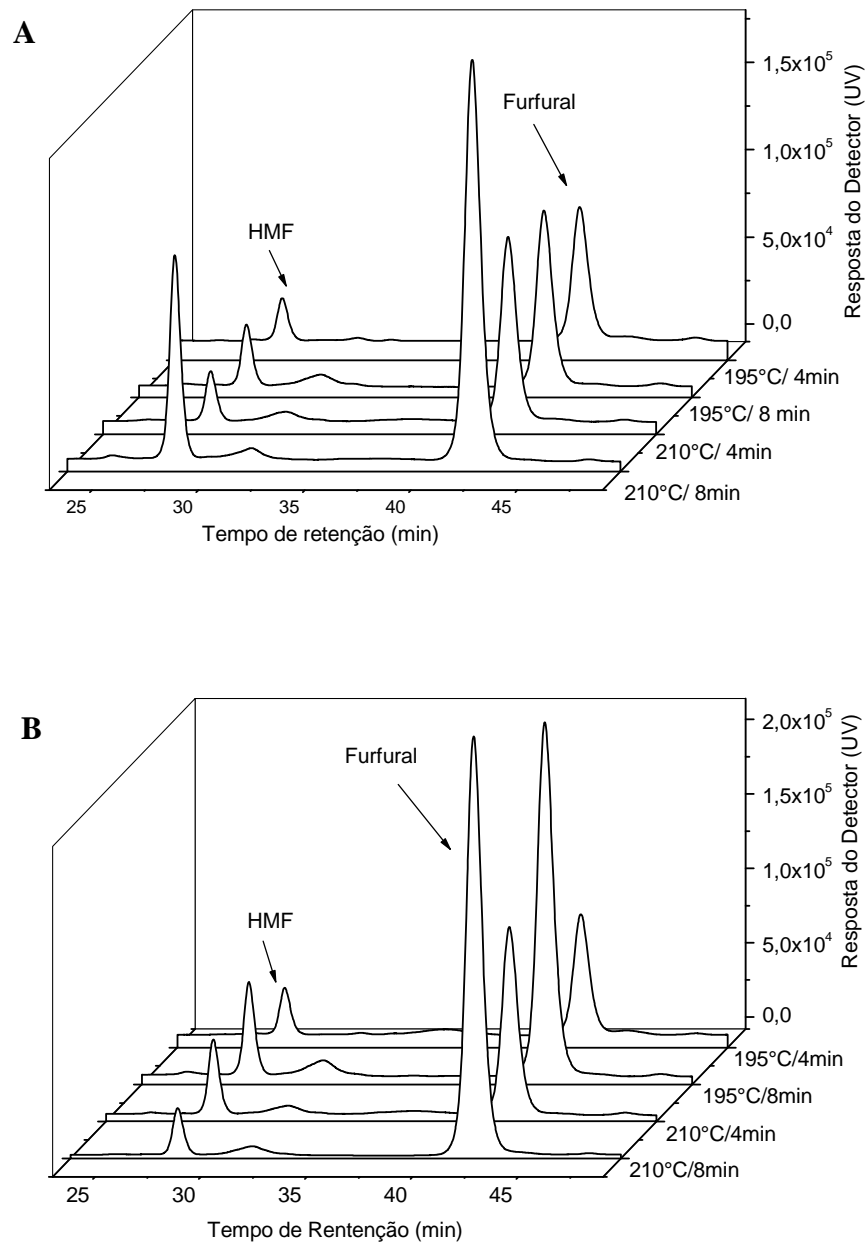


FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRAFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS DE AUTO-HIDRÓLISE PARA O BAGAÇO SECO (8% DE UMIDADE) (A) E BAGAÇO ÚMIDO (50% DE UMIDADE) (B), OBTIDOS COM DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV .

O aumento da drasticidade do pré-tratamento acarretou um aumento bastante significativo da concentração de carboidratos nos extratos aquosos, com o



concomitante aumento da concentração de xilose em relação à população de oligossacarídeos identificados na região de 6 a 8,5 min de tempos de retenção. Porém, nestas condições, ocorreu pouca liberação de glucose no meio, sugerindo que a celulose não sofreu hidrólise em grande extensão, mesmo sob as condições mais drásticas de auto-hidrólise.

Os experimentos realizados com o bagaço úmido (50% de umidade) resultaram em maiores índices de recuperação da fração BES. Isto foi interpretado como fruto da diminuição da drasticidade do pré-tratamento em comparação à auto-hidrólise do bagaço com 8% de umidade, porque parte do calor latente de vaporização do sistema foi direcionada ao aquecimento da água incorporada ao bagaço. Esta hipótese pode ser confirmada pela análise cromatográfica da fração BES (Figura 18), que indicou a presença de maiores quantidades de oligossacarídeos nos produtos de auto-hidrólise do bagaço úmido.

As análises cromatográficas dos extratos aquosos da auto-hidrólise (BES) demonstraram que algumas amostras continham uma quantidade significativa de oligossacarídeos cuja quantificação não foi possível por falta de resolução cromatográfica. Com intuito de quantificar todos os carboidratos presentes nos extratos aquosos, na forma de açúcares livres, os extratos aquosos da primeira filtração foram submetidos a uma pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído e as amostras foram reanalisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos com a pós-hidrolise se encontram na Tabela 9.

A recuperação das hemiceluloses nas frações BES é um indicador importante para avaliar a eficiência da auto-hidrólise. O melhor rendimento foi obtido a 210°C por

4 min para o bagaço com 8% de umidade (experimento 3), resultando na solubilização de quase 90% dos açúcares presentes nas hemiceluloses do bagaço *in natura*. No entanto, é preciso enfatizar que estes carboidratos se encontravam principalmente na forma oligomérica e que foram liberados na forma livre em decorrência do procedimento de pós-hidrólise.

TABELA 9 - ANÁLISE QUANTITATIVA BASEADA NOS HIDROLISADOS SULFÚRICOS DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA (BES), PREPARADAS ATRAVÉS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.

Exp.	pH	Componente (g)						
		AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo Acetil	Ácido Fórmico	HMF	Furfural
1	5,0	3,26	24,43	3,79	4,76	1,39	0,05	0,20
2	5,0	2,82	21,70	3,05	6,97	1,86	0,09	0,38
3	4,0	3,48	35,92	3,56	6,81	1,70	0,20	0,40
4	4,0	2,08	25,06	2,56	7,85	2,35	0,34	1,01
5	4,5	3,04	26,67	4,33	5,19	1,55	0,07	0,22
6	4,5	2,51	27,79	2,59	4,51	1,34	0,08	1,28
7	4,0	3,18	29,62	3,74	8,32	2,40	0,30	0,22
8	4,0	3,82	27,48	4,58	8,68	1,64	0,76	1,12
9	4,0	3,88	31,15	3,05	8,12	1,62	0,15	0,62
10	4,0	3,69	29,68	2,86	7,75	1,84	0,18	0,61
11	4,0	3,77	30,29	3,09	7,82	1,68	0,13	0,55
12	4,0	3,98	29,72	2,85	7,65	1,79	0,17	0,58
PCA <sup>1</sup>	4,0	3,83	30,21	2,96	7,80	1,73	0,16	0,59
DP <sup>2</sup>	-	0,12	0,59	0,11	0,18	0,08	0,02	0,03

<sup>1</sup> PCA = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para a auto-hidrólise do bagaço.

<sup>2</sup> DP = desvio-padrão

A quantidade de ácido acético liberado na fração solúvel em água aumentou com a drasticidade do pré-tratamento, alcançando quase 3% em relação a massa do bagaço seco. Portanto, condições mais drásticas de auto-hidrólise resultaram na desacetilação praticamente completa das hemiceluloses presentes no bagaço.

A xilose foi, em todos os pré-tratamentos, o monossacarídeo predominante nos extratos aquosos hidrolisados, seguido da arabinose e da glucose. Por outro lado, presença de ácidos orgânicos no hidrolisado possui diferentes origens: o ácido acético é gerado pela desacetilação das heteroxilanas (hemiceluloses), enquanto que o ácido fórmico advém da degradação da lignina e da eventual desidratação das hexoses (Figura 9). Finalmente, o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural provêm de reações de hidrólise e desidratação da celulose e hemiceluloses, respectivamente.

Os valores apresentados na Tabela 10 demonstram que o pré-tratamento por explosão a vapor teve grande influência sobre a composição química da fração insolúvel em água. O conteúdo de xilana do bagaço de cana decresceu de 17% no bagaço original para 2% na fração BEI do pré-tratamento realizado com bagaço seco ao ar (8% de umidade) a 210°C por 8 min (experimento 4 da Tabela 10). Portanto, nas condições de maior drasticidade, aproximadamente 92% da xilana presente no bagaço foi hidrolisada durante o pré-tratamento, sendo que a maior parte deste componente (80%) foi recuperada na fração solúvel em água (vide balanços de massas de auto-hidrólise para o experimento 4, Tabela 11).

Com a remoção das hemiceluloses pela lavagem aquosa, o teor de lignina dos substratos aumentou em relação ao teor de lignina do bagaço não tratado. Nas condições de maior drasticidade (experimento 4), a lignina recuperada na fração

insolúvel passou de 29% do bagaço original para 34% no bagaço pré-tratado. A quantidade de glucose na fração insolúvel também foi aumentada em comparação com o bagaço original (*in natura*). O aumento na quantidade de lignina e de glucanas no bagaço pré-tratado ocorre principalmente pela remoção das hemiceluloses, embora outros fatores tais como hidrólise parcial de regiões mais acessíveis da celulose e da lignina possa ter contribuído na modificação da composição química do bagaço.

TABELA 10 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICAS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS EM ÁGUA (BEI), PREPARADAS ATRAVÉS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO.

Exp.	Componentes (g)						Total
	Lignina		Celulose AnGlc	Hemicelulose		Cinza	
	Solúvel	Insolúvel		AnXyl	AnAra		
BM <sup>1</sup>	1,26	29,44	42,01	17,48	2,53	3,10	95,81
1	0,27±0,01	32,13±0,16	54,87±0,15	7,46±0,10	1,91±0,04	2,22±0,24	98,86
2	0,50±0,01	31,32±0,17	56,73±0,33	5,31±0,01	0,88±0,02	2,38±0,15	97,12
3	0,53±0,12	33,60±0,42	50,62±0,42	6,83±0,45	0,96±0,11	2,95±0,24	97,49
4	0,82±0,01	34,30±0,35	58,02±0,31	2,11±0,03	0,79±0,09	2,49±0,14	98,53
5	0,22±0,01	29,4±0,06	51,02±0,35	4,66±0,33	1,20±0,07	2,44±0,10	98,94
6	0,36±0,01	30,60±0,10	53,48±0,32	8,71±0,15	0,78±0,02	3,21±0,12	98,14
7	0,51±0,03	32,20±0,28	55,68±0,41	6,07±0,25	0,68±0,02	3,07±0,05	99,21
8	0,62±0,06	31,60±0,32	52,74±0,30	6,42±0,16	0,69±0,05	3,59±0,02	95,66
9	0,52±0,01	29,74±0,37	56,65±0,41	5,67±0,22	0,60±0,03	3,76±0,19	96,94
10	0,53±0,06	30,40±0,41	58,39±0,12	5,72±0,16	0,61±0,04	3,47±0,08	99,12
11	0,49±0,09	30,60±0,21	58,24±0,12	5,59±0,07	0,64±0,03	3,52±0,03	99,08
12	0,48±0,03	30,10±0,41	58,18±0,13	5,81±0,09	0,57±0,06	3,03±0,06	98,17
PCA <sup>2</sup>	0,51±0,02	30,20±0,33	57,87±0,81	5,70±0,09	0,60±0,03	3,45±0,31	98,33±0,91

<sup>1</sup> BM = bagaço mecanizado

<sup>2</sup> PCA = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para a auto-hidrólise do bagaço.

O balanço de massa para a auto-hidrólise do bagaço de cana (Tabela 11), realizada com material seco ao ar a 210°C por 4 min (experimento 3), indicou que 88,1% da glucose originalmente presente no bagaço *in natura* foi recuperada nas frações BES (3,3%) e BEI (84,8%) do pré-tratamento. De modo análogo, a recuperação das hemiceluloses atingiu 96,4% da xilose (na forma de xilanas) presente no bagaço *in natura*, sendo 81,0% na fração BES e 15,4% na fração BEI. Os menores percentuais de recuperação de arabinose indicam que este monossacarídeo é mais susceptível à reações de desidratação sendo, provavelmente, a fonte mais importante para o acúmulo de furfural no extrato aquoso. A lignina do bagaço também parece ter sido consideravelmente degradada no processo, pois apenas 81,5% deste componente foi detectado na fração BEI do pré-tratamento.

De um modo geral, todos os pré-tratamentos realizados com maiores tempos de residência do bagaço no reator resultaram em perdas consideráveis nos índices de recuperação de celulose e hemiceluloses. Portanto, conclui-se que a auto-hidrólise a altas temperaturas e menores tempos de residência no reator é preferível a temperaturas mais baixas e maiores tempos de residência no reator.

O maior percentual de recuperação de xilose (97,30%) foi obtido na auto-hidrólise do bagaço com 50% de umidade a 210°C por 4 min (experimento 7). Nestas condições, a recuperação de glucose (enquanto glucanas) foi de 76,23%. Já no caso da arabinose, os melhores rendimentos de recuperação foram obtidos nas condições de menor drasticidade (195°C, 4 min), onde se obteve percentuais de 81,2 e 83,0% para o pré-tratamento do bagaço seco ao ar (8% de umidade) e umedecido com água destilada (50% de umidade), respectivamente.

TABELA 11 - BALANÇO DE MASSA DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.

Componentes (%)	Experimentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>BES</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	4,38	3,76	3,30	2,76	4,14	2,60	3,74	4,86
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	78,77	72,33	81,04	79,86	79,04	69,50	85,32	83,75
AnAra	74,58	67,59	57,13	56,52	73,52	69,66	75,49	76,26
Grupo Acetil	53,68	56,20	54,40	55,80	44,60	49,40	42,90	51,16
<b>BEI</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	78,64	79,69	84,79	75,4	79,51	82,04	72,49	80,98
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	15,70	14,72	15,39	12,71	16,44	14,1	11,98	10,68
AnAra	8,44	6,78	7,47	6,39	7,75	6,93	8,51	6,54
<b>Lignina</b>								
Solúvel	12,89	23,41	16,57	20,81	27,01	28,72	24,74	26,84
Insolúvel	65,69	62,76	64,96	65,15	71,58	71,62	55,35	74,25
<b>Total</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	83,02	83,45	88,09	78,16	83,65	84,64	76,23	85,84
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	94,47	87,05	96,43	92,57	95,48	88,60	97,30	94,43
AnAra	83,02	74,37	64,60	62,91	81,27	71,59	84,00	82,80
Grupo Acetil	53,68	56,20	54,40	55,80	44,60	49,40	42,90	51,16
<b>Lignina</b>								
	78,58	86,17	81,53	85,96	98,59	100,34	80,09	101,09

Finalmente, percentuais de recuperação da lignina de Klason, da ordem de 65 a 74%, foram obtidos para a condição mais severa (210°C, 8 min) de auto-hidrólise, sugerindo que as reações de hidrólise preponderaram sobre reações de condensação.

Este fato é importante porque a geração de materiais poliméricos, que se comportam como lignina durante o procedimento de Klason, já foi amplamente relatada por outros autores para o pré-tratamento a vapor de diferentes tipos de fitobiomassa (RAMOS, 2003; EMMEL *et al.*, 2003; EXCOFFIER *et al.*, 1991).

Todos os substratos obtidos nestes estudos de auto-hidrólise foram submetidos a uma condição padrão de hidrólise enzimática, com intuito de verificar qual condição de pré-tratamento produziu o melhor substrato para as enzimas. Os resultados obtidos para os substratos gerados nos experimentos de auto-hidrólise (Tabela 2) são mostrados na Figura 20.

O aumento da drasticidade do pré-tratamento proporcionou um aumento da acessibilidade das enzimas ao substrato. Este aumento pode ser observado tanto para os substratos obtidos do bagaço com 8% de umidade (Figura 20A) quanto para os substratos obtidos do bagaço com 50% de umidade (Figura 20B). O melhor rendimento em equivalentes de glucose foi obtido para os pré-tratamentos realizados a 210°C por 8 min, onde o percentual de hidrólise foi de quase 100% de equivalentes de glucose em relação ao teor de celulose presente nos bagaços pré-tratados a vapor. O ponto central (PCA) para os experimentos de auto-hidrólise proporcionou rendimento de  $92,0\% \pm 1,4$  de equivalentes de glucose em 72 h de reação.

Os resultados mostram que tanto a temperatura quanto o tempo de residência no reator influenciam a hidrólise da celulose à glucose. Os pré-tratamentos realizados a 195°C mostraram-se mais eficientes para hidrólise da celulose presente nos substratos derivados do bagaço seco ao ar (8% de umidade), enquanto que os experimentos realizados a 210°C apresentaram-se mais eficientes para os substratos derivados do

bagaço úmido (50% de umidade). Naturalmente, o bagaço umedecido com água destilada exigiu temperaturas superiores para atingir níveis adequados de severidade no pré-tratamento.

A 195°C por 8 min, o melhor resultado obtido após 72 h de hidrólise foi de 87% para o bagaço seco ao ar e de 85% para o bagaço úmido. Em contrapartida, os resultados obtidos para os pré-tratamentos realizados a 210°C por 8 min foram de 97 e 99% para bagaço seco ao ar e para o bagaço úmido (50% de umidade), respectivamente.

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de muitos fatores que envolvem desde as características do substrato até natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (glucose e celobiose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato, desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação necessárias ao processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem à porosidade e cristalinidade das fibras de celulose, teor de lignina e o teor de hemiceluloses (PALONE *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 1999).

O pré-tratamento a vapor causa redução do tamanho das partículas, abertura dos microporos e aumento da área superficial do material (MICHALOWCZ *et al.*, GALBE *et al.*, 2002). Estas alterações na estrutura são responsáveis pela melhora do ataque enzimático, sendo que o aumento da drasticidade do pré-tratamento produz um substrato com maior acessibilidade à ação enzimática. A presença de lignina no substrato não impediu o processo de sacarificação da celulose. Este fato pode ser observado nos experimentos de maior drasticidade, onde, apesar dos substratos



apresentarem alto teor de lignina, foi possível hidrolisar 99% da celulose em 72 h de reação.

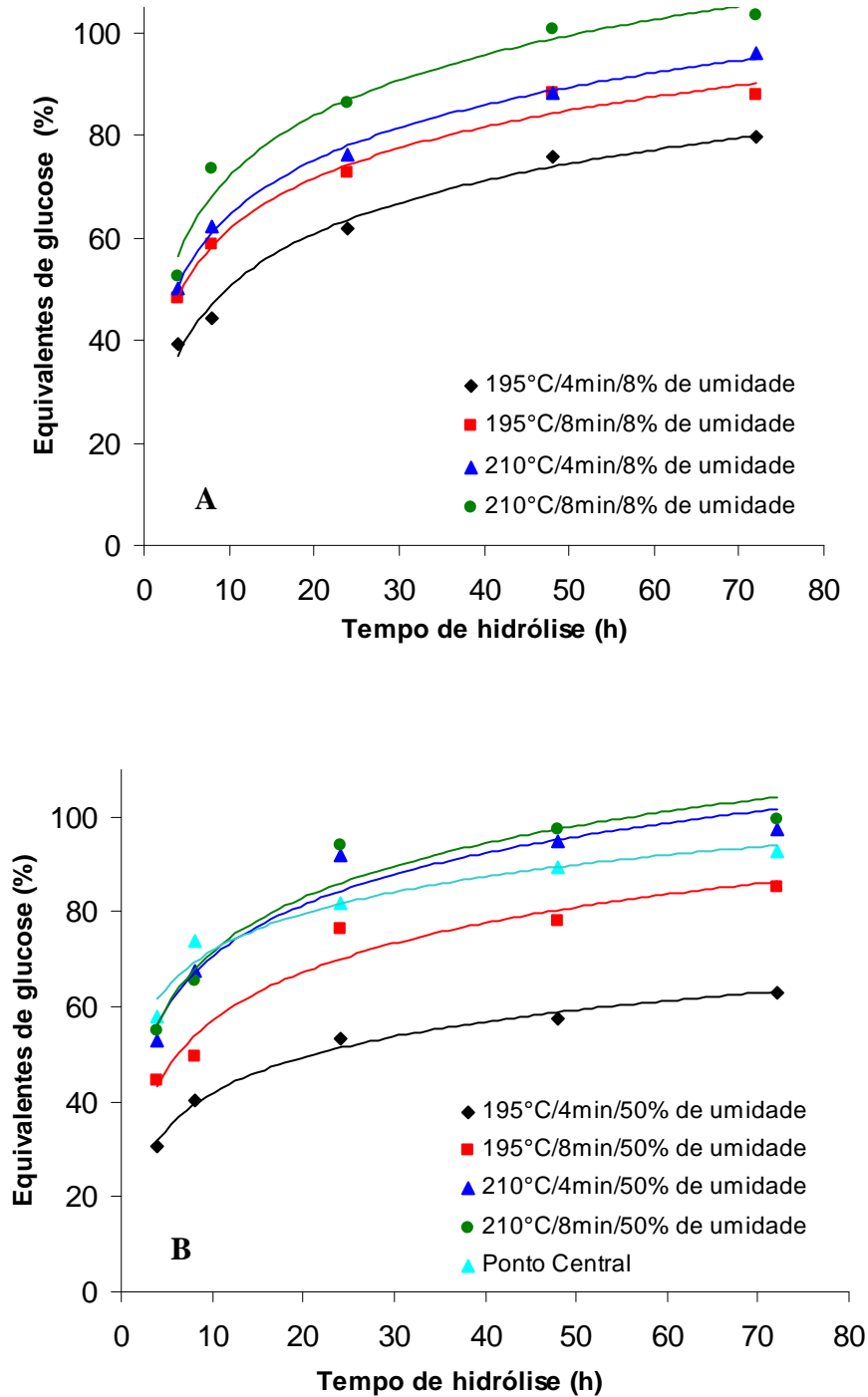


FIGURA 20 - QUANTIDADE DE EQUIVALENTES DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS DERIVADOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO COM 8% UMIDADE (A) E DE BAGAÇO COM 50% DE UMIDADE (B).

Na Tabela 12 apresenta as quantidades de celobiose e xilose obtidas durante a hidrólise enzimática do bagaço. Nota-se que, com passar do tempo, a quantidade de celobiose no meio diminuiu, enquanto que a quantidade de xilose aumentou. Este fato foi observado em todos os experimentos realizados por auto-hidrólise.

TABELA 12 - QUANTIDADES DE CELOBIOSE E XILOSE PRODUZIDAS PELA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR.

Exp.	Componentes (g)									
	Celobiose					Xilose				
	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
1	0,22	0,19	0,15	0,11	0,10	0,51	0,57	0,76	0,97	1,04
2	0,33	0,32	0,31	0,29	0,24	0,44	0,45	0,58	0,64	0,72
3	0,25	0,24	0,15	0,14	0,11	0,42	0,53	0,65	0,87	0,89
4	0,41	0,37	0,33	0,25	0,26	0,16	0,24	0,29	0,33	0,34
5	0,14	0,12	0,10	0,08	0,05	0,49	0,76	0,94	1,02	1,12
6	0,13	0,11	0,09	0,05	0,04	0,39	0,45	0,76	0,79	0,85
7	0,24	0,22	0,16	0,10	0,09	0,22	0,30	0,45	0,48	0,50
8	0,25	0,20	0,14	0,12	0,13	0,23	0,28	0,45	0,49	0,51
PCA <sup>1</sup>	0,28	0,27	0,17	0,11	0,08	0,25	0,35	0,49	0,53	0,57
DP <sup>2</sup>	0,03	0,01	0,01	0,01	0,02	0,03	0,04	0,01	0,06	0,07

<sup>1</sup> PCA = média do ponto central do planejamento associado aos experimentos de auto-hidrólise.

<sup>2</sup> Desvio padrão.

A baixa concentração de celobiose se deve à presença de  $\beta$ -glucosidases no meio reacional em quantidade suficiente para garantir a sua hidrólise à glucose, evitando assim a inibição retroativa das celulasas, principalmente exoglucanases (RAMOS, 1992; WASZCZYNSKYJ, 1991). Por outro lado, o aumento da xilose livre pode ser atribuído à presença de enzimas xilanolíticas no meio (dentre elas, a

endoglucanase EG I de *T. reesei*) e, também, ao aumento da acessibilidade das enzimas ao substrato após o pré-tratamento a vapor.

#### **4.2.2 Efeito do aumento do tempo de pré-tratamento sobre a auto-hidrólise do bagaço**

Este estudo foi realizado para avaliar o efeito do aumento do tempo de residência do bagaço de cana no reator de 4 a 8 min para 15 min e, ao fazê-lo, comparar os resultados com dados disponíveis na literatura. Estudos de otimização revelaram que 190°C seria a temperatura ideal para este tempo de residência no reator (CUNHA, 2001, 2005; SILVA, 1995). Portanto, três níveis de temperatura foram testados neste estudo (170, 195 e 210°C), a fim de avaliar a reprodutibilidade dos dados anteriormente publicados na literatura especializada.

Os rendimentos totais de pré-tratamento, para estes novos experimentos foram de 73,2% (170°C), 67,9% (195°C) e 60,7% (210°C) (Tabela 13), indicando uma queda dos índices de recuperação com o aumento da temperatura no reator. Uma interpolação para a temperatura de 190°C na regressão linear desta base de dados sugere que o rendimento a 190°C por 15 min seria de aproximadamente 68%. Portanto, diferentemente do comportamento observado por outros autores (CUNHA, 2001,2005; SILVA, 1995), o aumento do tempo de residência no reator acarretou maiores perdas no processo de pré-tratamento, já que os rendimentos de recuperação para tempos de residência de 4 e 8 min foram consideravelmente maiores (81,2 e 79,1% nas linhas 1 e 2 da Tabela 7). Esta queda de rendimento foi naturalmente atribuída à prolongada

exposição do material a altas temperaturas e ao subsequente aumento dos índices de desidratação dos carboidratos presentes no bagaço.

TABELA 13 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA SECO AO AR (8% DE UMIDADE) SOB O MESMO TEMPO DE RESIDÊNCIA DO REATOR (15 MIN).

Exp.	Massa (g)	$t_0^1$ (s)	T <sup>2</sup> (°C)	Rendimento (%) <sup>3</sup>		
				BES <sup>3</sup>	BEI <sup>4</sup>	Total
13	227,3	66	170	12,6	60,6	73,2
14	226,9	69	195	13,0	54,9	67,9
15	226,1	78	210	13,4	47,3	60,7

<sup>1</sup>  $t_0$  = tempo (em segundos) para atingir a temperatura de pré-tratamento

<sup>2</sup> T = temperatura (°C)

<sup>3</sup> Calculado em relação ao peso seco do bagaço

<sup>4</sup> BES = fração solúvel do bagaço pré-tratado; BEI = fração insolúvel do bagaço pré-tratado

Os perfis cromatográficos dos extratos aquosos (Figura 21) confirmaram o aumento na quantidade de açúcar livre com o aumento da temperatura de pré-tratamento, paralelamente a um efeito proporcional sobre o acúmulo de produtos de desidratação nos extratos aquosos (Figura 22). Na condição mais drástica (210°C), houve baixa quantidade de oligossacarídeos em solução, com o concomitante aumento de xilose e glucose na fração BES. Pode-se também observar que o aumento da drasticidade acarretou um aumento significativo na liberação de ácido acético, que está diretamente associado à desacetilação das hemiceluloses presentes no bagaço, fato este também observado por outros autores (CUNHA, 2001; LOMAX *et al.*, 1994).

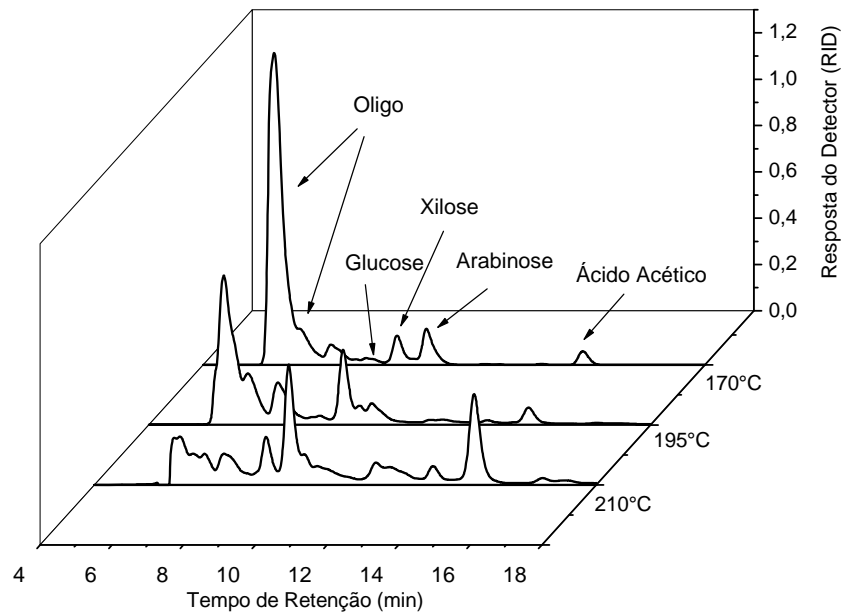


FIGURA 21 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO, OBTIDO COM DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO (RID) PARA EXPERIMENTOS REALIZADOS POR UM TEMPO DE RESIDÊNCIA DE 15 MIN.

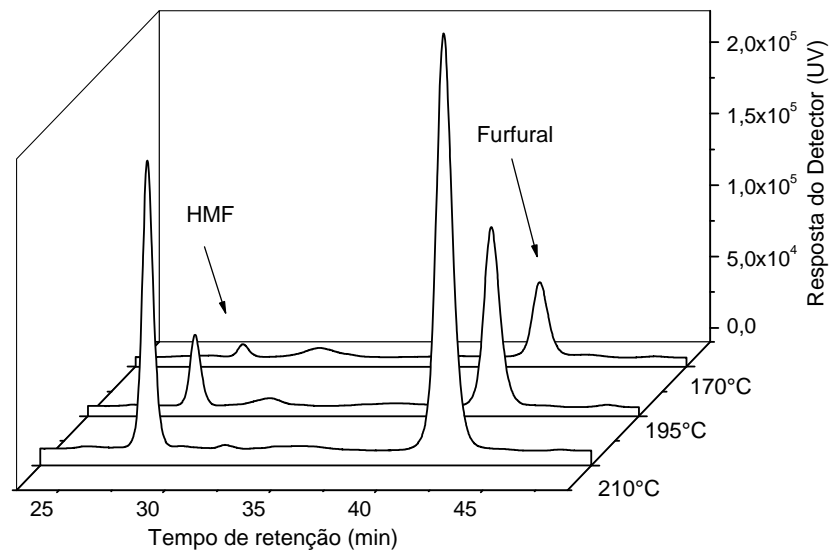


FIGURA 22 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO, OBTIDO POR ESPECTROMETRIA NO ULTRAVIOLETA (UV) PARA EXPERIMENTOS REALIZADOS POR UM TEMPO DE RESIDÊNCIA DE 15 MIN.

Estudos realizados anteriormente para o pré-tratamento a 210°C por 15 min apresentaram resultados diferentes ao obtido neste estudo. Segundo Silva (1995), o pré-tratamento realizado nestas condições proporcionou a solubilização de 42% do material pré-tratado, sendo que destes 67% foram perdidos ou/e contabilizados na forma de compostos não identificados. Os rendimentos de recuperação de glucose e de lignina obtidos por Silva (1995) na fração BEI foram de 32,9 e 27%, sendo que, neste trabalho, foi possível recuperar 54 e 31% destes componentes.

Silva (1995) também realizou um experimento a 165°C por 15 min e o resultado obtido foi 11% na solubilização do material pré-tratado, resultado semelhante ao obtido neste estudo para temperaturas de 170°C (12,6% de rendimento na fração BES). Os rendimentos de recuperação da glucose também foram semelhantes: 45,7% para este estudo e de 42,1% no realizado por Silva (1995). Portanto, levando em consideração o teor de glucose presente no bagaço original (42 e 43%, respectivamente), estes resultados se apresentaram congruentes, apesar da pequena diferença de temperatura (5°C) entre os dois experimentos.

Ao compararmos os valores obtidos neste trabalho (experimento 14) com os disponíveis na literatura sobre a composição química do bagaço da cana pré-tratado por auto-hidrólise (Tabela 14), percebe-se que pequenas diferenças na temperatura de auto-hidrólise não causaram grande alteração nos teores relativos de cada um dos componentes. No entanto, o aumento da temperatura em 5°C diminuiu a quantidade de xilose na fração BEI, que passou de 6,4 a 9,9% (CUNHA, 2001, 2005; SILVA, 1995) para os 5,5% observados neste trabalho.

A Tabela 13 também permite observar que o pré-tratamento a 195°C por 15 min causou aumento significativo no teor de lignina do material pré-tratado (fração BEI), fato este atribuído à prováveis reações de condensação da lignina com componentes presentes no meio reacional. Estas reações seriam responsáveis pela formação de estruturas de alta massa molar que são parcialmente insolúveis em meio ácido e, por isto, se comportam como lignina no procedimento de Klason (SILVA, 1995; RAMOS *et al.*, 1999; SAWASA *et al.*, 1991; MCDONOUGH, 1993).

TABELA 14 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS DERIVADOS DA AUTO-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA.

<b>Componentes</b>	<b>Cunha (2005)<sup>1</sup></b>	<b>Cunha (2001)<sup>1</sup></b>	<b>Silva (1995)<sup>1</sup></b>	<b>Este trabalho<sup>2</sup></b>
Anidroglucose	57,50	54,00	60,00	54,48
Anidroxilose	9,90	6,40	6,80	5,49
Grupo Acetil	0,70	0,90	0,33	Nd
Lignina Solúvel	0,60	0,87	1,19	0,75
Lignina Insolúvel	27,30	28,20	28,30	30,31
Cinzas	2,70	3,48	1,54	2,02

<sup>1</sup> Pré-tratamento a 190°C por 15 min;

<sup>2</sup> Pré-tratamento a 195°C por 15 min

Os substratos gerados neste estudo também foram submetidos à hidrólise enzimática e os resultados obtidos estão representados na Figura 23. O pré-tratamento realizado a 170°C produziu um substrato com pouca acessibilidade ao ataque enzimático, pois, em 72 h de reação, apenas 40% da celulose foi hidrolisada. Este resultado foi atribuído principalmente à menor severidade do processo de pré-

tratamento, que proporcionou pouca modificação na organização estrutural do bagaço de cana.

O substrato obtido pelo pré-tratamento a 195°C apresentou maior acessibilidade à hidrólise enzimática do que o realizado a 210°C. Os rendimentos obtidos nestas duas condições foram de 93% (48 h) para experimento realizado a 195°C e de 90% (72 h) para os experimentos realizados a 210°C. Este resultado pode ser justificado pela exposição prolongada do bagaço de cana a altas temperaturas, pois o aumento da severidade do pré-tratamento favorece a formação de produtos de desidratação dos carboidratos (furfural e hidroximetilfurfural) e degradação da lignina que restringem a acessibilidade do substrato às enzimas (HSU, 1996).

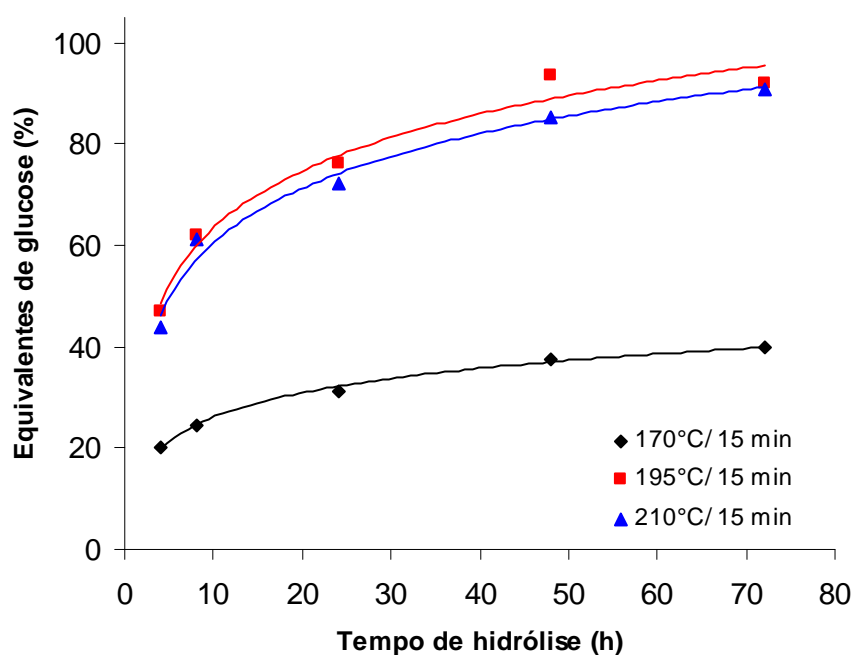


FIGURA 23 - QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS POR AUTO-HIDRÓLISE PELO TEMPO DE 15 MIN.



Os resultados obtidos com a hidrólise enzimática permitem concluir que pré-tratamentos realizados a altas temperaturas (210°C) por tempos residência muito prolongados no reator (15 min) não favorecem a reatividade do substrato às enzimas, proporcionando hidrólise incompleta da celulose, devido, provavelmente, ao acúmulo de compostos que inibem a atividade hidrolítica das enzimas, tais como furfural, hidroximetilfurfural e ácidos fenólicos (LASER *et al.*, 2002; MOSIER *et al.*, 2005).

#### **4.2.3 Planejamento fatorial associado ao pré-tratamento por catálise fosfórica do bagaço de cana**

Os efeitos benéficos do uso de catalisador ácido durante a explosão a vapor de materiais lignocelulósicos tem sido bem documentada na literatura. Assim, os usos de HNO<sub>3</sub> (SADDLER *et al.*, 1982), SO<sub>2</sub> (RAMOS *et al.*, 1992a) e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído (GALVÃO *et al.*, 2001; EMMEL *et al.*, 2003) têm sido relatados para aumentar a recuperação total das frações pré-tratadas, assim como a susceptibilidade dos resíduos insolúveis à hidrólise enzimática e/ou bioconversão.

A utilização de soluções diluídas ácido fosfórico tem mostrado resultados promissores para o tratamento de biomassa (FONTANA *et al.*, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2005). O uso de soluções diluídas de ácido fosfórico como catalisador, comparativamente aos procedimentos que utilizam ácidos mais fortes como o ácido sulfúrico, apresentam menor efeito destrutivo sobre as pentoses, com menor acúmulo de furfural no meio de reação (GÁMEZ *et al.*, 2005). Os substratos produzidos a partir dos pré-tratamentos que utilizam ácido sulfúrico também necessitam de alguma forma neutralização após o pré-tratamento. Isto adiciona novos passos ao processo, com

implicações inevitáveis nos custos operacionais. Além disso, estes ácidos promovem a corrosão interna dos equipamentos, exigindo a construção de reatores mais resistentes e, portanto, mais caros. Contrariamente, o ácido fosfórico, adicionado ao pré-tratamento na forma de soluções diluídas, além de não necessitar destes cuidados, pode constituir fonte adicional de nutrientes para processos fermentativos, particularmente na forma de fosfato de amônio (FONTANA *et al.*, 2001; DESCHAMPS *et al.*, 1996).

Os estudos realizados com o bagaço impregnado com ácido fosfórico apresentaram menores rendimentos em relação ao bagaço úmido (50% de umidade) empregado como referência (Tabela 15).

Conforme as expectativas, amostras de bagaço submetidas a condições de pré-tratamento mais severas resultaram em um menor rendimento percentual de fibras (BEI), indicando uma maior solubilização do material lignocelulósico na fração solúvel em água (BES) (Tabela 15). O ponto central do planejamento (PCF) gerou rendimentos médios de  $67,7 \pm 1,4\%$  para pré-tratamentos realizados em quadruplicata. Portanto, os rendimentos obtidos no ponto central também retrataram a confiabilidade dos procedimentos empregados neste estudo.

Os rendimentos dos pré-tratamentos realizados na presença de ácido fosfórico foram avaliados em relação à temperatura, tempo de residência do material no reator e presença ou não do catalisador, conforme as condições descritas na Tabela 3. Os efeitos obtidos para cada variável estudada estão dispostos na Tabela 16.

Todos os efeitos de principais ( $t$ ,  $T$ ,  $[H_3PO_4]$ ) foram estatisticamente significativos em relação à recuperação da fração BEI, sendo que o mais pronunciado foi aquele associado à impregnação com ácido fosfórico. Enquanto os aumentos do

tempo e da temperatura acarretaram quedas de 4,3 e 3,5 pontos percentuais na recuperação de BEI, o emprego de ácido fosfórico levou a uma redução de 9,2 pontos percentuais neste mesmo rendimento. Entretanto, para a fração BES, apenas o emprego de ácido fosfórico foi considerado significativo, promovendo um efeito positivo sobre a recuperação do extrato aquoso em 1,3 pontos percentuais. O único

TABELA 15 - RENDIMENTOS OBTIDOS PARA A EXPLOSÃO A VAPOR COM CATÁLISE FOSFÓRICA DO BAGAÇO DE CANA, DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO 2<sup>3</sup> DESCRITO NA TABELA 3.

Exp.	Massa (g)	T <sub>0</sub> <sup>1</sup> (s)	Condições	Rendimento (%) <sup>2</sup>		
				BES <sup>3</sup>	BEI <sup>3</sup>	Total
<b>5</b>	224,2	78	4 min, 195°C, 50% de umidade	20,8	65,5	86,3
<b>6</b>	225,1	66	8 min, 195°C, 50% de umidade	20,9	64,4	85,3
<b>7</b>	227,4	60	4 min, 210°C, 50% de umidade	21,6	64,7	76,1
<b>8</b>	227,0	75	8 min, 210°C, 50% de umidade	21,3	54,5	75,8
<b>16</b>	225,7	60	4 min, 195°C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	22,3	54,1	76,4
<b>17</b>	224,9	66	8 min, 195°C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	21,7	53,6	75,3
<b>18</b>	227,8	75	4 min, 210°C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	23,3	54,9	78,2
<b>19</b>	226,9	60	8 min, 210°C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	22,4	49,5	71,9
<b>20</b>	226,5	67	6 min, 203 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	20,6	46,7	67,3
<b>21</b>	225,8	65	6 min, 203 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	19,9	47,5	67,4
<b>22</b>	227,4	68	6 min, 203 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	19,6	48,7	68,3
<b>23</b>	228,7	64	6 min, 203 °C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	20,4	47,5	67,9
<b>PCF<sup>4</sup></b>	227,1±1,3	66±1,8	6 min, 203°C, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> diluído	20,1±0,5	47,6±1,1	67,7±1,4

<sup>1</sup> t<sub>0</sub> = tempo para atingir a temperatura de pré-tratamento

<sup>2</sup> Calculado em relação ao peso seco do bagaço

<sup>3</sup> BES = fração solúvel do bagaço pré-tratado; BEI = fração insolúvel do bagaço pré-tratado

<sup>4</sup> PCF = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para catálise fosfórica.

efeito de segunda ordem que apresentou algum significado estatístico foi a interação do tempo com a temperatura, que reduziu a recuperação da fração BEI em -3,5 pontos percentuais. Finalmente, os valores obtidos para os efeitos de terceira ordem (interação de 3 fatores) não apresentaram nenhuma importância significativa para o processo.

TABELA 16 - EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS EXPERIMENTOS DA TABELA 3 RELACIONADOS À EXPLOSÃO A VAPOR DE BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

<b>Efeito</b>	<b>BES</b>	<b>BEI</b>	<b>Rendimento Total</b>
$2\Sigma (E^+ + E^-)/N$	DP = 0,7	DP = 2,1	DP = 2,1
<i>Efeitos principais</i>			
Tempo (t)	-0,4	-4,3	-2,1
Temperatura (T)	0,7	-3,5	-5,3
Ácido [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	1,3	-9,2	-5,4
<i>Interação de 2 fatores</i>			
t x T	-0,2	-3,5	-1,1
t x [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	-0,3	1,4	-1,5
T x [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,1	1,8	-4,5
<i>Interação de 3 fatores</i>			
t x T x [H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ]	0,1	1,0	-1,5

E<sup>+</sup> = efeito dos níveis positivos; E<sup>-</sup> = efeito dos níveis negativos; N = números de experimentos; DP = desvio-padrão

A Figura 24 mostra o diagrama de representação geométrica dos rendimentos obtidos para as frações solúvel (BES, Figura 24A) e insolúvel (BEI, Figura 24B). Em geral, o aumento do tempo de residência do bagaço no reator (tempo de pré-tratamento) diminuiu o rendimento de recuperação das frações BES e BEI em alguns pontos percentuais (Tabela 15). A temperatura mostrou efeito positivo em relação à

recuperação das frações BES para os pré-tratamentos realizados na presença de catalisador ácido e isto foi atribuído à menor degradação das hemiceluloses em meio ácido, com estabilidade máxima na faixa de pH de 2,5 e 3,5 (PARAJÓ *et al.*, 1995). Já para a fração BEI, o aumento da temperatura acarretou em perda de rendimento devido ao maior índice de solubilização do material na fração aquosa (BES), como também a perdas devido à formação de produtos voláteis durante o processo.

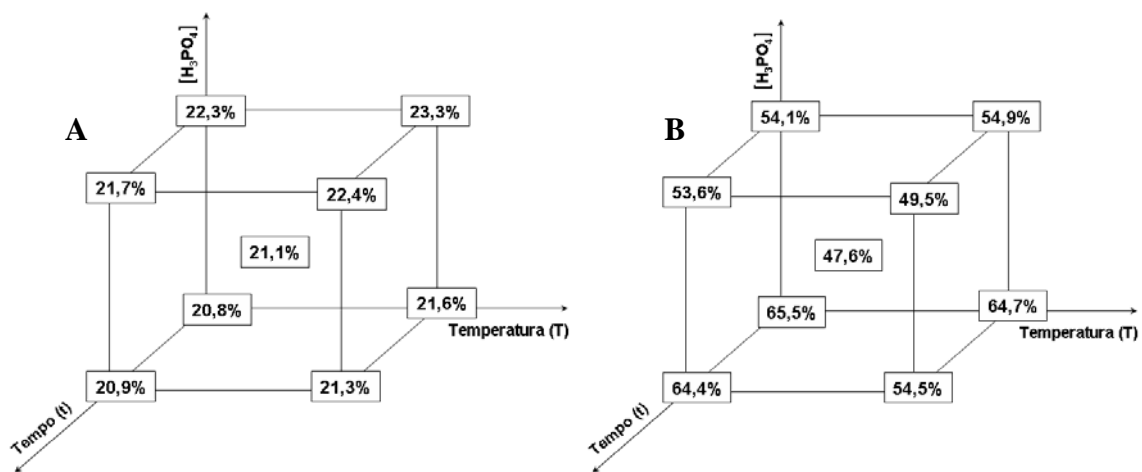


FIGURA 24 - DIAGRAMA DE REPRESENTAÇÃO GEOMÉTRICA DOS RENDIMENTOS OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES SOLÚVEL (BES, A) E INSOLÚVEL (BEI, B) AO LONGO DO PLANEJAMENTO FATORIAL.

Os extratos aquosos de primeira e segunda filtração, oriundos da lavagem do material explodido a vapor na presença de ácido fosfórico, foram então submetidos à análise cromatográfica para determinação de suas respectivas composições química (Figura 25). Pode-se observar que a presença de ácido fosfórico acarretou uma diminuição significativa da concentração de oligossacarídeos hidrossolúveis nas frações BES, aumentando proporcionalmente a concentração de açúcares redutores

nestes extratos aquosos. Uma maior concentração de xilose foi observada em relação aos demais componentes da fração hidrossolúvel, embora uma quantidade considerável de glucose também tenha sido identificada no meio. Portanto, a adição de ácido fosfórico não aumentou os rendimentos de recuperação dos materiais pré-tratados, mas permitiu a eliminação da etapa adicional de pós-hidrólise da fração solúvel em água (BES), já que a maior parte dos oligossacarídeos hidrossolúveis gerados na auto-hidrólise foi hidrolisada a açúcares livres (monossacarídeos). Mesmo assim, apenas para fins analíticos, estes extratos aquosos também foram submetidos à pós-hidrólise com ácido sulfúrico, e os resultados derivados desta análise encontram-se na Tabela 17.

A presença do catalisador ácido aumentou em pelo menos três vezes a concentração de glucose na fração BES, quando comparada aos experimentos de auto-hidrólise (Tabela 17). Este comportamento foi atribuído à hidrólise de regiões mais acessíveis da celulose (regiões amorfas) e foi acompanhada por um aumento substancial na presença de HMF no meio de reação (Figura 25B).

A presença de ácido fosfórico também aumentou a sacarificação das hemiceluloses. No entanto, esta tendência não resultou em um aumento proporcional da concentração de furfural na fração BES, confirmando a hipótese de que pentoses apresentam uma menor susceptibilidade à degradação quando em soluções de pH mais ácido (PARAJÓ *et al.*, 1995). Estes resultados podem ser confirmados pela faixa de pH das frações BES obtidas nos experimentos de catálise fosfórica (vide Tabela 17), fato este não observado nos experimentos de auto-hidrólise, onde a faixa de pH variou de 4,0-5,0 (vide Tabela 9).

TABELA 17 - ANÁLISE QUANTITATIVA BASEADA NA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA DOS HIDROLISADOS SULFÚRICOS DAS FRAÇÕES BES, PREPARADAS ATRAVÉS DO PROCESSO DE EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

Exp.	pH	Componente (g)						
		AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo Acetil	Ácido Fórmico	HMF	Furfural
5	4,5	3,04	26,67	4,33	5,19	1,55	0,07	0,22
6	4,5	2,51	27,79	2,59	4,51	1,34	0,08	0,28
7	4,0	3,18	29,62	3,74	8,32	2,40	0,30	0,22
8	4,0	3,82	27,48	4,58	8,68	1,64	0,76	1,12
16	3,0	13,91	34,24	5,15	6,27	0,65	0,63	0,69
17	3,0	14,97	32,14	4,72	9,58	1,38	1,13	0,76
18	2,5	17,88	33,56	5,83	10,11	1,69	0,79	0,55
19	2,5	15,41	32,81	4,48	8,74	1,44	1,12	0,64
20	3,5	13,58	29,21	4,48	9,87	1,89	0,78	0,67
21	3,5	12,88	30,13	4,81	9,71	1,93	0,74	0,71
22	3,5	13,68	30,72	4,93	10,11	1,97	0,82	0,66
23	3,5	12,98	29,14	4,78	9,67	2,11	0,71	0,69
PCF <sup>1</sup>	3,5	13,28	31,05	4,70	9,80	1,98	0,76	0,68
DP <sup>2</sup>	-	0,35	0,86	0,17	0,19	0,11	0,05	0,02

<sup>1</sup> PCF = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para catálise fosfórica.

<sup>2</sup> DP = desvio-padrão

O pré-tratamento do bagaço na presença de ácido fosfórico mostrou-se eficiente na remoção das hemiceluloses em temperaturas mais baixas, quando comparado aos experimentos de auto-hidrólise. O melhor rendimento de xilose na fração BES, a partir

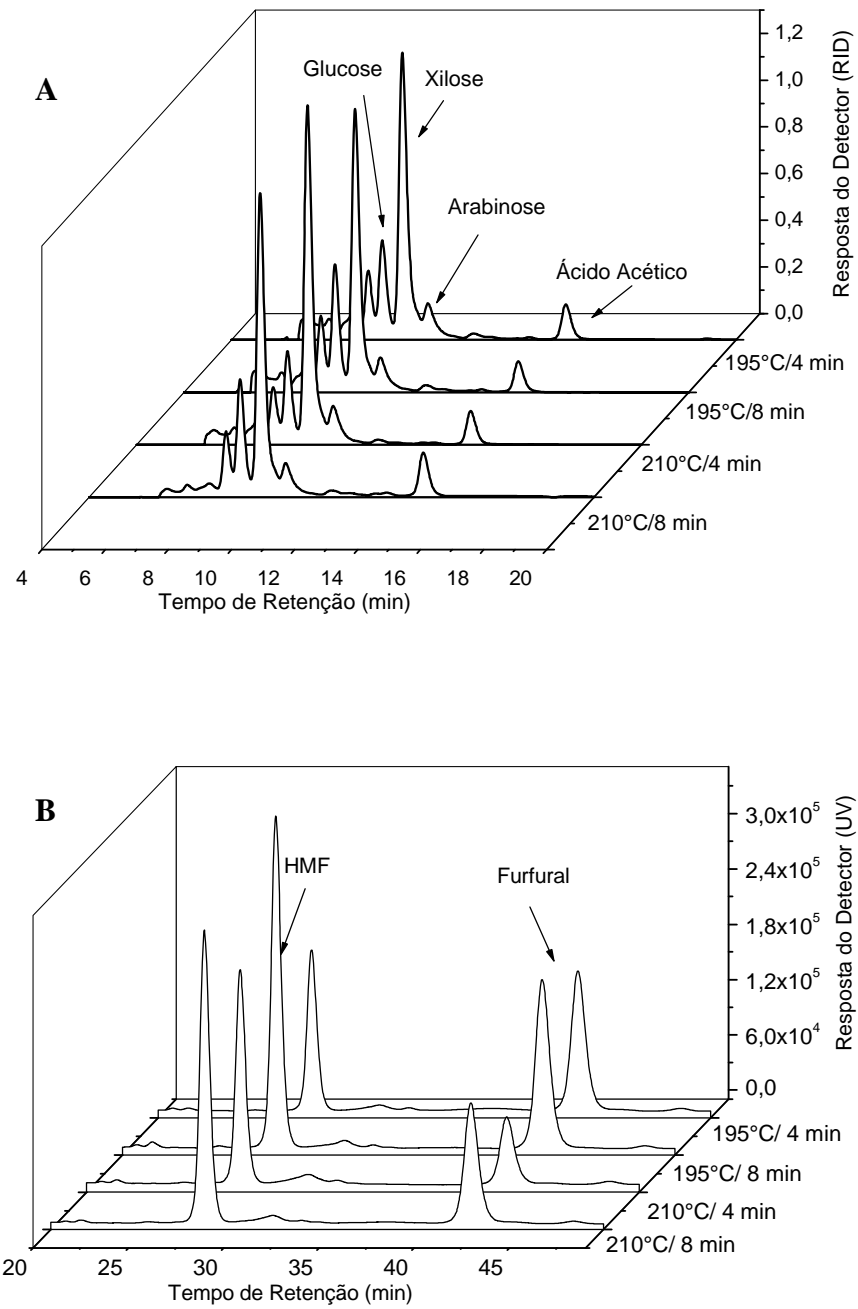


FIGURA 25 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DERIVADOS DOS EXPERIMENTOS CATALISADOS POR ÁCIDO FOSFÓRICO, OBTIDOS COM DETECTORES DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO (A) E DETECTOR DE ABSORÇÃO NO UV (B).



do bagaço impregnado com ácido fosfórico, foi atingido a 195°C por 4 min de pré-tratamento (experimento 16), enquanto que, para o bagaço auto-hidrolisado, a temperatura ótima foi de 210°C para o mesmo tempo de residência no reator (experimento 3). Portanto, o uso de catálise fosfórica permite reduzir a temperatura de pré-tratamento sem comprometer significativamente a recuperação das hemiceluloses na fração BES. No entanto, o maior grau de sacarificação da celulose pode representar uma desvantagem desta opção tecnológica.

A Figura 26 apresenta os espectros no ultravioleta (UV) das frações solúveis em água, obtidas a partir de amostras de bagaço pré-tratadas após impregnação ácida. Através destes espectros, percebe-se que a intensidade de absorção a 280 nm aumentou com a presença de ácido fosfórico, indicando maiores índices de desidratação de carboidratos (Figura 26B).

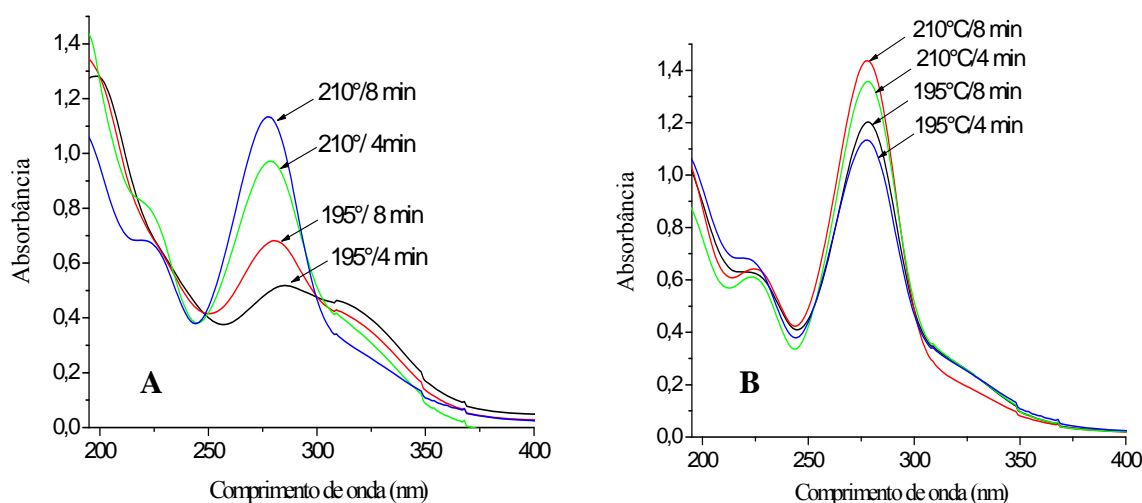


FIGURA 26 - ESPECTROS NO ULTRAVIOLETA DAS FRAÇÕES SOLÚVEIS EM ÁGUA (BES) DERIVADOS DOS PROCESSOS DE EXPLOSÃO A VAPOR DO (A) BAGAÇO UMEDECIDO COM ÁGUA E DO (B) BAGAÇO IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

De maneira análoga à auto-hidrólise, a absorção em 280 nm foi atribuída aos produtos de desidratação das pentoses e hexoses para furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. Entretanto, essa absorção também pode ser atribuída ao teor de lignina na fração BES, cuja hidrólise pode liberar cromóforos aromáticos hidrossolúveis cuja absorvidade molar a 280 nm contribui com o perfil espectral observado na Figura 26.

É importante ressaltar que as maiores intensidades de absorção, registradas na Figura 28B, foram devidas ao HMF acumulado no meio, já que, neste comprimento de onda, seu  $\epsilon_{\text{máx}}$  é 6-7 vezes maior do que o  $\epsilon_{\text{máx}}$  do furfural. Sem dúvida, esta constatação poderá ser extremamente importante para o desenvolvimento das etapas subseqüentes de hidrólise e fermentação dos hidrolisados do bagaço, pois concentrações destes produtos de desidratação podem inibir os microorganismos responsáveis pela bioconversão (TENGBORG *et al.*, 2001; PALMQVIST *et al.*, 1996; KADAM *et al.*, 2004).

A Tabela 18 mostra a composição química das diferentes frações BEI que foram derivadas da explosão a vapor do bagaço na presença de ácido fosfórico.

Todas estas frações apresentaram teores de xilose na faixa de 2,2 a 3,2%, revelando percentuais sistematicamente inferiores aos produtos de auto-hidrólise. A sobrevivência de baixos teores de hemiceluloses no bagaço pré-tratado, independentemente do aumento da drasticidade e do uso de ácido fosfórico como catalisador, sugere que estas xilanas residuais correspondam à fração recalcitrante das hemiceluloses presentes no bagaço, fato já reconhecido por outros autores em estudos anteriores (GALVÃO *et al.*, 2001; GÁMEZ *et al.*, 2006). Provavelmente, esta aparente

recalcitrância ou baixa acessibilidade química decorre da desacetilação e hidrólise parcial destes polissacarídeos que, menos ramificados e com menor grau de polimerização, aumentam a interação com a celulose via ligações de hidrogênio.

TABELA 18 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS EM ÁGUA (BEI), PREPARADAS ATRAVÉS DA EXPLOSÃO A VAPOR DO BAGAÇO DE CANA IMPREGNADO COM ÁCIDO FOSFÓRICO.

Exp.	Lignina		Celulose AnGlc	Hemicelulose		Cinza	Total
	Solúvel	Insolúvel		AnXyl	AnAra		
<b>BM<sup>1</sup></b>	1,26	29,44	42,00	17,48	2,53	3,10	95,81
<b>5</b>	0,22±0,01	29,40±0,06	51,02±0,35	4,66±0,33	1,20±0,07	2,44±0,10	98,94
<b>6</b>	0,36±0,01	30,60±0,10	53,48±0,32	8,71±0,15	0,78±0,02	3,21±0,12	98,14
<b>7</b>	0,51±0,03	32,20±0,28	55,68±0,41	6,07±0,25	0,68±0,02	3,07±0,05	99,21
<b>8</b>	0,62±0,06	31,60±0,32	52,74±0,30	6,42±0,16	0,69±0,05	3,59±0,02	95,66
<b>16</b>	0,52±0,01	32,20±0,26	56,27±0,30	3,23±0,13	0,59±0,02	3,28±0,13	96,09
<b>17</b>	0,64±0,01	34,10±0,17	58,03±0,27	2,17±0,14	0,42±0,06	2,88±0,12	98,24
<b>18</b>	0,57±0,01	29,80±0,12	56,03±0,31	2,58±0,18	0,65±0,02	3,03±0,17	96,66
<b>19</b>	0,72±0,01	33,90±0,49	54,45±0,45	3,01±0,31	0,46±0,04	4,22±0,13	96,76
<b>20</b>	0,79±0,01	32,3±0,32	54,55±0,34	2,75±0,08	0,49±0,02	4,11±0,08	94,99
<b>21</b>	0,74±0,01	31,4±0,30	55,88±0,23	2,62±0,02	0,46±0,01	3,68±0,12	94,78
<b>22</b>	0,77±0,02	33,1±0,35	54,57±0,43	2,82±0,03	0,44±0,03	3,89±0,17	95,59
<b>23</b>	0,76±0,11	31,9±0,29	56,76±0,32	2,54±0,07	0,48±0,01	3,76±0,04	96,20
<b>PCF<sup>2</sup></b>	0,77±0,02	32,18±0,71	55,44±1,07	2,68±0,12	0,47±0,02	3,86±0,19	95,39±0,64

<sup>1</sup> BM = bagaço mecanizado

<sup>2</sup> PCF = média e desvio padrão do ponto central do planejamento realizado para catálise fosfórica.

Em geral, o uso de ácido fosfórico resultou em um pequeno aumento da quantidade de lignina presente na fração BEI, em comparação com o bagaço auto-hidrolisado e com o bagaço *in natura*. Tal aumento pode ser sido unicamente

resultante da sacarificação dos polissacarídeos do bagaço (celulose e hemiceluloses), proporcionando um aumento relativo do teor de lignina. No entanto, dados quantitativos como estes não nos permitem avaliar o efeito causado pelo pré-tratamento sobre a estrutura da lignina nativa, já que reações de hidrólise e condensação são naturais durante o processo e que os métodos de análise química normalmente introduzem artefatos que não devem ser interpretados como decorrentes da explosão a vapor propriamente dita.

A Tabela 19 apresenta o balanço de massas do pré-tratamento a vapor do bagaço de cana impregnado com ácido fosfórico.

O pré-tratamento realizado a 210°C por 4 min apresentou 93,41% de recuperação da glucose presente no bagaço *in natura*, sendo 21,64% na fração BES e 71,77% na fração BEI. Nesta condição, também foi obtido o maior percentual de recuperação da xilose (98,2%) e da arabinose (96%) presentes originalmente no bagaço *in natura*, sendo 93,8 e 84,8% na fração BES, e 4,5% e 11,8% na fração BEI, respectivamente. O percentual de recuperação da lignina na fração BEI foi de 78,8%, indicando percentuais de degradação semelhantes aos observados anteriormente para a auto-hidrólise do bagaço. Portanto, esta condição proporcionou os melhores índices de recuperação de carboidratos, confirmando que a presença de ácido fosfórico como catalisador, durante o pré-tratamento a altas temperaturas e menores tempos de residência, é desejável para maximizar a recuperação dos carboidratos presentes no bagaço da cana. Entretanto, é necessário enfatizar que a presença de ácido fosfórico induziu aos maiores índices de sacarificação ácida da celulose, mas, por outro lado, permitiu a recuperação de uma fração BES mais rica em monossacarídeos, em

TABELA 19 - BALANÇO DE MASSA DO PRÉ-TRATAMENTO VIA CATÁLISE FOSFÓRICA.

Componentes (%)	Experimentos							
	5	6	7	8	16	17	18	19
<b>BES</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	4,14	2,60	3,74	4,86	14,47	14,69	21,64	17,76
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	79,04	69,50	85,32	83,75	85,69	88,93	93,73	90,90
AnAra	73,52	69,66	75,49	76,26	83,32	77,07	84,77	73,91
Grupo Acetil	44,60	49,40	42,90	51,16	54,80	59,00	52,80	54,60
<b>BEI</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	79,51	82,04	72,49	80,98	72,43	73,72	71,77	67,51
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	16,44	14,1	11,98	10,68	9,99	6,53	4,45	4,32
AnAra	7,75	6,93	8,51	6,54	12,61	8,73	11,82	8,99
<b>Lignina</b>								
Solúvel	27,01	28,72	24,74	26,84	22,31	26,73	24,33	28,26
Insolúvel	71,58	71,62	55,35	74,25	59,13	61,10	54,45	56,95
<b>Total</b>								
<b>Celulose</b>								
AnGlc	83,65	84,64	76,23	85,84	86,90	88,41	93,41	85,27
<b>Hemicelulose</b>								
AnXyl	95,48	88,60	97,30	94,43	95,68	95,46	98,18	95,22
AnAra	81,27	71,59	84,00	82,80	95,93	85,80	96,59	82,90
Grupo Acetil	44,60	49,40	42,90	51,16	54,80	59,00	52,80	54,60
<b>Lignina</b>								
	98,59	100,34	80,09	101,09	81,44	87,83	78,78	85,21

comparação com o processo de auto-hidrólise na mesma condição. Tal comportamento pode ser considerado interessante para fins biotecnológicos, já que os hidrolisados da

fração BES estariam prontos para serem submetidos aos processos fermentativos subseqüentes.

Outra observação importante sobre a impregnação com ácido fosfórico foi o percentual de recuperação de arabinose na fração BES, indicando um menor efeito destrutivo do pré-tratamento sobre este monossacarídeo e uma menor formação de furfural quando comparado aos experimentos de auto-hidrólise.

Finalmente, o maior percentual de recuperação de lignina foi obtido a 210°C por 8 min para o bagaço úmido, sendo que, nesta condição, mais de 100% da lignina presente no bagaço original foi recuperada na forma de produtos do pré-tratamento a vapor. Assim, de modo análogo ao observado por outros autores (SHEWCHENKO *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 2004; ADSUL *et al.*, 2005), reações de condensação envolvendo sub-produtos da hidrólise da lignina e da desidratação de carboidratos produziram materiais poliméricos que foram quantificados como lignina no procedimento de determinação da lignina de Klason.

Nesta etapa de nosso plano de trabalho, a eficiência do pré-tratamento a vapor foi monitorada pela hidrólise enzimática dos substratos resultantes do processo. Os resultados obtidos para o bagaço impregnado com ácido fosfórico estão representados na Figura 27.

Para os experimentos realizados com ácido fosfórico, o aumento da temperatura e do tempo de residência no reator não influenciaram a hidrólise das fibras de celulose tanto quanto anteriormente observado nos experimentos de auto-hidrólise (Figura 20). Os resultados obtidos para estes experimentos foram de quase 100% de hidrólise da celulose em 72 h de reação para todos os experimentos, sendo que em 8 h de reação,

80% da celulose presente no substrato já tinha sido hidrolisada à glucose e celobiose. Este fato não foi observado nos experimentos de auto-hidrólise, que proporcionaram rendimentos de hidrólise não superiores a 67% em 8 h de reação (experimento 7, a 210°C por 4 min).

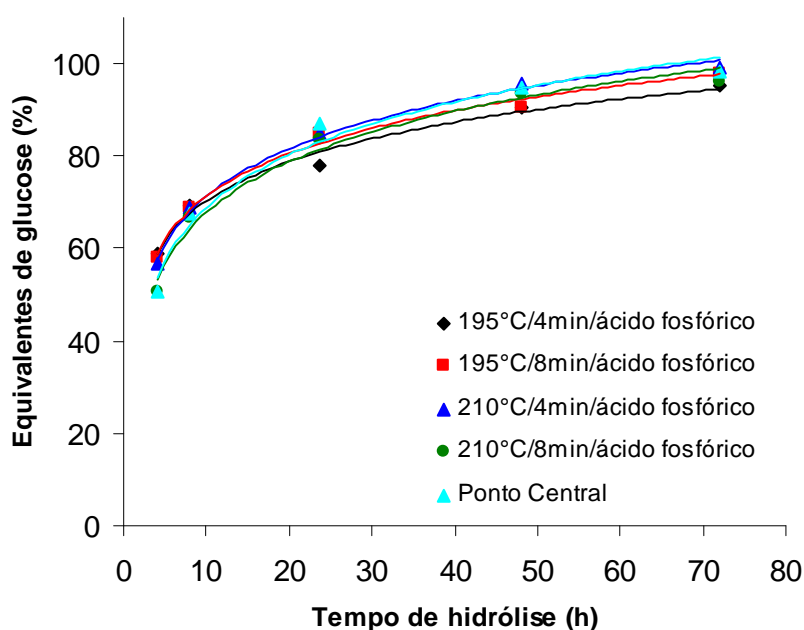


FIGURA 27 - QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA OS SUBSTRATOS ORIGINADOS DOS EXPERIMENTOS REALIZADAS COM A IMPREGNAÇÃO DO BAGAÇO COM ÁCIDO FOSFÓRICO DILUÍDO.

O pré-tratamento utilizando ácido fosfórico produziu polpas celulósicas mais homogêneas, facilitando o ataque das enzimas. A velocidade de reação foi aumentada principalmente nas primeiras horas de reação, proporcionando uma hidrólise mais rápida do que os experimentos de auto-hidrólise. Outro fato interessante a ser observado diz respeito à condição de menor drasticidade (195° C, 4 min) que, na

presença de ácido fosfórico, produziu um substrato bastante acessível à hidrólise, particularmente se comparado ao substrato obtido na mesma condição de pré-tratamento sem a presença de ácido fosfórico (auto-hidrólise). Para estes experimentos, o rendimento máximo produzido em 72 h de reação foi de 98% para o bagaço impregnado com ácido fosfórico (experimento 16), contra 63% para o bagaço úmido auto-hidrolisado (experimento 1).

Os resultados obtidos para os experimentos realizados na presença de ácido fosfórico evidenciaram que a presença desse catalisador melhorou significativamente a acessibilidade do substrato e que, neste caso, a temperatura e o tempo de residência não influenciam o rendimento de sacarificação enzimática. Mais uma vez, a presença de lignina não impediu a ação hidrolítica das enzimas, cujo desempenho foi comprometido apenas pelo acúmulo de fatores de inibição que são naturais ao processo, como o aumento da concentração de glucose no meio de reação.

O ponto central (PCF) dos experimentos realizados com catalise fosfórica também resultou em grande acessibilidade das enzimas ao substrato. Nestes experimentos, obteve-se hidrólise de  $98,0 \pm 1,5\%$  da celulose presente no substrato, enquanto que, para o ponto central (PCA) dos experimentos de auto-hidrólise, este valor foi inferior e igual a  $92,0 \pm 1,4\%$ . Como pode ser observado, o desvio padrão obtido para os experimentos do ponto central foi relativamente pequeno, demonstrando que os resultados obtidos neste trabalho apresentaram uma boa repetibilidade.

Da mesma forma como anteriormente observado para a auto-hidrólise do bagaço (Tabela 12), os rendimentos de celobiose diminuíram e de xilose aumentaram



com decorrer da reação de hidrólise, fato este observado em todas as condições de pré-tratamento realizadas para este estudo. A Tabela 20 apresenta os rendimentos de celobiose e de xilose que foram obtidos durante a hidrólise enzimática.

É interessante observar que os experimentos realizados com impregnação ácida apresentaram maior concentração de celobiose em relação aos experimentos de auto-hidrólise. Este fato pode ser atribuído à presença do catalisador durante o pré-tratamento, que permite a obtenção de substratos de maior acessibilidade química (MICHALOWCZ *et al.*, 1991; GALBE *et al.*, 2002; SÖDERSTRÖM *et al.*, 2002). Por outro lado, a liberação de xilose durante a hidrólise enzimática foi menor para os substratos pré-tratados com catálise fosfórica, em comparação com os pré-tratados por auto-hidrólise. Estes resultados podem ser atribuídos à menor quantidade de xilose presente nos substratos derivados da catálise fosfórica, pois grande parte deste carboidrato foi hidrolisado durante o pré-tratamento a vapor e recuperado na fração BES (vide balanço de massas na Tabela 9). Outra hipótese diz respeito à menor acessibilidade da xilana residual presente nestes substratos, já que a maior parte deste componente foi recuperada como xilose na fração BES do pré-tratamento.

Em geral, os resultados obtidos para os substratos originados do bagaço impregnado com ácido fosfórico mostraram-se vantajosos em relação aos substratos produzidos por auto-hidrólise. Então, a utilização de ácido fosfórico diluído, além de favorecer a separação dos principais componentes presentes no bagaço durante o pré-tratamento a vapor, também produz materiais celulósicos de elevada reatividade à hidrólise enzimática.

TABELA 20 - QUANTIDADES DE CELOBIOSE E XILOSE PRODUZIDAS PELA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRODUZIDOS POR EXPLOSÃO A VAPOR VIA CATÁLISE FOSFÓRICA.

Exp.	Componentes (g)									
	Celobiose					Xilose				
	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h
5	0,14	0,12	0,08	0,06	0,05	0,49	0,76	0,94	1,02	1,12
6	0,13	0,11	0,04	0,04	0,3	0,39	0,45	0,76	0,79	0,85
7	0,24	0,22	0,16	0,07	0,04	0,22	0,30	0,45	0,48	0,50
8	0,25	0,20	0,14	0,12	0,13	0,23	0,28	0,45	0,49	0,51
16	0,34	0,31	0,19	0,18	0,17	0,15	0,19	0,20	0,28	0,28
17	0,48	0,42	0,21	0,09	0,05	0,10	0,14	0,15	0,20	0,21
18	0,58	0,36	0,19	0,18	0,17	0,13	0,18	0,20	0,26	0,29
19	0,37	0,35	0,22	0,17	0,19	0,13	0,17	0,14	0,23	0,25
PCF <sup>1</sup>	0,28	0,26	0,17	0,10	0,09	0,26	0,36	0,49	0,53	0,57
DP <sup>2</sup>	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,04	0,01	0,01	0,03

<sup>1</sup> PCF = média do ponto central do planejamento associado aos experimentos de catálise fosfórica.

<sup>2</sup> Desvio padrão.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a diferença nos procedimentos de colheita dos bagaços (convencional e mecânica) não influenciam a composição química dos mesmos. Por outro lado, a composição química da palha diferiu consideravelmente daquela observada nas amostras de bagaço, com especial ênfase aos teores de anidroglicose, lignina total e cinzas. Estes resultados comprometeram a viabilidade da palha da cana-de-açúcar como matéria-prima para procedimentos de pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.

O pré-tratamento a vapor, particularmente na presença de ácido fosfórico, mostrou-se bastante eficiente na separação dos três principais componentes do bagaço de cana, bem como na recuperação de cada um deles em rendimentos praticamente quantitativos. Comparada aos experimentos de auto-hidrólise, a impregnação ácida resultou em um aumento no percentual de recuperação dos carboidratos presentes no bagaço. E a presença de ácido fosfórico levou aos maiores índices de sacarificação ácida da celulose, o que diminui o potencial do substrato fibroso (fração pré-tratada insolúvel em água) para a geração de hidrolisados enzimáticos susceptíveis à fermentação alcoólica.

O pré-tratamento por explosão a vapor também forneceu substratos de alta susceptibilidade à hidrólise enzimática, tanto nos experimentos de auto-hidrólise quanto nos de catálise fosfórica. Entretanto, os substratos pré-tratados com ácido fosfórico se mostraram mais vantajosos em relação aos produzidos por auto-hidrólise. Assim, a utilização de ácido fosfórico no pré-tratamento propicia a produção de materiais celulósicos de alta acessibilidade, paralelamente aos melhores índices de

recuperação dos componentes do bagaço. Isto pode ser atribuído a outros fatores como a menor toxicidade dos hidrolisados e seus menores índices de corrosividade, pelo menos em comparação com outros ácidos minerais como o ácido sulfúrico, sugerem que o uso de ácido fosfórico poderá se consolidar como uma alternativa atraente para a otimização de processos de sacarificação e fermentação simultâneas do bagaço de cana-de-açúcar.

## **6. TRABALHOS FUTUROS**

Além dos resultados incorporados neste trabalho, novos experimentos deverão ser realizados para avaliar o efeito de diferentes concentrações de ácido fosfórico no pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor. Além destes experimentos, os substratos obtidos por explosão a vapor deverão ser submetidos à deslignificação com álcali diluído para avaliar as vantagens e desvantagens desta alternativa tecnológica. Estes substratos serão submetidos a uma condição padrão de hidrólise enzimática para avaliar a influência da deslignificação sobre a acessibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Finalmente, ensaios de fermentação alcoólica deverão ser conduzidos para corroborar as vantagens inicialmente atribuídas à catálise fosfórica, culminando com a demonstração da viabilidade deste substrato para processos de sacarificação e fermentação simultâneas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, K. B. GOKHALE, D.V. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. Carbohydrate Polymers, v. 62, 2005, p. 6-10.
- ÅKERHOLM, M.; HINTERSTOISSER, B.; SALMÉM, L. Characterization of the crystalline structure of cellulose using static and dynamic FT-IR spectroscopy. Carbohydrate Research, v. 339, 2004.
- ANDO, S.; KAKIMOTO, T.; ITOH, K.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Increased digestibility of cedar by pretreatment with peracetic acid and steam explosion. Biotechnology Bioenergy, v.31, 1988, p. 802-804.
- BABCOCK, I. W. U. S. Patent, v.1, 1932, p. 825-864.
- BAUDEL, H. M., Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para produção de etanol, 2006.
- BAUDEL, H. M.; ZAROR, C.; ABREU, C. A. M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems:an environmentally friendly approach. Industrial Crops and Products, v. 21, 2005, p. 309–315.
- BELDMAN, G.; VORAGEN, A. G. J.; ROMBOOTS, F. M.; PILNIK, W. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. Biotechnology Bioenergy, v.31, p.173-178, 1988.
- BELTRAME, P. L.; CARNITI, P.; VISCIGLIO, A.; FOCHER, B.; MARZETTI, A. Fractionation and bioconversion of steam-exploded wheat straw. Bioresource Technology, 1992, p.165-171.

- BROWNELL, H. H. Steam pretreatment of wood. Progress report for the Project No. 04-53-12-402, Forintek Canada Co., Ottawa, Ontario, 1989.
- CANTARELLA, M.; CANTARELLA, L.; GALLIFUOCO, A.; ALFANI F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF e SSF. Process Biochemistry, v.39, 2004, p. 1533-1542.
- CARRASCO, F. Thermo-mechano-chemical pretreatment of wood in a process development unit. Wood Science Technology, v. 26, 1992, p. 413-428.
- CASTRO, F. B.; HOTTEN, P. M.; ORSKOV, E. R. Effects of dilute-acid hydrolysis treatment on the physico-chemical feature and bio-utilization of wheat straw. Feed Science Technology, v. 42, 1993, p. 55-67.
- CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. Carbohydrate Analysis, 2a. ed, 1994. New York: Oxford Universit Press.
- CHAUDHURI, P. B. Explosion pulping-exploratory trials. Tappi J. 1989, p.196-200.
- CLAEYSSSENS, M.; TOMME, P. Struture-activity relationships in cellulolytic enzymes. In: COUGHLAN, M. P. (Ed). Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation, London: Elsevier, 1989, p. 37-49.
- CLARK, T. A.; MACKIE, K. L.; DARE, P.; McDONALD, A. G. Steam explosion of the softwood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. II. Process characterisation. Journal Wood Chemistry Technology, v.9,1989, p. 135-166.
- CONVERSE, A. O. E WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. IEA/BIOFOR Wokshop on Applicatons of Biotechnology in Bioenergy Systems, 18 - 20 de Outubro, 1994, Ottawa, Canada.

- COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. Biotechnol. Gen. Eng. Rev., v.3, 1985, p.39-109.
- CUNHA, C. M.; SILVA, F. T.; Characterization of carbohydrates present in hydrolyzate obtained from sugar cane bagasse pretreated by explosion. 6<sup>th</sup> Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, v. VII, 2001, p. 221-226.
- CUNHA, H.C. M.; Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e do bagaço de cana pré-tratado pó explosão a vapor: avaliação do poder inibitório dos compostos aromáticos de baixa massa molar em processos fermentativos. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005, 196 p.
- D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: Celulose e Papel - Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, 2a. ed., vol. 1, 1988. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo.
- DATAR, R.; HUANG, J.; MANESSA, P.; MOHAGHEGHIA, S. C.; CHORNET, E. Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process. International Journal of Hydrogen Energy. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/ijhydene>>, 2006.
- DEKKER, R. F. H.; WALLIS, A. F. A. Enzymic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis explosion. Biotechnology and Bioengineering, v.25, 1983, p. 3021-3048.
- DENCE, C. W.; LIN, S. Y.; Methods in Lignin Chemistry. New York: Springer Verlag, 1992.



- DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced ruminal digestion. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57/58, 1996, p. 171-182.
- DIETERICH, G. B.; MATHIAS, A. L.; RAMOS, L. P. Acid-catalyzed steam explosion of Pinus taeda chips: I. Characterization of the water-soluble fraction. 6<sup>th</sup> Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, v. VII, 2001, p. 189-194.
- DIVNE, C. *et. al.* The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase-I from *Trichoderma reesei*. Science, v.265, 1994, p.524-528.
- EMMEL, A, MATHIAS, A. L.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. Bioresource Technology, v.86, 2003, p.105-115.
- ESTEGHLALIAN, A.; HASHIMOTO, A. G.; FENSKE, J. J. PENNER, M. H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment. Bioresource Technology, v.59, 1997, p. 129-136.
- EXCOFFIER, G.; TOUSSAINT, B.; VIGNON, M. R. Saccharification of steam-exploded poplar wood. Biotechnology Bioenergy, v.38, 1991, p.1308-1317.
- FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose hydrolysis. New York: Springer-Verlag, 1987.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nation. FAO. FAO Statistical Data Base. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>>, consultado em outubro de 2005

- FENGEL, D.; WEGENER G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FONTANA, J. D.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Physical Methods Applied to Biotechnology. In: *Methods of Biotechnology*, Doelle, H. (Honorary Theme Editor) and Mitchell, D. (co-editor), EOLSS (UNESCO) - Encyclopedia of Life Support Systems, CD-ROM Special Edition, Oxford, UK, 2003 (<http://www.eolss.co.uk>).
- FOX, D. J., GRAY, P. P., DUNN, N. W. E MARSDEN, W. L. Comparison of alkali and steam (acid) pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility: Evaluation under optimised pretreatment conditions. Journal Chemistry Technology and Biotechnoogy. v. 44, 1989, p. 135-146.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Biochemistry and Biotechnology. v.59, 2002, p. 618-628.
- GALVÃO, M. L.; RAMOS, L. P.; ECHTERHOFF, M. F.; FONTANA, J. D. Autohydrolysis and acid-catalyzed steam explosion of sugarcane bagasse. 6<sup>th</sup> Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, v. VII, 2001, p. 200-205.
- GÁMES, 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.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. Pure Applied Chemistry, v. 59, p. 257- 268, 1986.
- GOLDSTEIN, I. S. Composition of biomass. In: Goldstein, I. S. Ed. *Organic Chemicals from biomass*, CRC Press, Boca Raton, 1981, p. 9-18.

- GOMIDE, J.L.; DEMUNER, B.J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. O Papel, v. 47, 1986.
- GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. Bioresource Technology, v.36, 1991, p.37-50.
- GRAY, A. K.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. Chemical Technology and Biotechnology, v.10, 2006, p.141-146.
- HAMENLICK, C.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. Biomass and Bioenergy, v. 28, 2005, p. 384-410.
- HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. *In*: HIGUCHI, T. Biosynthesis and biodegradation of Wood Components. London: Academic Press Inc, 1985, p.557-577.
- HOLTZAPPLE, M. T.; LUNDEEN, J. E.; STURGIS, R. Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (AFEX). Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 34/35, 1992, p. 5-21.
- HSU, T. A. Pretreatment of biomass. *In*: Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington,1996, DC, USA.
- IRICK, T. J.; WEST, K.; BROWNELL, H. H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J. N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.17/18, 1988, p.137-149.

- KAAR, W. E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C. M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. Biomass and Bioenergy, v.14,1998, p. 277-287.
- KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Biotechnology, v. 20, 2004, p. 698-705.
- KARHUNEN, T.; MÄNTYLÄ, A.; NEVALAINEN, H.; SUOMINEN, P. L. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*: Endoglucanase I overproduction. Molecular Genetics, v. 241, p. 515-522, 1993.
- KLYOSOV, A. A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. Biochemistry, v. 29, 10577-10585.
- KOKTA, B. V. E AHMED, A. Feasibility of explosion pulping of bagasse. Cellulose Chemistry and Technology,v. 26, 1994, p. 107-123.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M.; LYND, L. R. A Comparison of Liquid Hot Water and Steam Pretreatments of Sugar Cane Bagasse for Bioconversion to Ethanol. Bioresource Technology, v.81, 2002, p. 33-44.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. Applied Biochemistry Biotechnology,v. 121/124, 2005, p. 1081-1099.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica, São Paulo: Sarvier, 1995.

- LOBO, P.C.; JAGUARIBE, E.F.; RODRIGUES, J.; ROCHA, F.A.A. Economics of alternative sugar cana milling options. Applied Thermal Engineering, v. 27, 2007, p.1405-1413.
- LOMAX, T. D.; MACKEL, K. L.; MEDER, R.; CROUCHER, M.; BURTON, R. J. Steam explosion of *Pinus radiata* bark. Journal Wood Chemistry and Technology, v.14, 1994, p. 539-561.
- LU, Y.; YANG, B.; GREGG, D.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.98, 2002, p. 641-654.
- MACKIE, K. L.; BROWNELL, H. H.; WEST, K. L.; SADDLER, J. N. Effect of sulphur dioxide and sulphuric acid on steam explosion of aspenwood. Journal of Wood Chemistry and Technology, v.5, 1985, p. 405-425.
- MAMERS, H.; YURITTA, J. P.; MENZ, D.J. The sirlpulper-an explosive alternative for pinwood pulping. In: TAPPI Pulping Conference, Atlanta, 1981, p. 261-268.
- MANSFIELD, S. H.; MOONEY, C.; SADDLER, J, N. Substrate and enzymatic characteristics that limit enzymatic hydrolysis. Biotechnology, v. 15, 1999, p. 804-816.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. Enzyme and Microbial Technology, v. 40, 2007, p. 426-432.
- MARTÍN, C.; MATS, G.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HAGERDAL, B.; JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using

- recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisia*. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, 2002, p. 274-282.
- MASON, W. H. Apparatus for and process of explosion fibrillation of lignocellulosic material. U.S. Patent, v.1, p. 618-655.
- MATTOS, L. R.; SILVA, F. T. Steam explosion of sugar cane bagasse catalysed by H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: I. Effect of temperature, time and acid content on sugarcane bagasse solubization. 6<sup>th</sup> Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, v. VII, 2001, p. 407-411.
- McDougall, E. I. Studies on ruminant saliva. I. The Composition and output of sheep'ssaliva. Biochemistry Journal, v. 43, 1993, 99-109.
- McDOUGALL, G. J., MORRISON, I. M., STEWART, D. WEYERS, J. D. B. E HILLMAN, J. R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. Journal Science Food Agriculture, 62, 1993, p. 1-20.
- McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M. E.; Baker, J. O.; Overend, R. P. (Eds.), Enzymatic conversion of biomass for Fuels production. American Chemical Society, Washington, DC, 1994, p. 292-324.
- MEDVE, J. Cellulose Hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of clobiohydrolase I, II and endoglucanase II. Lund, Sweden, 1997. 49 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departament of Biochemistry, Lund University.
- MES-HARTREE, M., DALE, B. E. E CRAIG, W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. Applied Microbial Technology, v. 29, 1988, p. 462-468.

- MICHALOWICZ, G., TOUSSAINT, B. E VIGNON, M. R. Ultrastructural changes in poplar cell wall during steam explosion treatment. Holzforschung. v. 45, 1991, p. 175-179.
- MONTANE, D.; FARRIOL, X.; SALVADO, J.; JOLLEZ, P.; CHORNET, E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. Biomass and Bioenergy.v.14, 1995, p. 261-276.
- MOONEY, C. A.; MANSFIELD, S. D.; TOUHY, M. G.; SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. Bioresource Technology, v. 64, 1999, p. 113-119.
- MORJANOFF, P. J.; GRAY, P. P. Optimization of steam explosion as a method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymic saccharification. Biotechnology and Bioengineering. v.20, 1987, p. 733-741.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology. V. 96, 2005, p. 673-686.
- NGUYEN, Q. A.; SADDLER, J. N. An integrated model for the technical and economic evaluation of an enzymatic biomass conversion process. Bioresource Technology, v.35, 1991, p.275-282.
- NGUYEN, Q. A.; TUCKER, M. P.; KELLER, F. A.; BEATY, D. A.; CONNORS, K. M.; EDDY, F.P. Dilute acid hydrolysis of softwood. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77/79, 1999, 133-142.

- NIDETZKI, B.; HAYN, M.; MACARRON, R.; STEINER, W. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degradating diferent celluloses. Biotechnology, v. 15, p. 71-76, 1993.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J. ZACCHI, G. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. Bioresource Technology, v.42, 2007b, p.834-839.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J. ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam. Bioresource Technology, v.98, 2007a, p.2503-2510.
- ÖHGREN, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated corn stover for fuel ethanol production. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 121/124, 2005, p. 1055-1067.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E. Fractionation of lignocellulosic by steam-aqueous pretreatments. Phil. Trans. R. Soc. London, A 321, p.523-536, 1987.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated sprucewood on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Enzyme and Microbial 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, p. 65-72, 2004.



- PAN, X.; ZHANG, X. GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Enhanced enzymatic hydrolysis of steam-exploded Douglas fir wood by alkali-oxygen post-treatment. Applied Biochem Biotechnol. 113-116, 2004, p. 1103-1114.
- 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.
- PARAJÓ, J. C.; ALONSO, J. L.; SANTOS, V. Delignification and swelling of *Eucalyptus* wood ahead of enzymatic hydrolysis of the cellulosic fraction. Process Biochemistry, v. 30, 1995, p. 537-545.
- PIPPO, A. W.; GARZONE, P.; CORNACCHIA G. Agro-industry sugarcane residues disposal: trends of their conversion into energy carriers in Cuba. Waste Management, 2006. Disponível em <[http:// www.elsevier.com/locate/wasman](http://www.elsevier.com/locate/wasman)>.
- PORTA ÚNICA - União das Indústrias Canavieiras de São Paulo. Disponível em <<http://www.portalunica.com.br/referencia/videos.jsp>>, consultado em abril de 2007.
- PURI, V. P. E PEARCE, G. H. Alkali-explosion pretreatment of straw and bagasse for enzymic hydrolysis. Biotechnology and Bioenergy, v. 28, 1986, p. 480-485.
- PURI, V. P.; Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. Biotechnol. Bioeng., v. 26, 1984, p.1219-1222.
- 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.

- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.34/35, 1992b, p.37-48.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SADDLER, J. N. The use of enzyme recycle and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. Enzyme and Microbial Technology, v.15, 1993a, p.19-25.
- RAMOS, L. P.; CARPES, S. T.; SILVA, F. T.; GANTER, J. L. M. S. Comparison of the susceptibility of two hardwood species, *Mimosa scabrella* Benth and *Eucalyptus viminalis* Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. Brazilian Biology and Technology, v.43, 2000, p.185-206.
- RAMOS, L. P.; COTRIM, A. R.; SILVA, F. T.; CHEN, C.-L. Characterization of residual lignin after SO<sub>2</sub>-catalyzed steam explosion and enzymatic hydrolysis of *Eucalyptus viminalis* wood chips. Journal Agriculture Food Chemistry, v.47, 1999, p.2992-2302.
- 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. pp. 221-235.
- RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Bioconversion of wood residues: mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. In: Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O.; Overend, R. P., Eds., 1994a. Washington: American Chemical Society, Symposium Series 566. pp. 325-341.

- RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Enzyme recycling during fed-batch hydrolysis of cellulose derived from steam-exploded *Eucalyptus viminalis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.45/46, 1994b, p.193-207.
- RAMOS, L. P.; ZANDONÁ FILHO, A.; DESCHAMPS, F. C.; SADDLER, J. N. The effect of *Trichoderma* cellulases on the fine structure of a bleached softwood kraft pulp. Enzyme and Microbial Technology, v.24, 1999b, p.371-380.
- ROPARS, M.; MARCHAL, R.; POURQUIÉ, J.; VANDCASTEELE, J.P. Large-scale enzymatic hydrolysis of agricultural lignocellulosic biomass. Part 1: Pretreatment procedures, Bioresource Technology, v.42, 1992, p.197-204.
- SADDLER, J. N., BROWNELL, H. H., CLERMONT, L. P. E LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. Biotechnology and Bioenergy, v. 24, 1982a, p. 1389-1402.
- SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L.P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. Biotechnology and Bioenergy, v. 24, 1982, p. 1389-1402.
- SADDLER, J. N.; RAMOS, L. P.; BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. In: Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Wastes, Saddler, J. N., ed., 1993. London: C. A. B. International. pp. 73-92.
- SCHUERCH, C.; The Hemicelluloses *In*: Browning, B. L.; The Chemistry of Wood. New York: Interscience, 1963.
- SCHULTZ, T. P., TEMPLETON, M. C., BIERMANN, C. J. E MCGINNIS, G. D. Steam explosion of mixed hardwood chips, rice hulls, corn stalks, and sugar cane bagasse. Journal Agriculture Food Chemistry, v. 32, 1984, p. 1166-1172.

- SCHWALD, W.; BREUIL, C.; BROWNELL, H. H.; CHAN, M.; SADDLER, J.N. Assessment of pretreatment conditions to obtain fast complete hydrolysis on high substrate concentrations. Appl. Biochem. Biotechnol, v. 20/21,1989, p. 29-44.
- SHEVCHENKO, S.M.; BEATSON, R. P.; SADDLER, J. N. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77, 1999, p. 867-876.
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 1995. 106 p.
- SJÖSTRÖM, E. Wood Chemistry Fundamentals and Applications. 2. Ed. California, USA: Academic Press. 1992.
- SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. *In*: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. Biomass and Bioenergy, v. 24, 2003, p. 475-486.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a review. Bioresource Technology, v.83, 2002, p. 1-11.
- TANAHASHI, M., KARINA, M. E HIGUCHI, T. Mokuzai Gakkaishi. v. 36, 1990, p. 380.
- TAPPI TEST METHODS. Atlanta: TAPPI Press, 1994.

- TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. Enzyme and Microbial Technology, v. 28, 2001, p. 835-844.
- TERASHIMA, N.; FUKUSHIMA, K.; HE, L.F.; TAKABE, K. Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H. G.; Buxton, D. R.; Hatfield, R. D. and Ralph, J. Eds. Forage Cell Wall Structure and digestibility. Madison, Wisconsin: ASA/CSSA/SSSA, 1993, Cap. 10, p. 248-270.
- TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation. Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth-Heinemann, 1998.
- TOMASEC, M. E KOKTA, B. V. Steam explosion pulping: Effects of temperature and pressure on paper properties at constant pulp yield and ionic content. Tappi J. 1991, p. 119-125.
- UDOP - Usinas e Destilarias do Oeste Paulista. Disponível em <<http://www.udop.com.br>>, consultado em março de 2007.
- WASZCZYNSKYJ., N. Enzimas Celulolíticas de *Pycnoporus cinnabarinus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, 1991.
- WOOD, T. M.; McCRAE, S. I.; BHAT, K. M. The mechanism of fungal cellulase action. Synergism between enzyme components of *Penicillium pinophilum* cellulase in solubilizing hydrogen bond-ordered cellulose. Biochemistry Journal, v. 260, p. 37-43, 1989.
- WRIGHT, J. D. Ethanol form biomass by enzymatic hydrolysis. Chemical Engineering Process, v. 84, 1998, p. 62-74.

ZANDONÁ, A. Caracterização de Celulases Derivadas de Cepas Recombinantes de *Trichoderma reesei* e Uso no Tratamento de Fibras Celulósicas Comerciais. Tese de doutorado, UFPR, Curitiba, 2001.

ZANIN, G., SANTANA, C. C., BON, E. P. S., MORAES, F. F., MACEDO, I., COELHO NETO, C., ANDRIETTA, S. R., GIORDANO, R. C. L., LAHR FILHO, D., RAMOS, L. P., FONTANA, J. D. Brazilian bioethanol program. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.84-86, 2000, p.1147-1161