

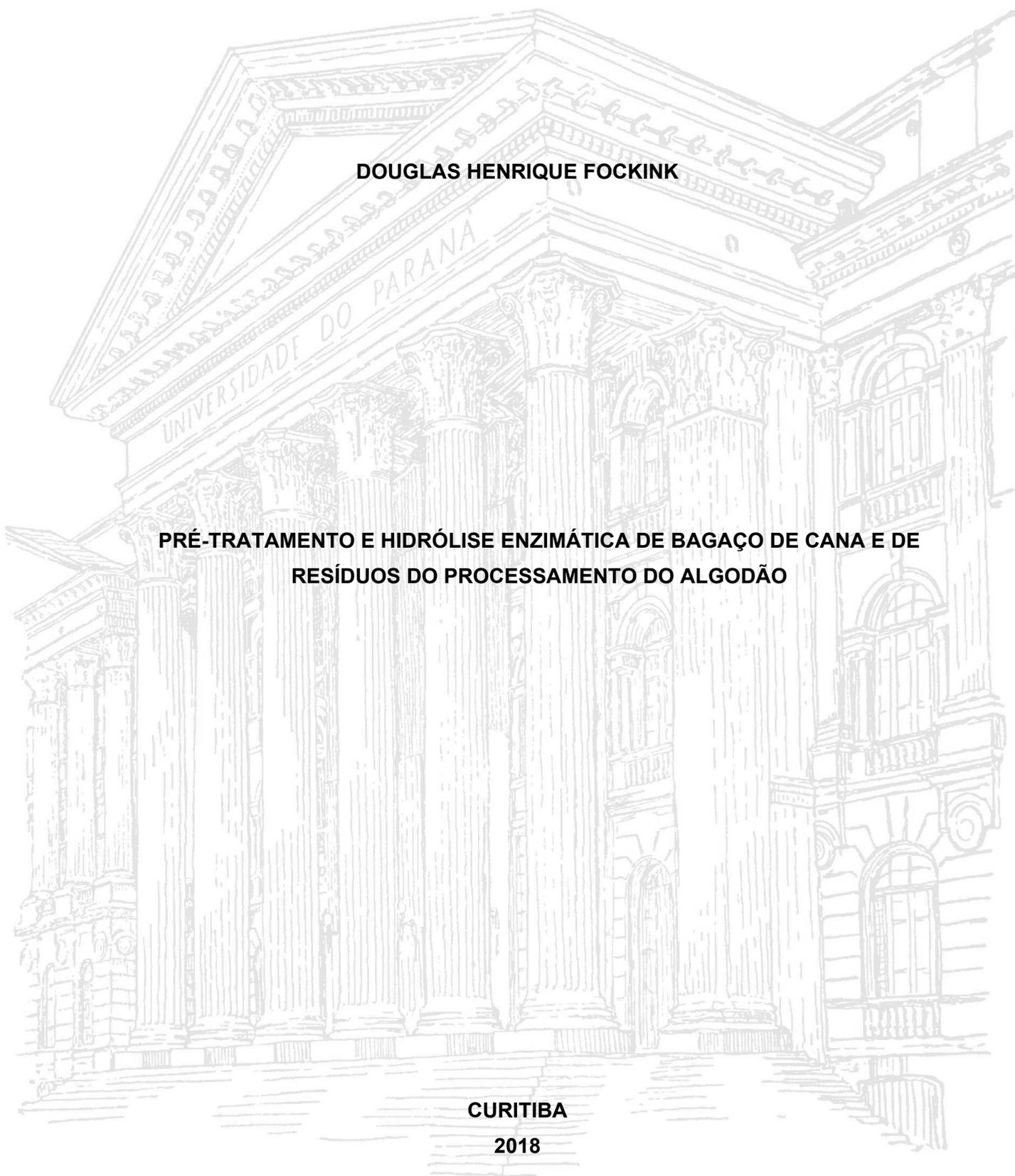
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DOUGLAS HENRIQUE FOCKINK**

**PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA E DE  
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO ALGODÃO**

**CURITIBA**

**2018**



**DOUGLAS HENRIQUE FOCKINK**

**PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA E DE  
RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO ALGODÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

**CURITIBA**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

---

F652p Fockink, Douglas Henrique  
Pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de cana e de resíduos do processamento do algodão /  
Douglas Henrique Fockink. – Curitiba, 2018.  
226 p. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em  
Química, 2018.

Orientador: Luiz Pereira Ramos.

1. Lignocelulose. 2. Dióxido de carbono supercrítico. 3. Hidróxido de sódio. 4. Imidazol. 5. Hidrólise  
enzimática. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.

CDD: 547

---

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214

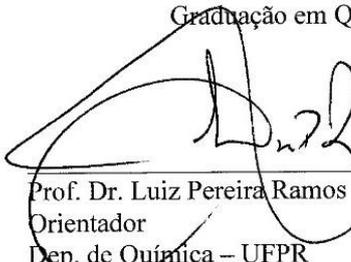
TERMO DE APROVAÇÃO

**PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE  
CANA E DE RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO ALGODÃO**

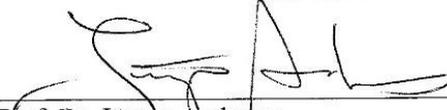
por

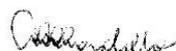
DOUGLAS HENRIQUE FOCKINK

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos  
Orientador  
Dep. de Química – UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Eduardo Driemeier  
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia de Bioetanol – CNPEM

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jürgen Andreaus  
Dep. de Química – FURB

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

  
\_\_\_\_\_  
Prof.ª Dr.ª Nadia Krieger  
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.

## AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Luiz Pereira Ramos, orientador desse trabalho, por todas as oportunidades, conselhos, ensinamentos e sobretudo por contribuir de forma tão dedicada à minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Dr. Rafał Łukasik (LNEG – Portugal) por ter prontamente me acolhido em seu grupo de pesquisa e por todos os valiosos ensinamentos transmitidos.

Ao prof. Dr. Jorge Sánchez (UPB – Colômbia) por me receber tão bem em seu laboratório e por ter me instruído nas análises reológicas.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Nádia Krieger (UFPR) pelas valiosas contribuições na avaliação dos relatórios anuais, do exame de qualificação e da defesa desta tese.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Luísa L. Lordello (UFPR) pela contribuição em minha formação desde o mestrado e por ter aceitado participar da banca de avaliação.

Ao prof. Dr. Jürgen Andreaus (FURB) que colaborou com a obtenção dos resíduos do algodão, para a realização do doutorado sanduíche e por ter aceitado avaliar essa tese.

Ao Dr. Carlos Eduardo Driemeier (CTBE) pela pronta disponibilidade em avaliar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná e à Capes pelo suporte técnico e financeiro ao longo do doutorado.

Aos colegas do CEPESQ pelo convívio diário e contribuições para a realização dos experimentos.

Aos colegas do LNEG pelas discussões para o desenvolvimento da investigação, em especial para a Ana Rita Morais pela colaboração no trabalho com dióxido de carbono.

À Novozymes Latin América pelo fornecimento das preparações enzimáticas comerciais utilizadas neste trabalho.

Ao Robson Rosseto por todo incentivo, compreensão, inspiração e conselhos durante toda essa jornada.

Aos queridos amigos Cleonice Hilbig, Cristiano Egevardt, Denize Hoffmeister, Jaqueline Pazinato e Priscila Sabino pelos momentos alegres e de apoio.

Aos amigos do laboratório CEPESQ e do Departamento de Química da UFPR, em especial à Daiane Szczerbowski, Débora Kohepka, Laís Dill, Mateus Urio e Vinicius Kothe pelas diversas discussões científicas, auxílio nas análises e por proporcionarem momentos descontraídos no laboratório.

Por fim, agradeço o apoio e incentivo de toda a minha família, em especial para meus pais Florentina e Astério, minhas irmãs Sandra e Simone e minha sobrinha Isabel.

## RESUMO

Diferentes métodos de pré-tratamentos ácidos e alcalinos foram investigados para o aproveitamento de bagaço de cana e de resíduos do processamento do algodão, visando maximizar a recuperação de seus componentes macromoleculares e produzir substratos celulósicos de alta acessibilidade à hidrólise enzimática. O primeiro método avaliado foi a explosão a vapor do bagaço de cana, que foi realizada nas configurações de auto-hidrólise e de catálise ácida empregando os ácidos sulfúrico e fosfórico. Nesse estudo buscou-se demonstrar a aplicabilidade do fator de severidade combinada (FSC) e para isso foram realizados experimentos sob severidades equivalentes ( $FSC \approx 0,76$ ). Diversas análises foram empregadas nos materiais pré-tratados e nas frações solúveis em água de modo a avaliar os efeitos dessas diferentes abordagens de pré-tratamentos. De modo geral, os materiais pré-tratados revelaram similaridades na composição química, na viscosidade complexa, no índice de cristalinidade e nos rendimentos de hidrólise enzimática, exceto para os materiais produzidos por catálise sulfúrica nas menores temperaturas e tempos de reação. As frações solúveis em água derivadas das diversas condições de pré-tratamento revelaram altas concentrações de pentoses como a xilose, além da inevitável formação de derivados furânicos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos, que foram caracterizados por métodos cromatográficos de análise. Os rendimentos globais de açúcares, englobando os resultados de pré-tratamento e de hidrólise enzimática, alcançaram valores de aproximadamente 90%, indicando resultados equivalentes para auto-hidrólise, catálise fosfórica e catálise sulfúrica. No entanto, a auto-hidrólise foi considerada superior por gerar substratos de reologia mais favorável à hidrólise em altos teores de sólidos totais. O emprego do sistema  $CO_2/H_2O$  no pré-tratamento do bagaço de cana revelou a possibilidade de uma remoção seletiva das hemiceluloses, produzindo materiais com teores de glucanas superiores a 50%. Tais pré-tratamentos foram organizados em um planejamento experimental Doehlert que resultaram em diferentes valores de FSC. Os maiores rendimentos na hidrólise enzimática foram obtidos para a condição intermediária de temperatura e tempo de reação ( $FSC = 0,48$ ), enquanto que a maior liberação de pentoses na fração solúvel em água ocorreu na condição de menor severidade ( $FSC = 0,16$ ). A análise estatística dos dados experimentais indicou a condição reacional de 190 °C e 0 min ( $FSC = -0,10$ ) para produzir o maior rendimento de açúcares solúveis, onde zero representa o tempo de aquecimento do reator até a temperatura pretendida. Essa reação foi testada experimentalmente e apresentou o resultado esperado de 74% de rendimento global de açúcares na fração solúvel em água e após hidrólise enzimática do material pré-tratado. Para os resíduos do processamento do algodão foi empregado primeiramente um pré-tratamento com hidróxido de sódio, avaliado através de um planejamento fatorial simples. Os materiais pré-tratados resultaram em altos teores de glucanas, maiores que 87% para o pó de filtro e 77% para o piolho sujo. Esses resultados foram atribuídos principalmente à remoção da lignina, alcançando, nos maiores níveis das variáveis estudadas (4% de NaOH em 120 °C), cerca de 75 e 85% para o pó de filtro e piolho sujo, respectivamente. Os maiores rendimentos de hidrólise enzimática foram de somente 50% para os materiais pré-tratados que apresentaram os menores teores de lignina. No entanto, ao realizar um novo planejamento fatorial com variação no teor de sólidos totais e na carga enzimática, foi possível aumentar o rendimento global de açúcares para 76 e 70% na melhor condição de hidrólise (5% de sólidos totais e 25 FPU  $g^{-1}$  de glucanas), respectivamente. O imidazol também foi avaliado como solvente de reação para o fracionamento dos resíduos do algodão. Após a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados, os rendimentos globais de açúcares solúveis foram favoráveis, porém, menores se comparados ao pré-tratamento com hidróxido de sódio. Portanto, um novo planejamento fatorial da hidrólise enzimática foi realizado e os rendimentos globais de açúcares solúveis foi aumentado de 51,4% para o pó de filtro e de 52,5% para o piolho sujo. Com isso, condições ideais para o pré-tratamento e hidrólise enzimática foram identificadas para diferentes materiais lignocelulósicos de interesse comercial.

**Palavras-chave:** lignocelulose, explosão a vapor, dióxido de carbono supercrítico, hidróxido de sódio, imidazol, hidrólise enzimática.

## ABSTRACT

Different acid and alkaline pretreatment methods were investigated for the utilization of sugarcane bagasse and cotton processing residues, aiming at maximizing the recovery of their macromolecular components and producing cellulosic substrates with high accessibility to the enzymatic hydrolysis. Steam explosion was investigated for sugarcane bagasse using three different approaches: auto-hydrolysis and pretreatments in the presence of dilute phosphoric and dilute sulfuric acids. This study was carried out to compare these pretreatment strategies at an equivalent combine severity factor (CSF) of 0.76. Several analytical methods were employed to evaluate the effects of pretreatment on the chemistry of pretreated materials and their corresponding water-soluble fractions. In general, the resulting pretreated materials revealed similarities in chemical composition, complex viscosity, crystallinity index and enzymatic hydrolysis yields, except for situations in which sulfuric acid was used lower temperatures and reaction times. The water-soluble fractions derived from these different pretreatment conditions revealed high concentrations of pentoses such as xylose, plus the inevitable formation of furan derivatives, aliphatic acids and phenolic compounds, which were characterized by advanced chromatographic methods. The overall sugar yields, which were obtained by accounting together the amount of sugars released by acid hydrolysis and by enzymatic hydrolysis of steam-treated substrates, reached values of approximately 90%, indicating equivalent results for auto-hydrolysis, phosphoric and sulfuric acid-catalyzed systems. However, auto-hydrolysis was more advantageous because the rheology of pretreated substrates were more favorable to hydrolysis at high total solids. The pretreatment of sugarcane bagasse by CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O revealed the selective removal of hemicelluloses, producing materials with glucan contents higher than 50%. Pretreatments were performed using a Doehlert experimental design that resulted in different CSF values. The highest enzymatic hydrolysis yields were obtained for an intermediate condition of temperature and reaction time (CSF = 0.48), while the highest release of pentoses in the water-soluble fraction was achieved for a lower pretreatment severity (CSF = 0.16). The statistical analysis of the experimental data indicated that heating up to 190 °C with no isothermic residence time (0 min, CSF = -0.10) produced the highest yields of water soluble sugars, where zero represents the reactor heating time to reach the desired reaction temperature. This reaction was tested experimentally and showed the expected overall sugar yield of 74%, considering the amount of sugars released in the water soluble fraction and by enzymatic hydrolysis at relatively high total solids. For the cotton gin residues, pretreatment with dilute sodium hydroxide was applied using a 2<sup>2</sup> factorial design. The pretreated materials showed high glucan contents, achieving more than 87% for the cotton gin dust (CGD) and 77% for the cotton gin waste (CGW). These results were attributed to substrate swelling and lignin removal, which at the highest levels of the studied variables (4% NaOH at 120 °C) reached 75 and 85% for CGD and CGW, respectively. The highest enzymatic hydrolysis yields were only 50% for pretreated materials that were produced with the lowest lignin contents. In an attempt to improve the enzymatic hydrolysis of the best CGD and CGW pretreated substrates, a new set of experiments was organized in a typical 2<sup>2</sup> factorial design, with variations in the total solids and enzyme loading. Therefore, it was possible to increase the overall sugar yields to 76 and 70% in the best hydrolysis condition (5% total solids and 25 FPU g<sup>-1</sup> glucan), respectively. Imidazole was also evaluated as a reaction solvent for the fractionation of cotton gin residues. After enzymatic hydrolysis of the pretreated materials, the overall sugar yields were increased but at a lower rate compared to pretreatment with dilute sodium hydroxide. A 2<sup>2</sup> factorial design was performed to enhance the enzymatic hydrolysis profile of pretreated materials and this increased the overall sugar yields to 51.4% for CGD and to 52.5% for CGW. With these, the ideal conditions for pretreatment and enzymatic hydrolysis were identified for different lignocellulosic materials of high commercial interest.

**Keywords:** lignocellulose, steam explosion, supercritical carbon dioxide, sodium hydroxide, imidazole, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação da rede de ligações de hidrogênio entre cadeias lineares da celulose, evidenciando as várias unidades consecutivas de celobiose. ....	30
<b>Figura 2.</b> Fragmentos estruturais de alguns tipos de hemiceluloses: (A) 4-O-metil-glucuronoxilana, (B) xiloglucana e (C) 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana (adaptado de EBRINGEROVA et al., 2005 e SILVEIRA et al., 2014). ....	31
<b>Figura 3.</b> Estruturas químicas dos álcoois (A) p-cumarílico, (B) coniferílico e (C) sinapílico. ....	32
<b>Figura 4.</b> Modelo de representação estrutural da lignina evidenciando alguns dos principais tipos de conectividades formadas entre as unidades (adaptado de CRESTINI et al. 2011). ....	33
<b>Figura 5.</b> Ilustração do modo de ação das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose. CBH: celobioidrolases, EG: endoglucanases, $\beta$ G: $\beta$ -glucosidases, CBM: módulo de ligação aos carboidratos e AA9: enzimas auxiliares da família 9 (adaptado de SILVEIRA et al. 2014).....	43
<b>Figura 6.</b> Classificação do comportamento reológico dos fluidos (adaptado de GABAS et al. 2012).....	51
<b>Figura 7.</b> Comportamento reológico dos fluidos independentes do tempo (adaptado de GABAS et al. 2012). ....	52
<b>Figura 8.</b> Reator utilizado para a explosão a vapor do bagaço de cana.....	57
<b>Figura 9.</b> Reator utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O. ....	59
<b>Figura 10.</b> Configuração do reômetro usado nos experimentos realizados (A) em fluxo e (B) em sistema oscilatório. ....	66
<b>Figura 11.</b> Biorreator de bancada utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática. ...	69
<b>Figura 12.</b> Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse trabalho para o pré-tratamento do bagaço de cana. ....	76
<b>Figura 13.</b> Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse trabalho para pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão.....	77
<b>Figura 14.</b> Rendimentos de recuperação mássica nas frações insolúvel (material pré-tratado) e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco. ....	83

**Figura 15.** Perfil típico de varredura da frequência oscilatória para o material BF (195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco) em diferentes teores de sólidos totais (ST). .....86

**Figura 16.** Viscosidade complexa na frequência angular de 1 rad s<sup>-1</sup> em função do teor de sólidos totais para os materiais pré-tratados pelas diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor. As mesmas letras acima das barras para cada teor de sólidos totais não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.87

**Figura 17.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições de explosão a vapor descritas na Tabela 1. Condições da hidrólise enzimática: 2% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. ....91

**Figura 18.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições de explosão a vapor. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.....93

**Figura 19.** Consumo de energia durante a hidrólise enzimática em 15% de sólidos totais do bagaço de cana pré-tratado a vapor no biorreator de bancada. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. ....98

**Figura 20.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de carboidratos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5

min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. .... 99

**Figura 21.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de ácidos alifáticos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. .... 100

**Figura 22.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de derivados furânicos. HMF: 5-(hidroximetil)-furfural, 5-MF: 5-metil-2-furfural. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. .... 101

**Figura 23.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de compostos fenólicos. AV: ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), AS: ácido siríngico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), AF: ácido ferúlico (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico), p-AC: ácido p-cumárico (ácido (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico), 4-AH: ácido 4-hidroxibenzóico, AC: ácido cafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico), SD: siringaldeído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído), 4-HD: 4-hidroxibenzaldeído. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco. .... 102

**Figura 24.** Cromatograma da fração solúvel em água trimetilsililada resultante do pré-tratamento catalisado por ácido fosfórico (BF). Os compostos trimetilsililados foram derivados do: **1:** ácido 2-hidroxipropanoico (ácido láctico); **2:** ácido furoico; **3:** ácido benzoico; **4:** 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina); **5:** ácido 5-hidroximetil-2-furoico; **6:** ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocatecuico); **a:** 1-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)propan-2-ona; **b:** 4-propilfenol; **c:** 4-(1-hidroxietil)-2-metoxifenol; **d:** 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; **e:**

1-hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; <b>f</b> : 4-(3-hidroxi-3-propil)-2,6-dimetoxifenol;	
<b>g</b> : ácido 3-(3,4-dihidroxi-3-fenil)propanoico; <b>h</b> : 4-(3-hidroxi-3-prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol (álcool sinapílico); <b>i</b> e <b>j</b> : dímeros do ácido fenilpropenoico com arabinose. ....	104
<b>Figura 25.</b> Exemplos das estruturas de cetonas de Hibbert obtidas após a hidrólise ácida da lignina (adaptado de KULKA e HIBBERT, 1943 e FISHER et al., 1944).....	105
<b>Figura 26.</b> Proposta de mecanismo para a clivagem da ligação aril éter do tipo $\beta$ -O-4 da lignina catalisada por ácido com a formação de uma cetona de Hibbert (adaptado de MITCHELL et al., 2014 e MILES-BARRETT et al., 2016). ....	106
<b>Figura 27.</b> Espectros de massas dos compostos trimetilsililados proposto pelo banco de dados NIST com a similaridade em parênteses. <b>1</b> : ácido 2-hidroxi-3-propanoico (ácido láctico, 96%); <b>2</b> : ácido furoico (95%); <b>3</b> : ácido benzoico (89%); <b>4</b> : 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina, 95%); <b>5</b> : ácido 5-hidroximetil-2-furoico (90%); <b>6</b> : ácido 3,4-dihidroxi-3-benzoico (ácido protocatecoico, 93%). ....	108
<b>Figura 28.</b> Espectros de massas dos propostos compostos trimetilsililados baseados no padrão de fragmentação. <b>a</b> : 1-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-fenil)propan-2-ona; <b>b</b> : 4-propilfenol; <b>c</b> : 4-(1-hidroxi-3-etil)-2-metoxifenol; <b>d</b> : 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; <b>e</b> : 1-hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; <b>f</b> : 4-(3-hidroxi-3-propil)-2,6-dimetoxifenol.....	109
<b>Figura 29.</b> Espectros de massas dos propostos compostos trimetilsililados baseados no padrão de fragmentação. <b>g</b> : ácido 3-(3,4-dihidroxi-3-fenil)propanoico; <b>h</b> : 4-(3-hidroxi-3-prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol (álcool sinapílico); <b>i</b> : éster derivado do ácido p-cumárico com arabinose; <b>j</b> : éster derivado do ácido ferulico com arabinose.....	110
<b>Figura 30.</b> Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nos materiais pré-tratados e frações solúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço da cana. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco. ....	111
<b>Figura 31.</b> Rendimento global de açúcares obtidos nas frações solúveis em água do pré-tratamento por explosão a vapor e após 96 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v <sup>-1</sup> ) de sólidos totais e 23,1 FPU g <sup>-1</sup> glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g <sup>-1</sup> de substrato seco.....	112

**Figura 32.** (A) Rendimento de EqGlc e (B) concentração de EqGlc durante as diferentes condições de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA – 195 °C e 7,5 min). Linhas pontilhadas referem-se aos pontos axiais. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 22% sólidos totais. .... 115

**Figura 33.** (A) Rendimento de xilose e (B) concentração de xilose durante as diferentes condições de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). Linhas pontilhadas referem-se aos pontos axiais. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 22% sólidos totais. .... 116

**Figura 34.** Gráficos de contorno obtidos para os parâmetros cinéticos fractais (A) k (h<sup>-1</sup>) e (B) h da hidrólise enzimática das glucanas presentes no bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). .... 120

**Figura 35.** Gráficos de contorno obtidos para os parâmetros cinéticos fractais (A) k (h<sup>-1</sup>) e (B) h da hidrólise enzimática das xilanas presentes no bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). .... 121

**Figura 36.** Viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA) no ponto central do planejamento fatorial (23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% de sólidos totais) para diferentes tempos de hidrólise enzimática. ... 123

**Figura 37.** Rendimentos de recuperação mássica nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço de cana. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.. 127

**Figura 38.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições do sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Condições da hidrólise enzimática: 2% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de

Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 130

**Figura 39.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições do sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 132

**Figura 40.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de carboidratos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 134

**Figura 41.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de ácidos alifáticos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 135

**Figura 42.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de derivados furânicos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 136

**Figura 43.** Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nos materiais pré-tratados e frações solúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço da cana. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 137

**Figura 44.** Rendimento global de açúcares obtidos nas frações solúveis em água do pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e após 96 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3. As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min. .... 138

<b>Figura 45.</b> Gráfico de contorno obtido para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O e hidrólise enzimática do bagaço de cana.....	140
<b>Figura 46.</b> Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado pelos sistemas com CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O e N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v <sup>-1</sup> ) de sólidos totais e 23,1 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3.Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	143
<b>Figura 47.</b> Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática para o (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com hidróxido de sódio sob as diferentes condições descritas na Tabela 3. Condições da hidrólise enzimática: 5% (m v <sup>-1</sup> ) de sólidos totais e 8,8 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.....	151
<b>Figura 48.</b> Recuperação dos principais componentes para os materiais derivados do (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com imidazol sob as diferentes condições reacionais descritas na Tabela 3. Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.....	152
<b>Figura 49.</b> Rendimento global de açúcares solúveis após 96 h de hidrólise enzimática do (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com hidróxido de sódio. Condições de hidrólise: 5% (m v <sup>-1</sup> ) de sólidos totais e 8,8 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2). Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.....	153
<b>Figura 50.</b> Gráficos de Pareto para o rendimento global de açúcares obtido após hidrólise enzimática do (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH). ....	156
<b>Figura 51.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 6. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PF-1: 25 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-4: 15 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g <sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais.....	157
<b>Figura 52.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH), obtido sob as diferentes	

condições de hidrólise descritas na Tabela 6. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PS-1: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-4: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais..... 160

**Figura 53.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol. Condições da hidrólise enzimática: 5% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h..... 165

**Figura 54.** Recuperação dos principais componentes do piolho sujo pré-tratado com imidazol sob as diferentes condições reacionais descritas na Tabela 4. Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h..... 166

**Figura 55.** Rendimento global de açúcares solúveis após 96 h de hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol. Condições de hidrólise: 5% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> glucanas (Cellic CTec2). Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h. .... 167

**Figura 56.** Gráfico de Pareto para o rendimento global de açúcares obtido após hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h). .... 168

**Figura 57.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 7. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PF-1: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-4: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais. .... 170

**Figura 58.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 7. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PS-1: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-4: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais... 173

**Figura A1.1.** Difractogramas do (A) bagaço de cana nativo e para as frações de (B) holocelulose e (C) α-celulose. ....200

<b>Figura A1.2.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica (BF). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	201
<b>Figura A1.3.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-1). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	202
<b>Figura A1.4.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-2). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	203
<b>Figura A1.5.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-3). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	204
<b>Figura A1.6.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-1). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	205
<b>Figura A1.7.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-2). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	206
<b>Figura A1.8.</b> Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-3). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU $g^{-1}$ de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. ....	207
<b>Figura A3.1.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro k dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	213
<b>Figura A3.2.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro h dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	214
<b>Figura A3.3.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro k dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	217
<b>Figura A3.4.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro h dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	218

<b>Figura A4.1.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro k dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol. ....	221
<b>Figura A4.2.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro h dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol. ....	222
<b>Figura A4.3.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro k dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol. ....	225
<b>Figura A4.4.</b> Gráficos de Pareto para o parâmetro h dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol. ....	226

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições experimentais utilizadas para o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. ....	58
<b>Tabela 2.</b> Planejamento experimental Doehlert (valores experimentais e codificados) aplicado para o pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O. ....	60
<b>Tabela 3.</b> Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para o pré-tratamento com NaOH do pó de filtro e do piolho sujo. ....	62
<b>Tabela 4.</b> Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para o pré-tratamento com imidazol do piolho sujo. ....	63
<b>Tabela 5.</b> Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na condição de auto-hidrólise (195 °C e 7,5 min). ....	70
<b>Tabela 6.</b> Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão após pré-tratamento a 120 °C com 4% de NaOH. ....	71
<b>Tabela 7.</b> Planejamento experimental fatorial 2 <sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão após pré-tratamento com imidazol a 140 °C por 2 h. ....	72
<b>Tabela 8.</b> Composição química do bagaço de cana nativo utilizado nos pré-tratamentos de explosão a vapor. ....	79
<b>Tabela 9.</b> Fatores de severidade combinada (FSC) após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. ....	82
<b>Tabela 10.</b> Composição química da fração insolúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. ....	85
<b>Tabela 11.</b> Índice de cristalinidade (ICr) dos materiais pré-tratados e após o procedimento de deslignificação em comparação com o bagaço de cana nativo. ....	88
<b>Tabela 12.</b> Composição química da holocelulose derivada do material nativo e das frações insolúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. ....	90
<b>Tabela 13.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática em agitador orbital dos diferentes materiais produzidos por explosão a vapor. ....	95
<b>Tabela 14.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática em bioreator de bancada dos diferentes materiais produzidos neste estudo. ....	96
<b>Tabela 15.</b> Rendimentos de açúcares obtidos após 96 h de hidrólise enzimática por agitação orbital e pelo biorreator do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor. ....	97

<b>Tabela 16.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). .....	117
<b>Tabela 17.</b> Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros cinéticos fractais derivados do planejamento experimental da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). .....	118
<b>Tabela 18.</b> Viscosidade aparente durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana auto-hidrolisado padrão (BA) para as diferentes condições do planejamento fatorial.....	124
<b>Tabela 19.</b> Composição química do bagaço de cana nativo utilizado nos pré-tratamentos com o sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O. ....	125
<b>Tabela 20.</b> Fatores de severidade após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O do bagaço de cana. ....	126
<b>Tabela 21.</b> Composição química da fração insolúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O do bagaço de cana.....	129
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática dos diferentes materiais produzidos pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O. ....	133
<b>Tabela 23.</b> Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O e hidrólise enzimática do bagaço de cana. ....	139
<b>Tabela 24.</b> Composição da fração solúvel em água (g L <sup>-1</sup> ) obtida após o pré-tratamento com os sistemas CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O e auto-hidrólise na condição de 190 °C por 0 min.....	142
<b>Tabela 25.</b> Composição química dos materiais pré-tratados pelos diferentes sistemas reacionais com seus respectivos valores de IC <sub>r</sub> e rendimentos de EqGlc após 96 h de hidrólise enzimática. ....	143
<b>Tabela 26.</b> Composição química dos resíduos do processamento do algodão nativos utilizados nos pré-tratamentos com hidróxido de sódio.....	146
<b>Tabela 27.</b> Rendimentos de recuperação mássica dos resíduos de algodão após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio. ....	147
<b>Tabela 28.</b> Composição química dos substratos produzidos a partir do pó de filtro após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio. ....	148
<b>Tabela 29.</b> Composição química dos substratos produzidos a partir do piolho sujo após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio. ....	149
<b>Tabela 30.</b> Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento com hidróxido de sódio do pó de filtro e do piolho sujo. ....	154
<b>Tabela 31.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados derivados do pó de filtro com hidróxido de sódio. .....	159

<b>Tabela 32.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de piolho sujo pré-tratadas com hidróxido de sódio. ....	161
<b>Tabela 33.</b> Rendimentos de recuperação mássica de amostras de piolho sujo após as diferentes condições de pré-tratamento com imidazol. ....	162
<b>Tabela 34.</b> Composição química de amostras de piolho sujo produzidas após as diferentes condições de pré-tratamento com imidazol. ....	164
<b>Tabela 35.</b> Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento com imidazol do piolho sujo. ....	167
<b>Tabela 36.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de pó de filtro pré-tratadas com imidazol. ....	171
<b>Tabela 37.</b> Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de piolho sujo pré-tratadas com imidazol. ....	174
<b>Tabela A1.1.</b> Recuperação dos principais componentes nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. ....	208
<b>Tabela A1.2.</b> Composição química do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na condição de auto-hidrólise (195 °C por 7,5 min). ....	209
<b>Tabela A2.1.</b> Recuperação dos principais componentes nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O do bagaço de cana. ....	210
<b>Tabela A3.1.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro k dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	211
<b>Tabela A3.2.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro h dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	212
<b>Tabela A3.3.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro k dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	215
<b>Tabela A3.4.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro h dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio. ....	216
<b>Tabela A4.1.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro k dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol. ....	219
<b>Tabela A4.2.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro h dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol. ....	220
<b>Tabela A4.3.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro k dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol. ....	223
<b>Tabela A4.4.</b> Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro h dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol. ....	224

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA9 – Atividades auxiliares da família 9
- ANOVA – Análise de variância
- AC – Ácido cafeico
- AF – Ácido ferúlico
- AS – Ácido siríngico
- AV – Ácido vanílico
- BA – Bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (explosão a vapor)
- BC – Bagaço de cana pré-tratado pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O
- BF – Bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica (explosão a vapor)
- BS – Bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (explosão a vapor)
- CBM – Módulo de ligação aos carboidratos (do inglês, *carbohydrate binding module*)
- CG-EM – Cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CLC – Complexos lignina-carboidrato
- CLAE – Cromatografia a líquido de alta eficiência
- DNS – Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- DRX – Difractometria de raios-X
- EG – Endoglucanase
- EqGlc – Equivalentes de glucose
- FPU – Unidades de papel de filtro (do inglês, *filter paper unit*)
- FSC – Fator de severidade combinada
- FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub> – Fator de severidade combinada do sistema com dióxido de carbono
- GP – Grau de polimerização
- h* – Coeficiente fractal
- HE/PF – Hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado
- HE/PS – Hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado
- HE/BA – Hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (explosão a vapor)
- HMF - 5-(hidroximetil)-furfural
- ICr – Índice de cristalinidade
- k* – Constante de velocidade do modelo fractal
- LIs – Líquidos iônicos
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- NIST – Banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*)

NREL - Laboratório Nacional de Energia Renovável (do inglês, *National Renewable Energy Laboratory*)

*p*-AC – Ácido *p*-cumárico

PF – Pó de filtro

PS – Piolho sujo

$R_o$  – Ordenada da reação (do inglês, *reaction ordinate*)

scCO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono supercrítico

SD – Siringaldeído

SHF – Fermentação e hidrólise em separado (do inglês, *Separate hydrolysis and fermentation*)

SSF – Fermentação e hidrólise simultâneas (do inglês, *Simultaneous saccharification and fermentation*)

PT/PF – Pré-tratamento do pó de filtro

PT/PS – Pré-tratamento do piolho sujo

$\beta$ G –  $\beta$ -glucosidase

$\mu_{ap}$  – Viscosidade aparente

4-AH – Ácido 4-hidroxibenzóico

4-HD – 4-hidroxibenzaldeído

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	29
2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA ....	29
2.2 PRÉ-TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	33
2.2.1 Fator de severidade.....	40
2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS .....	42
2.3.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática .....	44
2.3.2 Potencial da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais.....	46
2.3.3 A importância da reologia na hidrólise enzimática .....	49
2.3.4 Aplicação do modelo cinético fractal na hidrólise enzimática .....	53
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	55
3.1 OBJETIVO GERAL.....	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	55
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	56
4.1 MATERIAL.....	56
4.2 MÉTODOS.....	56
4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor.....	56
4.2.2 Pré-tratamento do bagaço de cana pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O.....	59
4.2.3 Pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com hidróxido de sódio .....	61
4.2.4 Pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com imidazol.....	62
4.2.5 Composição química dos substratos nativos e pré-tratados .....	63
4.2.6 Holocelulose e α-celulose dos substratos nativos e pré-tratados.....	64
4.2.7 Comportamento reológico dos materiais produzidos .....	65
4.2.8 Cristalinidade dos substratos nativos e pré-tratados.....	66
4.2.9 Composição química das frações solúveis em água.....	67
4.2.9.1 Carboidratos, ácidos alifáticos e compostos furânicos por CLAE .....	67
4.2.9.2 Derivados fenólicos e compostos furânicos por CLAE.....	67
4.2.9.3 Derivados fenólicos e compostos furânicos por CG-EM .....	67
4.2.10 Ensaio de hidrólise enzimática dos substratos nativos e pré-tratados .....	68
4.2.10.1 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e pré-tratado por explosão a vapor .....	68
4.2.10.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e pré-tratado pelo sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O .....	70

4.2.10.3 Hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão nativos e pré-tratados com hidróxido de sódio .....	70
4.2.10.4 Hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão nativos e pré-tratados com imidazol .....	71
4.2.11 Atividade enzimática dos complexos enzimáticos .....	72
4.2.12 Aplicação do modelo cinético fractal .....	73
4.2.13 Análise estatística dos planejamentos experimentais .....	73
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1 PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS DO BAGAÇO DE CANA .....</b>	<b>78</b>
5.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor .....	78
5.1.1.1 Composição química dos materiais pré-tratados .....	84
5.1.1.2 Comportamento reológico dos materiais pré-tratados .....	84
5.1.1.3 Cristalinidade do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados .....	87
5.1.1.4 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados .....	91
5.1.1.5 Aumento de escala da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados .....	95
5.1.1.6 Composição química das frações solúveis em água .....	98
5.1.1.7 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos .....	111
5.1.1.8 Rendimento global de açúcares .....	112
5.1.1.9 Estudo detalhado da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor .....	113
5.1.2 Pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O .....	124
5.1.2.1 Composição química dos materiais pré-tratados .....	128
5.1.2.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados .....	130
5.1.2.3 Composição química das frações solúveis em água .....	133
5.1.2.4 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos .....	136
5.1.2.5 Rendimento global de açúcares .....	138
5.1.2.6 Análise estatística .....	139
5.1.2.7 Comparação do sistema CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O com outros processos hidrotérmicos .....	141
<b>5.2 PRÉ-TRATAMENTOS ALCALINOS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO ALGODÃO .....</b>	<b>144</b>
5.2.1 Pré-tratamento dos resíduos do algodão com hidróxido de sódio .....	145
5.2.1.1 Composição química dos materiais pré-tratados .....	147
5.2.1.2 Hidrólise enzimática dos resíduos do algodão nativos e pré-tratados .....	150
5.2.1.3 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos .....	150
5.2.1.4 Rendimento global de açúcares .....	153
5.2.1.5 Estudo detalhado da hidrólise enzimática dos resíduos do algodão pré-tratados com hidróxido de sódio .....	155

5.2.2 Pré-tratamento dos resíduos do algodão com imidazol .....	162
5.2.2.1 Composição química dos materiais pré-tratados .....	163
5.2.2.2 Hidrólise enzimática do piolho sujo nativo e dos materiais pré-tratados .....	163
5.2.2.3 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos.....	165
5.2.2.4 Rendimento global de açúcares .....	166
5.2.2.5 Avaliação do pré-tratamento com imidazol para o pó de filtro.....	169
5.2.2.6 Estudo detalhado da hidrólise enzimática dos resíduos do algodão pré-tratados com imidazol.....	169
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>176</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>180</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>181</b>
<b>APÊNDICE 1 - Resultados adicionais do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor .....</b>	<b>200</b>
<b>APÊNDICE 2 - Resultados adicionais do pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.....</b>	<b>210</b>
<b>APÊNDICE 3 - Resultados adicionais do pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com hidróxido de sódio .....</b>	<b>211</b>
<b>APÊNDICE 4 - Resultados adicionais do pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com imidazol .....</b>	<b>219</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos maiores desafios da humanidade é o de desenvolver a capacidade de gerar a energia necessária para consumo de forma sustentável. Os combustíveis obtidos a partir de recursos renováveis representam uma alternativa para esse objetivo e têm despertado grande interesse nas últimas décadas, principalmente devido à necessidade de se mitigar a poluição atmosférica oriunda da queima de combustíveis fósseis. O Brasil é considerado exemplo mundial na produção e utilização de biocombustíveis líquidos, com destaque para o etanol e o biodiesel. Cabe destacar que o Governo Brasileiro lançou em 2017 a nova Política Nacional de Biocombustíveis, materializada no programa RenovaBio, que busca impulsionar a expansão dos combustíveis renováveis na matriz energética nacional de forma sustentável, em resposta ao Acordo do Clima de Paris. O RenovaBio estabelece metas nacionais de redução de emissões para um período de 10 anos, o que exigirá, dentre outros, a duplicação da produção anual de biocombustíveis no país (BRASIL, 2017).

O etanol é um dos mais importantes combustíveis renováveis e sua utilização em comparação com a gasolina pode diminuir em até 80% as emissões dos gases causadores do efeito estufa (FAO, 2008). A produção mundial de etanol está baseada principalmente na fermentação alcoólica da sacarose presente no caldo da cana (modelo brasileiro) ou em hidrolisados enzimáticos do amido de milho (modelo norte-americano) (CANILHA *et al.*, 2010). Em ambos os casos, as tecnologias de produção já estão totalmente dominadas, mas os insumos necessários aos processos são de alto valor agregado e de importância estratégica para a segurança alimentar; por esses motivos, tais tecnologias são consideradas de primeira geração. O Brasil e os Estados Unidos da América são os maiores produtores mundiais, com 27,6 e 58,0 milhões de litros produzidos no ano de 2016, respectivamente (RFA, 2016).

Uma alternativa para aumentar a produção de etanol no Brasil é a ampliação da fronteira agrícola. No entanto, isto pode comprometer a biodiversidade local e a disponibilidade de áreas férteis para o plantio de outras culturas alimentícias. Além disso, o processo de produção de etanol brasileiro compete diretamente com a produção de açúcar, que pode ser, inclusive, mais rentável para a indústria devido às oscilações do valor de mercado desses produtos (CHANDEL *et al.*, 2014). Na safra de 2016/2017 foram cultivadas cerca de 657 milhões de toneladas de cana, com uma estimativa de produção de 646 milhões de toneladas para a safra 2017/2018. Após o processamento da cana para produção de açúcar e etanol, são obtidos como resíduos cerca de 14% de bagaço e 14% de palha em base seca, o que representou nessa última safra cerca de 90 milhões de toneladas de cada um desses materiais (CONAB, 2017), cuja destinação principal tem sido

a co-geração de energia através de sua queima e a adubagem e preparo da terra para um novo plantio (adubação verde). Porém, essas técnicas consomem apenas uma parte do que é gerado e, dessa maneira, milhões de toneladas de biomassa permanecem acumuladas nos entornos das sucroalcooleiras. Outros tipos de biomassas resíduais produzidas em grande escala no Brasil são derivadas de atividades da indústria têxtil. Em 2017, 1 milhão de hectares foram destinados para a produção de algodão, o que gerou cerca de 1,6 milhões de toneladas de fibras de algodão refinadas (USDA, 2017). Os principais resíduos gerados na cadeia produtiva do algodão surgem durante a colheita (como os caules da planta) e em diferentes etapas do processo industrial de beneficiamento das fibras, nos quais se destacam os resíduos denominados piolho sujo e pó de filtro. No entanto, estudos para aplicação dos resíduos do algodão em biocombustíveis ou outros produtos de valor agregado são ainda escassos (AGBLEVOR *et al.*, 2003; ISCI e DEMIRER, 2007; MCINTOSH *et al.*, 2014; GRILC *et al.*, 2015). Em vista disso, a utilização dos resíduos do processamento da cana e do algodão, assim como outros resíduos de origem agrícola ou agroflorestal, genericamente designados de biomassa lignocelulósica, podem contribuir para aumentar a produção de etanol e assim atender ao setor de transportes e à indústria alcoolquímica. A produção de etanol a partir dessas matrizes é denominada etanol celulósico ou de segunda geração e está baseada na fermentação dos carboidratos liberados pela hidrólise da celulose e das hemiceluloses em um processo integrado que ainda apresenta algumas barreiras tecnológicas à comercialização (JONKER *et al.*, 2015; CAVALETT *et al.*, 2017).

Efetivamente, o etanol é o mais estudado e importante composto que pode ser produzido a partir da biomassa lignocelulósica. Uma prova disso foi a inauguração de duas indústrias de etanol celulósico no Brasil em 2014, a Granbio em Alagoas/AL e a Raízen em Piracicaba/SP, ambas com produção de etanol a partir do bagaço e palha da cana. Entretanto, outros intermediários químicos também podem ser gerados a partir do mesmo material em um conceito denominado de biorrefinaria. De acordo com o Laboratório Nacional de Energia Renovável – NREL (do inglês, *National Renewable Energy Laboratory*), as biorrefinarias podem ser definidas como processos integrados que visam a conversão máxima da lignocelulose em um espectro de produtos passíveis de comercialização, como combustíveis, energia e insumos para a indústria química. Independentemente do produto que se deseja obter, o entendimento dos fatores químicos e estruturais responsáveis pela recalcitrância dos materiais lignocelulósicos é fundamental para viabilizar a sua utilização. A recalcitrância da estrutura da parede celular vegetal é caracterizada principalmente pela forte interação entre as cadeias de celulose, hemiceluloses e lignina, sendo que esses três componentes somam mais de 90% da massa seca total (CANILHA *et al.*, 2010). Por esse motivo, uma etapa de pré-tratamento é

essencial para amenizar a interação entre os principais constituintes da biomassa ou proporcionar o fracionamento desses, tornando-a mais suscetível à reações posteriores, como, por exemplo, a conversão enzimática dos carboidratos em açúcares solúveis (RAMOS, 2003).

As estratégias de pré-tratamento podem ser classificadas de acordo com sua atuação na matéria-prima lignocelulósica, podendo ser de natureza física, química, biológica ou de suas combinações (ALVIRA *et al.*, 2010). Na maior parte dos casos, a etapa de pré-tratamento visa reduzir o teor de hemiceluloses e/ou lignina, o que altera simultaneamente a arquitetura da parede celular através do aumento da área superficial e da acessibilidade de glucanas (SUN *et al.*, 2016; AUXENFANS *et al.*, 2017). No entanto, dependendo das condições reacionais do pré-tratamento, pode ocorrer a degradação parcial dos carboidratos (hexoses e pentoses) e lignina produzindo compostos furânicos e fenólicos, respectivamente. Se o objetivo do processo é produzir etanol celulósico, esses compostos atuam como inibidores das etapas subsequentes de hidrólise enzimática e fermentação (LARSSON *et al.*, 2000; XIMENES *et al.*, 2011). Portanto, faz-se necessário selecionar condições de pré-tratamento que sejam apropriadas à conversão efetiva da biomassa lignocelulósica em açúcares solúveis, sem que haja o acúmulo excessivo de compostos inibitórios nos hidrolisados obtidos (KIM *et al.*, 2016). Cabe destacar que a escolha de um tipo de pré-tratamento deve ser compatível com as propriedades químicas e físicas do material lignocelulósico que se pretenda utilizar como matéria-prima (CHANDRA *et al.*, 2007; ZHANG, 2008).

Dentre os vários tipos de pré-tratamento relatados na literatura, a explosão a vapor vêm sendo vastamente aplicada para vários tipos de biomassas e é considerada como um dos processos mais eficientes e economicamente viáveis para separar os principais constituintes da biomassa vegetal, aumentando assim a sua suscetibilidade à bioconversão (MCINTOSH *et al.*, 2016; GAUR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Recentemente, fluidos supercríticos surgiram como propostas inovadoras ao fracionamento da biomassa, com destaque para o dióxido de carbono devido à menor energia requerida para alcançar o seu estado crítico (MORAIS *et al.*, 2014; SERNA *et al.*, 2016). Ambos os métodos relatados caracterizam pré-tratamentos ácidos, que têm como princípio a solubilização de grande parte das hemiceluloses presentes no material lignocelulósico pela quebra de ligações do complexo lignina-carboidrato. Outras abordagens promissoras e consideradas simples são os pré-tratamentos que utilizam reagentes alcalinos, como os hidróxidos de sódio e cálcio. O principal efeito desses é a remoção da lignina, que aumenta a porosidade e a área superficial de contato do material pré-tratado (KIM *et al.*, 2016).

Na maioria dos casos, a etapa posterior ao pré-tratamento é a hidrólise dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos e esta é realizada frequentemente

por um complexo multienzimático comercial (LYND, 1996). Várias preparações enzimáticas comerciais já foram desenvolvidas para este fim, porém, o seu alto custo de produção ainda é uma das principais barreiras à comercialização. Portanto, a redução da carga enzimática utilizada na reação de hidrólise é um dos fatores mais importantes para demonstrar a viabilidade econômica do processo. Além disso, outro fator de grande impacto é a obtenção de altas concentrações de açúcares, que são normalmente atingidas pela condução da reação na presença de elevados teores de sólidos totais (YUN *et al.*, 2001). Por exemplo, na produção de etanol celulósico, o emprego de altos teores de sólidos totais na hidrólise enzimática (maiores que 10%) permite uma redução significativa nos custos de produção devido à redução do número dos reatores, tanques de estocagem e energia requerida para trocas térmicas (aquecimento e resfriamento) durante a destilação (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992; JØRGENSEN *et al.*, 2007; ROCHE *et al.*, 2009a; YANG *et al.*, 2011). Avaliações econômicas sugeriram que um aumento na carga de substrato de 5 para 8% pode reduzir o custo total de produção em cerca de 20% (CHEN e QIU, 2010; GUPTA e VERMA, 2015). No entanto, as suspensões celulósicas se tornam mais difíceis de serem agitadas em teores de sólidos totais acima de 10-15% e a alta viscosidade gerada prejudica os fenômenos de transferência de massa e calor, principalmente nos estágios iniciais de hidrólise (LYND, 1996). ZHANG *et al.* (2010) verificaram que a energia requerida para a agitação de palha de milho pré-tratada aumentou em uma ordem de magnitude quando o teor de sólidos totais do meio foi aumentado de 15 para 30% (de 79,5 para 1009,2 MJ t<sup>-1</sup> de suspensão celulósica, respectivamente).

Diante do exposto, é possível afirmar que os principais desafios para o desenvolvimento da produção de etanol celulósico estão associados às etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática. Por esta razão, o presente trabalho visa ampliar o entendimento sobre fatores que afetam o desempenho de métodos de pré-tratamento de matérias-primas relevantes no cenário nacional, como o bagaço de cana e os resíduos do processamento do algodão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

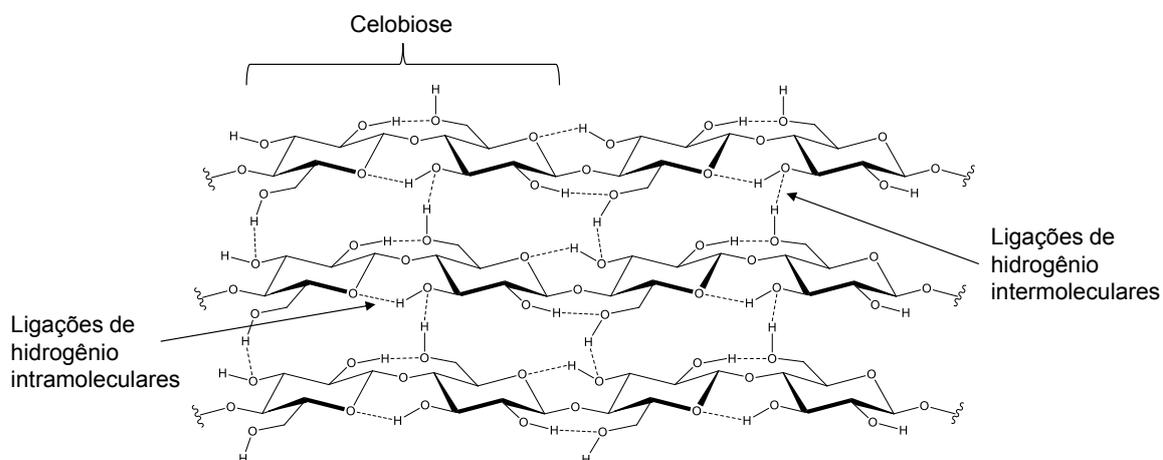
### 2.1 ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal e são classificados em quatro grupos que incluem os resíduos agroflorestais, urbanos, da indústria de papel e de culturas agroenergéticas. Esses materiais são constituídos principalmente por polissacarídeos, como a celulose e as hemiceluloses, compostos poliaromáticos como a lignina, componentes minoritários de baixa massa molar (extrativos), proteínas e compostos inorgânicos (cinzas) (CANILHA *et al.*, 2010).

A celulose é o componente mais abundante da parede celular vegetal e é formada por unidades de  $\beta$ -D-glucose ( $\beta$ -D-glucopiranosose) unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo (1 $\rightarrow$ 4). A unidade fundamental ou repetitiva da estrutura da celulose é o dissacarídeo celobiose (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-D-glucopiranosose) que, devido à orientação equatorial da hidroxila anomérica e sua ligação com a posição 4 da unidade adjacente, faz com que as cadeias assumam uma disposição linear. Além disso, a orientação equatorial dos grupos hidroxílicos remanescentes da D-glucopiranosose possibilita a formação de uma rede de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares que promovem a agregação das cadeias celulósicas em fibrilas elementares termodinamicamente estáveis e com alto grau de cristalinidade (Figura 1). Esses agregados para-cristalinos conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes e explicam, pelo menos em parte, a sua baixa suscetibilidade à hidrólise (DING e HIMMEL, 2006). No entanto, algumas regiões da estrutura da celulose podem apresentar menor organização supramolecular ou maior caráter amorfo que, por consequência, são mais acessíveis às reações de hidrólise (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005). O tamanho da cadeia de celulose é normalmente dado em termos do seu grau de polimerização (GP), isto é, o número de resíduos D-glucopiranosil (anidrogucose) presentes em uma única cadeia, que pode variar de 300 na celulose microcristalina a mais de 10000 em fibras naturais de ocorrência natural e celulose bacteriana (FENGEL e WEGENER, 1989).

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos que podem ser compostos por diferentes tipos de pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-galactose, D-manose) e, em alguns casos, por grupos acetila e ácidos urônicos (ácidos glucurônico e 4-O-metil-glucurônico). A estabilidade térmica e química das hemiceluloses é menor quando comparada à celulose, possivelmente devido ao seu menor grau de polimerização e menor cristalinidade, ocasionados pela presença de diversas ramificações que se dispõem ao longo da cadeia principal (RAMOS, 2003). Esses polissacarídeos estão presentes na parede celular da biomassa em conexão direta com a

celulose via ligações de hidrogênio e com a lignina via ligações covalentes entre resíduos da cadeia lateral e ácidos cinâmicos, formando complexos lignina-carboidrato (CLC).

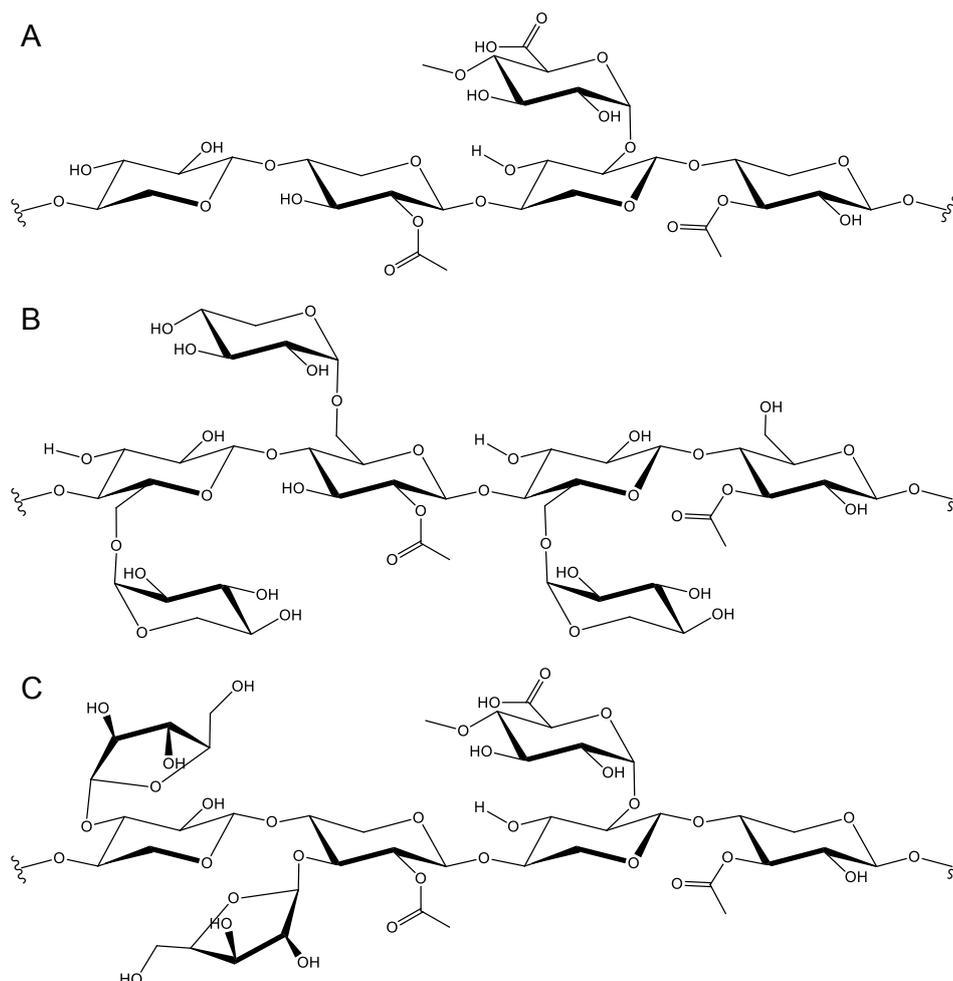


**Figura 1.** Representação da rede de ligações de hidrogênio entre cadeias lineares da celulose, evidenciando as várias unidades consecutivas de celobiose.

A composição das hemiceluloses varia conforme a matriz lignocelulósica, nas madeiras de coníferas (madeiras moles, do inglês *softwoods*), os principais constituintes são as galactoglucomananas e arabinoglucuronoxilanas, enquanto que, nas madeiras de folhosas (madeiras duras, do inglês *hardwoods*), os principais são as 4-O-metilglucuronoxilanas e as glucomananas. As gramíneas (como por exemplo, a cana-de-açúcar) apresentam 4-O-metilglucuronoarabinoxilanas e xiloglucanas como principais constituintes hemicelulósicos (WILLFÖR *et al.*, 2005). Alguns exemplos de fragmentos de cadeias hemicelulósicas estão representados na Figura 2.

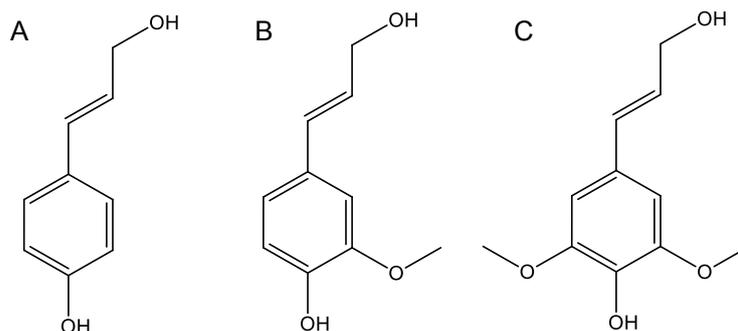
Outros polissacarídeos são encontrados na parede celular vegetal em menor quantidade, tais como as pectinas. Esses materiais são normalmente formados a partir de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) e  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), originando um polissacarídeo complexo e de alta massa molecular que atua como agente cimentante na parede celular e contribui assim para sua alta coesividade e resistência mecânica (CAMPBELL *et al.*, 1979). As pectinas apresentam alta solubilidade em água e por isso são facilmente extraídas com água quente (HARRIS e STONE, 2008).

A biomassa também contém compostos orgânicos minoritários de baixa massa molar, denominados extraíveis, que podem ser facilmente removidos da estrutura lignocelulósica pela solubilização em solventes orgânicos como o etanol (FENGEL e WEGENER, 1989). As principais estruturas encontradas na maioria dos materiais lignocelulósicos são terpenos, lignanas, estilbenos, hidrocarbonetos, flavonoides, ceras, álcoois e ácidos graxos e compostos fenólicos (FENGEL e WEGENER, 1989).



**Figura 2.** Fragmentos estruturais de alguns tipos de hemiceluloses: (A) 4-O-metilglucuronoxilana, (B) xiloglucana e (C) 4-O-metil-glucuronoarabinoxilana (adaptado de EBRINGEROVA *et al.*, 2005 e SILVEIRA *et al.*, 2014).

A lignina constitui a fração não-polissacarídica mais abundante da lignocelulose e é formada pela polimerização radicalar de três precursores monoméricos, os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. Esses compostos são comumente chamados de álcoois cinâmicos e suas estruturas químicas são representadas na Figura 3 (LIN e DENCE, 1992). Assim como nas hemiceluloses, a composição da lignina é característica da espécie e pode ser influenciada pelo ambiente em que a planta se desenvolve. No caso de madeiras moles, a lignina é basicamente derivada do álcool coniferílico, enquanto que para madeiras duras, sua composição é majoritariamente formada pelos álcoois coniferílico e sinapílico. Nas gramíneas, além desses dois álcoois cinâmicos, existem, ainda que em menor quantidade, unidades aromáticas não metoxiladas derivadas do álcool *p*-cumarílico (RAMOS, 2003).



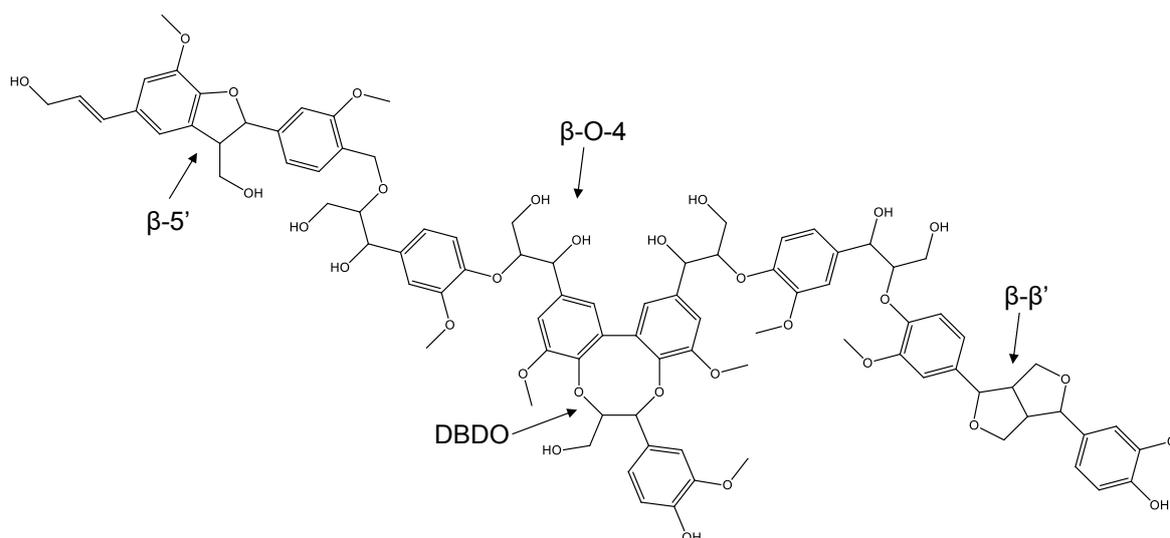
**Figura 3.** Estruturas químicas dos álcoois (A) *p*-cumarílico, (B) coniferílico e (C) sinapílico.

No contexto das biorrefinarias, a lignina pode ser considerada a fonte natural de maior importância e de menor custo para a produção de compostos aromáticos para a indústria, como benzeno, tolueno, xileno, fenol e derivados de ácidos cinâmicos como a vanilina (HOLLADAY *et al.*, 2007; LAURICHESSE e AVEROUS, 2014). No entanto, a heterogeneidade da sua estrutura oferece desafios ao desenvolvimento de processos economicamente viáveis para o seu aproveitamento.

A biossíntese da lignina consiste da desidrogenação enzimática dos álcoois precursores, gerando radicais passíveis de deslocalização eletrônica. Estes híbridos de ressonância acoplam-se entre si levando à formação de um polímero tridimensional cujas unidades monoméricas não se repetem de forma regular e que contém uma grande variedade de ligações químicas (LAURICHESSE e AVEROUS, 2014). O tipo de ligação mais abundante entre os álcoois precursores na lignina é a  $\beta$ -O-4, que envolve a ligação éter entre as cadeias alifáticas e os anéis aromáticos. Outros tipos de ligações representativas são as que envolvem cadeias alifáticas C3 ( $\beta$ - $\beta'$ ), cadeias alifáticas e anéis aromáticos ( $\beta$ -5') e carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações 4-O-5' e dibenzodioxocina (DBDO). Diante dessas diferentes formas de acoplamento, a lignina é considerada um material heterogêneo e de natureza amorfa, cuja estrutura pode ser representada por modelos como o mostrado na Figura 4 (BRUNOW e LUNDQUIST, 2010).

Componentes de baixa massa molecular denominados extraíveis também são encontrados em quantidades variáveis no tecido vegetal. Esses compostos estão envolvidos em várias atividades metabólicas da planta, como defesa contra organismos invasores e na síntese de macromoléculas de função estrutural e de reserva. Em geral, os extraíveis podem conter terpenos, lignanas, estilbenos, flavonoides, ácidos fenólicos, gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteroides e hidrocarbonetos, que podem ser parcialmente removidos em solventes orgânicos ou em água (por contato ou por arraste de vapor). Os extraíveis são os responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro e sabor (D'ALMEIDA, 1988). Embora sejam minoritários na composição química da biomassa, a diversidade dessa fração pode ser importante em biorrefinarias

por derivar do processamento de grandes quantidades de materiais lignocelulósicos, mesmo porque suas propriedades estão normalmente associadas à aplicações importantes e de alto valor agregado nas áreas médica, cosmética e farmacêutica. Além desses componentes, o tecido vegetal ainda contém compostos não extraíveis em solventes orgânicos e água, como cinzas (compostos inorgânicos) e proteínas (KLOCK *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Modelo de representação estrutural da lignina evidenciando alguns dos principais tipos de conectividades formadas entre as unidades (adaptado de CRESTINI *et al.* 2011).

## 2.2 PRÉ-TRATAMENTO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A forte interação entre os componentes poliméricos da lignocelulose torna o material altamente recalcitrante e isto representa uma das principais barreiras para a utilização da biomassa dentro do conceito de biorrefinaria. Portanto, um método de pré-tratamento é necessário para amenizar a interação entre os seus principais constituintes estruturais, tornando-os suscetíveis à conversão em biocombustíveis, materiais e insumos para a indústria química (RAMOS, 2003; BALAT, 2011).

Diversos métodos de pré-tratamento têm sido propostos para a fracionamento de materiais lignocelulósicos. Essas técnicas são baseadas em processos físicos, químicos, biológicos ou em suas combinações (ALVIRA *et al.*, 2010). Algumas estratégias relatadas na literatura incluem a hidrólise ácida (GÁMEZ *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2010), reagentes alcalinos (ZHENG *et al.*, 2009; BALI *et al.*, 2015), explosão a vapor (RAMOS, 2003; AUXENFANS *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017), moagem (HIDENO *et al.*, 2009), organosolv (SAAD *et al.*, 2008; MESA *et al.*, 2010), fungos (CAMASSOLA e DILLON, 2009; YU *et al.*, 2009), líquidos iônicos (NGUYEN *et al.*, 2010; DA COSTA LOPES *et al.*, 2017) e CO<sub>2</sub> supercrítico (KIM e HONG, 2001; RELVAS *et al.*, 2015; TOSCAN *et al.*, 2017a).

Idealmente, o pré-tratamento deve proporcionar uma alta recuperação de todos os componentes da biomassa, aumentar a conversão dos polissacarídeos em açúcares solúveis durante a etapa de hidrólise enzimática e evitar o acúmulo de inibidores de fermentação, além de ser realizado em alta concentração de sólidos totais e apresentar um baixo custo energético e operacional (BALAT *et al.*, 2008). Cabe destacar que a escolha de um processo de pré-tratamento deve ser adequada à matéria-prima em questão, em função de sua composição, apresentação e propriedades químicas (CHANDRA *et al.*, 2007).

Pré-tratamentos físicos como moagem ou trituração têm como finalidade aumentar a área superficial e a acessibilidade da celulose à etapa de hidrólise pela diminuição do tamanho das partículas (DA SILVA *et al.*, 2010). Esses processos não envolvem reações de desidratação de carboidratos à compostos furânicos, mas a grande desvantagem é o elevado consumo de energia. Por outro lado, os pré-tratamentos biológicos têm como princípio a utilização de micro-organismos, majoritariamente fungos, capazes de degradar lignina e/ou hemiceluloses para melhorar a acessibilidade da celulose (ALVIRA *et al.*, 2010). A utilização de fungos pode ser considerada de baixo custo se comparada a outros tipos de pré-tratamento (SUN e CHENG, 2002), porém, é um processo lento que dificulta sua aplicação em escala industrial, podendo ser considerado efetivo apenas quando realizado em conjunto com outros métodos físicos e/ou químicos (BALAT, 2011).

Os pré-tratamentos químicos podem remover as hemiceluloses e a lignina do material, de modo a tornar a celulose mais disponível para a reação subsequente de hidrólise. O emprego de métodos químicos de caráter básico apresenta vantagens em comparação aos de natureza ácida, principalmente devido a sua seletividade na remoção da lignina, o que permite a recuperação da celulose e das hemiceluloses em altos níveis, além da possibilidade de ser realizado sob temperaturas reacionais menores (CARVALHEIRO *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2009). Os principais reagentes para esse tipo de pré-tratamento são os hidróxidos de sódio, de potássio, de cálcio e de amônio. Entre eles, o hidróxido de sódio têm recebido grande atenção devido ao seu grande poder de deslignificação e de diminuição da cristalinidade do material celulósico, causando aumentos expressivos na sua porosidade e área superficial de contato (KLOCK *et al.*, 2005; BALAT *et al.*, 2008). JANU *et al.* (2011) observaram uma redução de 82% no teor de lignina do bagaço de cana após o pré-tratamento com solução diluída de hidróxido de sódio (3%, m v<sup>-1</sup>) por 60 min a 121 °C. Através de análises por microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X, os mesmos autores verificaram que o material pré-tratado mostrou um aumento na porosidade e área superficial em comparação com o bagaço nativo. Além disso, cerca de 94% de celulose e hemiceluloses foram convertidos em açúcares solúveis por hidrólise enzimática em condições otimizadas (13,5% de sólidos totais, 52 FPU g<sup>-1</sup> de

substrato e 0,18% do surfactante Tween 80 por 60 h de reação). BALI *et al.* (2015) demonstraram o efeito de diferentes pré-tratamentos alcalinos (hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio e solução de amônia) sobre as características estruturais e acessibilidade à hidrólise enzimática de cavacos de álamo. O pré-tratamento com hidróxido de sódio (2%, m v<sup>-1</sup>) a 125 °C se mostrou o mais eficiente entre os métodos empregados, sendo que 2 min de reação resultou em 8% de diminuição no grau de polimerização (GP) da celulose, enquanto que para o tempo de residência de 10 e 60 min, tais reduções foram de 61 e 76%, respectivamente. O índice de cristalinidade (ICr), determinado por ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C em estado sólido, diminuiu em relação à celulose presente no material nativo em todos os casos. Tais diminuições foram de 5-7% para o hidróxido de sódio, 7-9% para hidróxido de cálcio e 5-9% para solução de amônia, o que pode ter sido fruto dos diferentes graus de deslignificação atingidos em cada condição. As amostras pré-tratadas também foram avaliadas quanto à hidrólise enzimática empregando 1% de sólidos totais e 20 FPU g<sup>-1</sup> de substrato seco por 72 h de reação. O pré-tratamento com hidróxido de sódio resultou nos melhores rendimentos, com um aumento de 3 a 4 vezes na rendimento de glucose em comparação ao material nativo.

Recentemente, os pré-tratamentos com líquidos iônicos (LIs) têm recebido crescente interesse como solventes promissores para a desconstrução da biomassa em seus principais constituintes (ZAKRZEWSKA *et al.*, 2010; DA COSTA LOPES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2015). Os LIs são sais orgânicos líquidos em temperaturas inferiores a 100 °C e apresentam propriedades diferentes dos solventes orgânicos comuns, como alta estabilidade química e térmica, baixa inflamabilidade e pressão de vapor insignificante. Como resultado dessas propriedades, os LIs não formam gases tóxicos e co-produtos indesejáveis (ZHU *et al.*, 2006). A estrutura química dos LIs são formadas por um cátion orgânico e um ânion orgânico ou inorgânico. Os tipos mais comuns de LIs contêm cátions derivados de alquilimidazóis, alquilpiridínios e tetra-alquilamônios contendo ânions como acetato, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, metanossulfonatos e haletos (TADESSE e LUQUE, 2011). Apesar de vários estudos demonstrarem a eficiência dos LIs no fracionamento da biomassa, os custos associados com a síntese e purificação tornam improvável a sua utilização em biorrefinarias. Portanto, outros solventes têm sido investigados para serem aplicados em escala industrial com custos competitivos. Um solvente alternativo que atende a essas premissas é o imidazol. Esse reagente é largamente utilizado na síntese de LIs baseados no cátion imidazólio e também na dissolução do amido (JORDAN *et al.*, 2014). O imidazol é caracterizado pelo seu caráter alcalino, baixa toxicidade, alto ponto de ebulição, pressão de vapor negligenciável, fácil manuseio e reciclabilidade. Recentemente, MORAIS *et al.* (2016) relataram, pela primeira vez, a utilização de imidazol como solvente para o fracionamento de palha de trigo, obtendo

cerca de 92% de remoção da lignina na condição de 170 °C por 2 h em uma razão biomassa/imidazol de 1:9. A eficiência do pré-tratamento foi avaliada por hidrólise enzimática, que resultou em 99,3% de conversão das glucanas em glucose após 72 h. TOSCAN *et al.* (2017b) utilizaram a mesma técnica para o pré-tratamento do capim-elefante e alcançaram extrações de 82% da lignina presente no material nativo na condição otimizada (135,6 °C por 308,4 min), que foi obtida por meio de um planejamento fatorial. Esse material pré-tratado, quando submetido a hidrólise enzimática, resultou em 80,5% de rendimento de glucose após 72 h de reação.

Além dos métodos químicos de caráter básico, a hidrólise ácida se destaca como um dos métodos mais estudados no processamento de vários materiais lignocelulósicos (CARA *et al.*, 2008; HSU *et al.*, 2010). Nesse tipo de pré-tratamento, ácidos concentrados ou diluídos são empregados para hidrolisar grande parte das hemiceluloses e aumentar a acessibilidade da celulose. O processamento com ácidos concentrados acarreta em alto custo operacional devido à necessidade de uma etapa adicional de neutralização dos efluentes, bem como à corrosão dos equipamentos (WYMAN, 1996). Portanto, a utilização de ácidos diluídos torna-se a melhor escolha para essa linha de trabalho. Diferentes ácidos podem ser aplicados em solução diluída para esse fim, como os ácidos clorídrico (ELSHAFEI *et al.*, 1991) e fosfórico (GEDDES *et al.*, 2010), porém, o ácido sulfúrico é o sistema mais estudado. SAHA *et al.* (2005) relataram 74% de rendimento de açúcares solúveis em relação ao conteúdo total de carboidratos presentes na palha de trigo após um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (0,75%, v v<sup>-1</sup>) a 121°C por 1 h. CARA *et al.* (2008) observaram 76,5% de rendimento na hidrólise enzimática com a biomassa de oliveira pré-tratada com ácido sulfúrico a 210 °C por 10 min.

Embora o pré-tratamento com ácido diluído seja eficiente para hidrolisar grande parte das hemiceluloses, seu custo é normalmente mais elevado que outros processos como a explosão a vapor (JACQUET *et al.*, 2015). FAN *et al.* (2014) compararam três diferentes abordagens de pré-tratamento ácido da espiga de milho, como a explosão a vapor catalisada por ácido sulfúrico, a explosão a vapor com o material impregnado com água (auto-hidrólise) e o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (2%, m v<sup>-1</sup>) sem a etapa de explosão. Esses autores obtiveram maior rendimento de glucose (85,3%) para o material pré-tratado por explosão a vapor catalisado pelo ácido sulfúrico, que foi cerca de 1,2 vezes mais eficiente que o pré-tratamento de explosão a vapor na condição de auto-hidrólise e cerca de 1,6 vezes melhor que o método com ácido sulfúrico diluído.

A explosão a vapor é um dos métodos de pré-tratamento mais empregados para o fracionamento dos componentes macromoleculares da biomassa (CHEN *et al.*, 2013). Nesse tipo de pré-tratamento, a biomassa é tratada com vapor saturado em um reator fechado por um determinado tempo e, em seguida, o sistema é subitamente expandido à

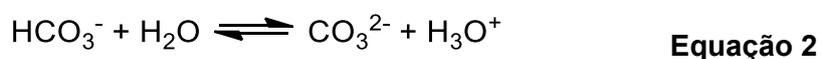
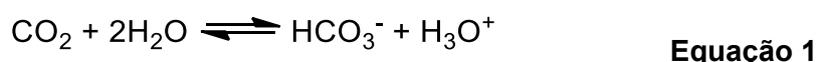
pressão atmosférica (explosão). No momento da descompressão, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e em parte quebradas, aumentando a área superficial de contato e diminuindo a resistência da parede celular à hidrólise enzimática. Com o intuito de diminuir a temperatura e o tempo de residência da biomassa no reator, catalisadores auxiliares podem ser adicionados ao meio, como os ácidos sulfúrico ou fosfórico diluídos, por exemplo (CHEN *et al.*, 2011; PITARELO *et al.*, 2016).

Quando o pré-tratamento de explosão a vapor é realizado sem a adição de um catalisador exógeno, o processo é denominado de auto-hidrólise porque o ácido acético, liberado por hidrólise dos grupos acetilas das hemiceluloses, catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato, provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses que passam a ser facilmente removidas por extração aquosa. Cabe destacar que esse pré-tratamento promove a hidrólise de todos os componentes da biomassa, mas as hemiceluloses são as mais susceptíveis a este tipo de reação (ROCHA *et al.*, 2012). Inúmeros produtos são identificados na fração solúvel em água após o pré-tratamento por explosão a vapor, que incluem oligômeros de alta e baixa massa molar (xilo- e celo-oligômeros), monossacarídeos (arabinose, xilose e glucose) e produtos de degradação de carboidratos (furfural, 5-(hidroximetil)-furfural (HMF) e os ácidos fórmico e levulínico) e da lignina (ácidos fenólicos e subestruturas de baixa massa molar). Naturalmente, a liberação de outros ácidos orgânicos no meio de reação acelera o processo de hidrólise a ponto de poder superar o efeito do ácido acético sob condições mais drásticas de pré-tratamento.

Vários estudos vêm sendo realizados para otimizar o pré-tratamento por explosão a vapor por ajustes na temperatura, no tempo de residência do material no reator, no teor de umidade da biomassa e nas propriedades e concentração do catalisador empregado. O aumento de cada um desses parâmetros acarreta no aumento da severidade do pré-tratamento e favorece as reações de hidrólise da celulose e das hemiceluloses. Além disso, pentoses e hexoses liberadas no meio reacional podem ser desidratadas a furfural e HMF, respectivamente (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Cabe destacar que quando o pré-tratamento é muito drástico, os açúcares liberados são parcialmente degradados a inibidores enzimáticos e de fermentação, enquanto que, quando for muito brando, resultará em materiais de baixa acessibilidade à hidrólise enzimática (CARDONA *et al.*, 2010). Portanto, as condições específicas de explosão a vapor devem ser definidas para cada tipo de biomassa, uma vez que diferentes materiais podem apresentar diferentes níveis de recalcitrância e composição química (RAMOS, 2003). Por exemplo, WOOD *et al.* (2016) observaram que a condição de 210 °C por 10 min resultou nos melhores rendimentos de açúcares para a palha de arroz, enquanto que OLIVEIRA *et al.* (2013) obtiveram o maior rendimento de explosão a vapor para a palha de cana na condição de 200 °C por 15 min.

Além dos métodos de pré-tratamento relatados, também cabe destacar a utilização de fluidos supercríticos para o fracionamento da biomassa (MORAIS *et al.*, 2015). Um fluido supercrítico é uma substância que está acima das suas condições críticas (temperatura e pressão), exibindo, portanto, as propriedades dos líquidos (como densidade) e dos gases (como compressibilidade) simultaneamente (SERNA *et al.*, 2016). Exemplos de fluidos que são aplicados no estado supercrítico para promover o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos incluem água, amônia e dióxido de carbono (ZHENG *et al.*, 1998; GIRIO *et al.*, 2010; KING *et al.*, 2012). No entanto, a tecnologia que utiliza dióxido de carbono supercrítico (scCO<sub>2</sub>) apresenta inúmeras vantagens devido a suas menores temperatura e pressão críticas (31,0 °C e 73,8 bar) quando comparada com água (374,2 °C e 221,2 bar) e amônia (132,3 °C e 112,8 bar). Assim, a energia requerida para alcançar o estado crítico no caso do CO<sub>2</sub> é muito menor (GAO *et al.*, 2010; GU *et al.*, 2013).

O uso do scCO<sub>2</sub> para o pré-tratamento da biomassa apresenta alguns aspectos atrativos como baixa toxicidade, inflamabilidade e custo. Além disso, o material pré-tratado não apresenta resíduos do solvente, uma vez que o CO<sub>2</sub> é gasoso em condições atmosféricas e pode ser facilmente recuperado e completamente removido do material na etapa de despressurização do sistema (ZHENG *et al.*, 1998; KIM e HONG, 2001; GAO *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2014). As vantagens do uso do scCO<sub>2</sub> ainda incluem baixa viscosidade (3 a 7 x 10<sup>-5</sup> N s m<sup>-2</sup>) e nenhuma tensão superficial, o que fornece alta difusividade, de modo que o CO<sub>2</sub> pode penetrar e difundir rapidamente na estrutura da parede celular de materiais lignocelulósicos (ZHENG *et al.*, 1998). Em contato com a água, o CO<sub>2</sub> produz ácido carbônico *in situ*, no entanto, esse ácido se dissocia rapidamente para formar os íons bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), de acordo com as seguintes equações de formação (Equações 1 e 2) (SCHACHT *et al.*, 2008).



Quando comparado ao ácido sulfúrico, que é comumente utilizado em processos de pré-tratamento, o ácido carbônico não apresenta a mesma capacidade hidrolítica, mas, mesmo assim, exibe efeito catalítico na hidrólise das hemiceluloses, resultando em substratos de melhor desempenho na etapa de hidrólise enzimática (GAO *et al.*, 2010; NARAYANASWAMY *et al.*, 2011). O CO<sub>2</sub> também apresenta um efeito físico durante o pré-tratamento devido a sua alta difusividade em condições supercríticas, que promove um inchamento do material (do inglês *swelling*) com efeitos sobre a sua volumetria de poros e área superficial de contato (STAMENIC *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2014). Ademais, ao final da

reação com scCO<sub>2</sub>, o CO<sub>2</sub> também pode atuar como um agente destoxicante, ajudando a remover produtos de degradação mais voláteis (como por exemplo os compostos furânicos) durante a etapa de despressurização do sistema (PERSSON *et al.*, 2002; MAGALHÃES DA SILVA *et al.*, 2014).

Os principais parâmetros que influenciam o pré-tratamento com scCO<sub>2</sub> são o teor de água, a temperatura, a pressão e o tempo de reação (SERNA *et al.*, 2016). A presença de água na reação não impede que o CO<sub>2</sub> atinja o estado crítico (LIU *et al.*, 2014) e é essencial para a formação do ácido carbônico *in situ*, que irá promover a hidrólise parcial das hemiceluloses (GAO *et al.*, 2010; YIN *et al.*, 2014). Assim como para processos hidrotérmicos, baixas temperaturas durante o pré-tratamento resultam em poucos benefícios na hidrólise enzimática. NARAYANASWAMY *et al.* (2011) utilizaram temperaturas de 80, 120 e 150 °C para o pré-tratamento de palha de milho e observaram efeitos benéficos sobre a hidrólise enzimática somente em temperaturas superiores, o que é provavelmente devido à menor difusividade do CO<sub>2</sub> em temperaturas mais baixas (80 °C). MORAIS *et al.* (2014) mostraram claramente que temperaturas mais altas foram mais eficientes para o pré-tratamento com scCO<sub>2</sub> da palha de trigo. Por exemplo, o aumento da temperatura do pré-tratamento de 130 °C para 215 °C resultou em mais de 50% de aumento no rendimento de glucose por hidrólise enzimática (de 39,9 para 63,9%). Assim, pressões mais altas resultam em uma penetração mais rápida e profunda do CO<sub>2</sub> na estrutura da biomassa. ALINIA *et al.* (2010), NARAYANASWAMY *et al.* (2011) e MORAIS *et al.* (2014) obtiveram aumentos expressivos nos rendimentos de glucose pelo aumento da pressão de CO<sub>2</sub> no meio reacional.

O CO<sub>2</sub> pode também ser aplicado como agente de impregnação do material anteriormente ao processo de explosão a vapor. Alguns estudos demonstraram que a união dos dois procedimentos pode resultar em melhorias na etapa de hidrólise enzimática do material pré-tratado. MOHARRERI *et al.* (2017) verificaram que a contribuição da rápida descompressão (explosão) no pré-tratamento com CO<sub>2</sub> do bagaço de guayule foi de 15% de aumento no total de açúcares liberados por hidrólise enzimática, quando comparado ao pré-tratamento realizado sem o alívio rápido da pressão. Além disso, FERREIRA-LEITAO *et al.* (2010) observaram que a adição de CO<sub>2</sub> no pré-tratamento de explosão a vapor do bagaço de cana gerou aumentos nos rendimentos de açúcares solúveis após a hidrólise enzimática do material pré-tratado. Por exemplo, a condição de 190 °C por 5 min sem a adição do CO<sub>2</sub> apresentou rendimentos de 44% de glucose e 48% de xilose, enquanto que a mesma condição reacional com a adição do CO<sub>2</sub> aumentou esses rendimentos para 50 e 69%, respectivamente.

### 2.2.1 Fator de severidade

Existe uma quantidade expressiva de trabalhos envolvendo o pré-tratamento por explosão a vapor de materiais lignocelulósicos, o que muitas vezes torna difícil a comparação entre eles. De modo a combinar e normalizar os parâmetros desse método de pré-tratamento e assim facilitar as comparações, OVEREND *et al.* (1987) desenvolveram uma equação empírica que também pode ser aplicada a outros tipos de pré-tratamentos hidrotérmicos, como os que utilizam somente vapor ou água líquida em temperaturas elevadas (do inglês, *liquid hot water - LHW*). O cálculo da ordenada da reação,  $R_o$  (do inglês, *reaction ordinate*), engloba o tempo e a temperatura que são utilizados no processo, bem como o tempo necessário para se atingir a temperatura proposta, conforme mostra a Equação 3.

$$R_o = \int_0^t e^{\frac{T_r - T_f}{14,75}} dt \quad \text{Equação 3}$$

em que  $t$  é o tempo de residência (min),  $T_r$  é a temperatura da reação ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $T_f$  é a temperatura de referência (comumente  $100^{\circ}\text{C}$ , pois assume-se que em reações hidrotérmicas a hidrólise ocorra apenas acima dessa temperatura) e 14,75 é a energia de ativação convencional considerando que o processo hidrolítico é de primeira ordem. O logaritmo da ordenada da reação ( $\log R_o$ ) é definido como o fator de severidade do pré-tratamento. Cabe destacar que quando o volume reacional do reator é pequeno e a temperatura proposta é atingida rapidamente, o cálculo da ordenada de reação pode ser reduzido para:

$$R_o = t \times e^{\frac{T_r - T_f}{14,75}} \quad \text{Equação 4}$$

A equação para o cálculo do fator de severidade somente é válida para os pré-tratamentos realizados por auto-hidrólise, uma vez que apenas leva em consideração o tempo e temperatura da reação. Portanto, essa equação não inclui a contribuição dos ácidos adicionados ao meio ou formados a partir da composição química e degradação da biomassa (ácidos acético, fórmico e levulínico, por exemplo). Assim, quanto maior for a acidez do meio reacional, maior será a extensão das reações de hidrólise e desidratação dos carboidratos e de modificação química da lignina. Para resolver esta limitação, CHUM *et al.* (1990) propuseram o cálculo do fator de severidade combinada (FSC), cuja definição se encontra na Equação 5. Geralmente, o valor de pH é determinado na fração solúvel em água que deriva do processo de pré-tratamento.

$$FSC = \log R_o - pH$$

**Equação 5**

Dessa forma, torna-se possível comparar pré-tratamentos realizados na ausência e na presença de diferentes catalisadores exógenos, assim como levar em consideração a contribuição dos ácidos formados durante a reação. Em princípio, essa equação também pode ser aplicada ao pré-tratamento com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, uma vez que as principais variáveis do sistema são a temperatura, o tempo reacional e a pressão de CO<sub>2</sub> (que está relacionada à formação do ácido carbônico *in situ*). No entanto, nesse caso, o pH medido ao final da reação não representa totalmente a concentração de íons H<sup>+</sup> presentes durante a reação, pois, quando o sistema é despressurizado, o equilíbrio de formação do ácido carbônico retorna para o CO<sub>2</sub> gasoso. Além disso, a determinação do pH durante a reação é tecnicamente impossível devido ao emprego de temperatura e pressão muito altas. Para superar essa limitação, VAN WALSUM (2001) propuseram uma equação empírica para estimar o valor do pH no sistema binário CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, considerando o efeito da temperatura, pressão parcial do CO<sub>2</sub>, assim como a solubilidade do CO<sub>2</sub> e do ácido carbônico em água (Equação 6).

$$pH = (8,00 \times 10^{-6}) \times T^2 + 0,00209 \times T - 0,216 \times \ln(pCO_2) + 3,92 \quad \text{Equação 6}$$

onde T é a temperatura em °C e pCO<sub>2</sub> é a pressão parcial do CO<sub>2</sub> em atmosferas (atm). Para a estimativa da pCO<sub>2</sub> se faz necessário conhecer a densidade do CO<sub>2</sub> na temperatura e pressão inicial de cada experimento, bem como a solubidade do CO<sub>2</sub> em água na temperatura proposta para o pré-tratamento (DUAN e SUN, 2003; DUAN *et al.*, 2006). Portanto, baseado no valor do pH teórico é possível substituir o valor de pH da Equação 5 e assim obter o fator de severidade da reação com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, que passa a ser denominado de FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub>.

A equação para determinação do FSC foi desenvolvida para sistemas ácidos, entretanto, alguns estudos adaptaram essa equação para sistemas alcalinos, como no caso do pré-tratamento do caule do algodão com hidróxido de sódio (SILVERSTEIN *et al.* (2007). O FSC proposto por esses autores é apresentado na Equacao 7.

$$R_o = t \times C^n \times e^{\frac{T_f - T_i}{14,75}} \quad \text{Equação 7}$$

em que o novo termo adicionado (C) é referente à concentração do hidróxido de sódio (% em massa) e n é uma constante arbitrária, definida como igual a 3,90. A aplicabilidade da dessa equação para explicar os efeitos obtidos de deslignificação foi então verificada e o gráfico de valores preditos *versus* valores experimentais resultou em R<sup>2</sup> de apenas 0,72, o

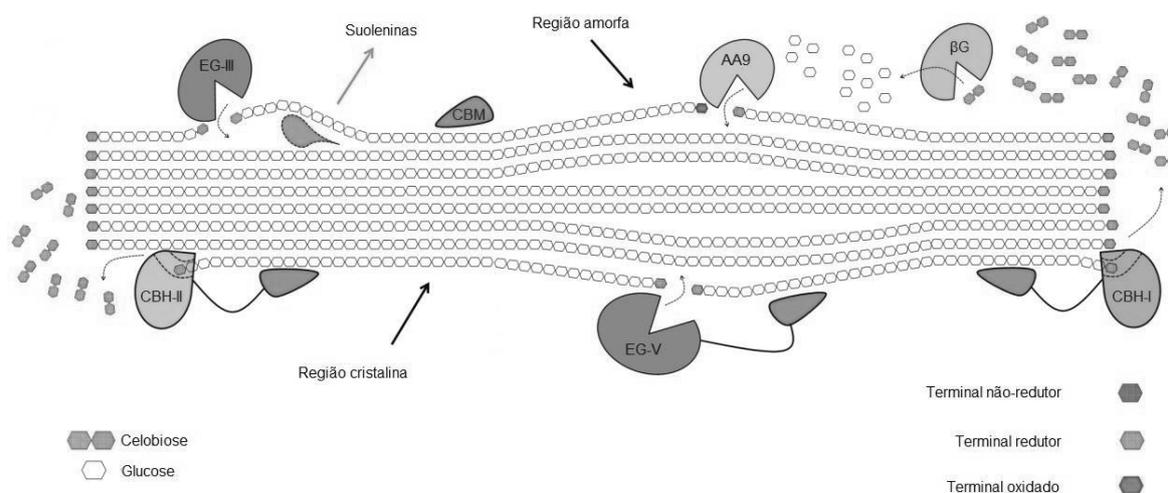
que foi relacionado à heterogeneidade do material utilizado ou à incapacidade do FSC adaptado em explicar o fenômeno devido à ausência de outras variáveis que possam interferir no processo de deslignificação, como a carga de sólidos totais empregada no processo. GARCÍA-TORREIRO *et al.* (2016) utilizaram essa adaptação do FSC para correlacionar o pré-tratamento com hidróxido de sódio da palha de trigo com a respectiva liberação de açúcares fermentescíveis após a hidrólise enzimática. Para o FSC entre 2 e 6, o total de açúcares liberados no meio reacional (considerando pré-tratamento e hidrólise enzimática) aumentou linearmente ( $R^2 = 0,96$ ), enquanto que esse se manteve constante para valores menores de 2 sofreu uma ligeira diminuição para valores acima de 6 (condições mais severas).

### 2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A etapa de hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses visa a obtenção de açúcares passíveis de fermentação. Especificamente para a celulose, a hidrólise enzimática é atribuída principalmente à ação de três classes de hidrolases: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases (WILSON, 2011). Como pode ser observado na Figura 5, as endoglucanases (EG, EC 3.2.1.4) iniciam a hidrólise da celulose através da clivagem das ligações glicosídicas, principalmente nas regiões menos cristalinas da celulose, diminuindo o comprimento das cadeias e gerando novos terminais redutores e não redutores no meio. Assim, essas enzimas são responsáveis pela redução do grau de polimerização da celulose. O modo de ação das endoglucanases é atribuído ao seu sítio catalítico, cuja forma em fenda permite a ação enzimática em qualquer ponto ao longo da cadeia (TEERI, 1997). As exoglucanases, majoritariamente representadas pelas celobioidrolases (CBH, EC 3.2.1.91 e EC 3.2.1.176), apresentam um sítio catalítico na forma de túnel e agem de maneira processiva a partir das extremidades redutoras (por meio da CBH do tipo I) e não redutoras (por meio da CBH do tipo II) da cadeia, liberando principalmente celobiose. Para apresentarem atividade catalítica, as exoglucanases necessitam que a cadeia de celulose penetre no túnel catalítico, o que força o seu descolamento da superfície e promove a solubilização gradual do substrato, com efeito relativamente pequeno sobre o grau de polimerização devido à ação processiva dessas exoglucanases (ZHANG *et al.*, 2006). Por sua vez, as  $\beta$ -glucosidases ( $\beta$ G, EC 3.2.1.21) atuam sobre celobiose e outros oligômeros de baixa massa molar, hidrolisando-os à glucose (ERIKSSON *et al.*, 2002). O sinergismo das hidrolases faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente, quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas. Enquanto que as endoglucanases aumentam a disponibilidade de pontos de ação para as exoglucanases dos tipos I e II, as  $\beta$ -glucosidases diminuem a inibição das exoglucanases pelo consumo da celobiose liberada no meio

reacional (LASER *et al.*, 2002). No entanto, o acúmulo de glucose como principal produto de reação inibe gradualmente as  $\beta$ -glucosidases, promovendo o acúmulo de celobiose e motivando os efeitos inibitórios secundários mencionados acima.

Durante a hidrólise enzimática ocorrem basicamente os seguintes fenômenos: adsorção das celulasas aos sítios disponíveis no substrato, formação de um complexo ativo enzima-substrato, hidrólise de uma ou mais ligações glicosídicas e dessorção do sítio onde as enzimas se encontram. Como resultado da necessidade de adsorção ao substrato, endoglucanases e exoglucanases podem apresentar em suas estruturas um peptídeo não hidrolítico denominado módulo de ligação aos carboidratos (do inglês, *carbohydrate binding module* – *CBM*) (ZHANG e LYND, 2004a; WILSON, 2011). Os CBM apresentam aminoácidos que se dispõem de maneira planar em relação às cadeias de celulose para realizar ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals, tornando mais eficiente o processo de adsorção das enzimas à superfície. Em outras palavras, a função do CBM é a de promover o contato entre o substrato e o sítio catalítico da enzima, de modo a assegurar a orientação correta desse em relação ao primeiro (NOTENBOOM *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Ilustração do modo de ação das enzimas envolvidas na hidrólise da celulose. CBH: celobioidrolases, EG: endoglucanases,  $\beta$ G:  $\beta$ -glucosidases, CBM: módulo de ligação aos carboidratos e AA9: enzimas auxiliares da família 9 (adaptado de SILVEIRA *et al.* 2014).

Atualmente, preparações enzimáticas comerciais utilizadas na hidrólise da celulose, como a Cellic CTec3 da Novozymes (Dinamarca), apresentam, além das três classes de hidrolases já citadas, outras proteínas não hidrolíticas que possuem um papel fundamental na obtenção de altos níveis de hidrólise. Dentre elas estão as suoleninas e as enzimas auxiliares da família 9 (do inglês, *Auxiliary Activity Family 9* - AA9). As suoleninas geram amorfogênese na superfície da celulose pela perturbação das ligações de hidrogênio

intercadeia, o que leva a um aumento da área disponível para a ação de enzimas como as endoglucanases (CHEN *et al.*, 2010). Já as enzimas auxiliares AA9 atuam via oxidação dos carbonos 1 e 4, sendo que, no primeiro caso, produz-se o ácido glucônico que pode lactonizar à gluconolactona, um forte inibidor de alguns tipos de  $\beta$ -glucosidases. Por atuar na celulose amorfa e em regiões altamente cristalinas onde as endoglucanases não têm atividade, as AA9 podem estabelecer forte sinergismo com exoglucanases (SILVEIRA *et al.*, 2014).

Dependendo do tipo e das condições empregadas durante o pré-tratamento, parte das hemiceluloses pode permanecer no material pré-tratado e prejudicar a hidrólise enzimática da celulose. Assim, a hidrólise eficiente de certos tipos de material pré-tratado requer o emprego de hemicelulases, em adição às celulases, cuja escolha depende da quantificação e caracterização estrutural das hemiceluloses presentes no material (JORGENSEN *et al.*, 2007). Entre as hemicelulases, pode-se destacar as endoxilanases (EC 3.2.1.8) – que hidrolisam ligações glicosídicas internas aleatoriamente na cadeia de xilana, as  $\beta$ -xilosidases (EC 3.2.1.37) – que atacam xilooligossacarídeos a partir dos terminais não redutores da cadeia de xilana liberando xilose, as endomananases (EC 3.2.1.78) – que clivam ligações internas na cadeia de mananas, e as  $\beta$ -manosidases (EC 3.2.1.25) – que clivam manooligossacarídeos em manose. Além disso, existem enzimas que removem substituintes laterais (ramificações), como  $\alpha$ -galactosidases (EC 3.2.1.22),  $\alpha$ -arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72) e feruloil esterases (EC 3.1.1.73) (SHALLOM e SHOHAM, 2003).

### 2.3.1 Fatores que afetam a hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é normalmente caracterizada por uma queda gradual da velocidade da reação ao longo do tempo. Vários fatores podem explicar esse comportamento, sendo estes comumente divididos em dois grandes grupos: os associados à estrutura do substrato e os relativos ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico (SUN e CHENG, 2002).

Os fatores associados ao substrato estão relacionados com alterações em sua porosidade, área superficial de contato, composição e distribuição das hemiceluloses e da lignina, além de mudanças no grau de polimerização e na cristalinidade da celulose. Tais características estão intrinsecamente associadas ao tipo de pré-tratamento utilizado, de modo que a celulose pode apresentar regiões com distintas suscetibilidades à hidrólise. Esse último fator sugere que regiões mais suscetíveis são hidrolisadas rapidamente nas primeiras horas de reação, enquanto que regiões menos suscetíveis demandam maiores tempos de reação (SATTLER *et al.*, 1989; VÄLJAMÄE *et al.*, 2003).

Em sua estrutura supramolecular, a celulose apresenta regiões altamente ordenadas, estabilizadas por numerosas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, além de áreas menos ordenadas ou amorfas nas quais as cadeias apresentam uma orientação randomizada (FONTANA *et al.*, 2004). Vários autores têm sugerido que a celulose amorfa, devido a sua maior área superficial e porosidade, é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. ZHANG e LYND (2004b) relataram que as taxas de hidrólise enzimática da celulose são muito mais rápidas para celulose amorfa do que para celulose cristalina. Por essa razão, o grau de cristalinidade é considerado um dos principais fatores que explicam a aparente recalcitrância dos materiais lignocelulósicos à bioconversão (PURI, 1984; RIVERS e EMERT, 1988; CHANG e HOLTZAPPLE, 2000). YOSHIDA *et al.* (2008) observaram um aumento na hidrólise enzimática de *Miscanthus sinensis* com a diminuição da cristalinidade, indicando também que a hidrólise da celulose amorfa é mais rápida que a celulose cristalina.

A lignina e seus derivados, dependendo de sua concentração, distribuição e composição, podem interferir no acesso das celulases ao componente celulósico (MCMILLAN, 1994; MOONEY *et al.*, 1998; SUN e CHENG, 2002). Além disso, parte das enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose pode ser inativada pela adsorção na superfície da lignina. A fração de celulases tornada improdutiva devido a este tipo de adsorção pode chegar a até 70% do total de enzimas adicionadas ao meio (MCMILLAN, 1994; MOONEY *et al.*, 1998; SUN e CHENG, 2002; WANG *et al.*, 2003). Substratos celulósicos com baixo conteúdo de lignina usualmente apresentam altas acessibilidades, requerendo, portanto, menores dosagens de enzimas para alcançar um alto rendimento de hidrólise. Ademais, dependendo das condições reacionais do pré-tratamento, geralmente em sistemas ácidos, os fragmentos de lignina solubilizados no meio reacional tendem a reagir entre si e com derivados dos produtos de degradação dos carboidratos (como o furfural), para produzir compostos de alta massa molar que também são prejudiciais à hidrólise enzimática (BALAT, 2011). Esses compostos são denominados de pseudo-lignina, uma vez que não são derivados da lignina que estava presente no material nativo. HU *et al.* (2012) relataram que pseudo-ligninas resultantes do pré-tratamento ácido de cavacos do álamo apresentaram estruturas aromáticas contendo grupos carbonílicos, carboxílicos e metoxílicos. Os mesmos autores observaram que o aumento da quantidade (10 a 40%) dessas estruturas nos materiais pré-tratados resultaram em diminuições dos rendimentos de glucose durante a hidrólise enzimática. Por exemplo, a presença de 10% de pseudo-lignina no material pré-tratado revelou 74% de rendimento de glucose em 48 h, enquanto que o aumento de pseudo-lignina para 40% diminuiu esse rendimento para 46% no mesmo tempo reacional. O material pré-tratado sem a adição de pseudo-lignina

resultou em 80% de rendimento de glucose após 48 h, o que demonstrou o efeito negativo dessas estruturas na perda de atividade das enzimas hidrolíticas.

Os principais fatores que afetam a hidrólise enzimática relativos ao comportamento das enzimas, correspondem à inibição retroativa devido ao acúmulo dos produtos de hidrólise (glucose e celobiose) e à inibição pelos coprodutos oriundos do pré-tratamento, como compostos furânicos, ácidos fenólicos e alifáticos e oligômeros solúveis no meio reacional (por exemplo, xilo-oligômeros). Outros fatores também podem comprometer a ação enzimática, como a desnaturação térmica e/ou perda de atividade pelo efeito da agitação mecânica (cisalhamento) (RAMOS *et al.*, 1992; TENGBORG *et al.*, 2001; XIAO *et al.*, 2004; ROSGAARD *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009). Conseqüentemente, todos esses efeitos são mais evidentes em reações que operam em altos teores de sólidos totais.

### 2.3.2 Potencial da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais

A condução da hidrólise enzimática na presença de elevados teores de sólidos totais proporciona a produção de altas concentrações de açúcares fermentescíveis, o que é ideal para a escala industrial. O termo alto teor de sólidos totais na reação enzimática é dependente do tipo e da severidade do pré-tratamento, bem como da matéria-prima empregada. Em geral, este termo é definido quando a quantidade de água livre no sistema reacional é baixa, o que na maioria dos casos é alcançado quando se utiliza uma carga de sólidos totais igual ou superior a 15%. Diversos trabalhos relatam a hidrólise em alto teor de sólidos totais, como o de ZHANG *et al.* (2009) que atingiram a produção de 156 g L<sup>-1</sup> de glucose após 48 h de hidrólise de polpas celulósicas derivadas de cavacos de álamo, sob teor de sólidos totais de até 20%.

A conversão da celulose diminui quando a hidrólise enzimática é realizada em alto teor de sólidos totais e esse fenômeno é conhecido como efeito de sólidos (do inglês, *solid effect*) (KRISTENSEN *et al.*, 2009). CARA *et al.* (2007) observaram esse efeito durante a hidrólise de podas de oliveiras pré-tratadas por água quente, utilizando o complexo enzimático Celluclast 1.5 L (15 FPU g<sup>-1</sup> de substrato seco). A conversão em 72 h diminuiu linearmente de 76,2 para 49,9% quando o teor de sólidos totais aumentou de 2 para 30%, respectivamente. Em consequência, a concentração final de glucose aumentou de 5 para 60 g L<sup>-1</sup>, respectivamente.

KRISTENSEN *et al.* (2009) investigaram os fatores responsáveis pelo efeito de sólidos, tais como mudanças na composição química do substrato, inibição pelo produto final de hidrólise e baixa quantidade de água disponível. Esse estudo foi conduzido com papel de filtro (um substrato puramente celulósico) para evitar a influência da adsorção inespecífica das enzimas ou de inibidores derivados da lignina. Ao comparar um material contendo lignina com o papel de filtro, tendências similares de conversão foram observadas em hidrólises realizadas em altos teores de sólidos totais para ambos os materiais

celulósicos. O segundo fator estudado por KRISTENSEN *et al.* (2009) foi a inibição pelo produto final de hidrólise. Diferentes rendimentos de açúcares foram observados após 48 h de hidrólise a 5 e 20% de sólidos totais (64,5 e 38,5%, respectivamente). Contudo, quando 50 g L<sup>-1</sup> de glucose foram adicionados no início da reação, ambos os sistemas reacionais resultaram em rendimentos similares após 48 h de hidrólise (29,7 e 26,3% para 5 e 20% de sólidos totais, respectivamente). Então, esses autores sugeriram que as enzimas são inibidas da mesma forma sempre que certa concentração de glucose é alcançada no meio reacional.

A quantidade de água presente no meio é também um fator de grande influência em altos teores de sólidos totais devido o seu papel como reagente e solvente (ZACCAI, 2004). KRISTENSEN *et al.* (2009) pesquisaram o efeito da razão água/enzima pelo aumento do teor de água de 20 para 25%. No entanto, os resultados obtidos após 40 h de hidrólise não revelaram correlação direta entre a redução do conteúdo de água e a diminuição dos rendimentos de hidrólise enzimática.

Um grande exemplo da importância do emprego de altos teores de sólidos totais na hidrólise enzimática é no caso do processamento do etanol celulósico, em que o aumento na carga de substrato permite uma redução significativa nos custos de produção. As vantagens incluem a redução do número dos reatores, tanques de estocagem e energia requerida para trocas térmicas (aquecimento e resfriamento) durante a destilação (MOHAGHEGHI *et al.*, 1992; JØRGENSEN *et al.*, 2007; ROCHE *et al.*, 2009a; YANG *et al.*, 2011). Adicionalmente, o consumo de água é menor e tanto a geração quanto os custos do tratamento de efluentes são minimizados (MODENBACH e NOKES, 2013). Neste processo, a destilação somente é viável se o meio de fermentação contiver mais que 4% de etanol; logo, a concentração de açúcares fermentescíveis nos hidrolisados deve ser de pelo menos 80-90 g L<sup>-1</sup>. Para alcançar esta concentração, considerando um material pré-tratado que possua 60% de glucanas, o teor inicial de sólidos totais na hidrólise deve ser de pelo menos 15%, com uma conversão de 90% das glucanas em glucose e um rendimento final de etanol de pelo menos 95% após a fermentação (ZHAO *et al.*, 2013).

Quando o teor de sólidos totais está abaixo de 4%, os substratos pré-tratados estão suspensos em água livre abundante e a suspensão resultante é fácil de ser agitada (OSAWA e SCHUERCH, 1963; NUTT *et al.*, 1993; SWITZER e KLINGENBERG, 2004). No entanto, ao aumentar o teor de sólidos totais a aproximadamente 8%, ocorre um aumento no grau de interações entre as fibras e isso leva a um aumento substancial na formação de aglomerados. Em teores de sólidos totais ainda maiores (20-40%), ocorre a formação de suspensões muito mais densas em que prevalecem as interações fibrilares (COUSSOT, 2005). Desse modo, quando o teor de sólidos totais se aproxima de 20%, a água está totalmente absorvida na biomassa e, uma vez que não há água livre no sistema, a

viscosidade aumenta e a agitação do material vai se tornando cada vez mais difícil (HODGE *et al.*, 2009; MODENBACH e NOKES, 2013). Como consequência, a eficiência da hidrólise enzimática diminui consideravelmente (VIAMAJALA *et al.*, 2009). Nesse sentido, é importante o entendimento das propriedades reológicas do material pré-tratado que são submetidos a reação de hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais.

A acessibilidade do substrato sólido ao ataque enzimático em alto teor de sólidos totais está relacionada não somente com as propriedades estruturais do material e a composição dos complexos enzimáticos, mas também com a obtenção de uma boa mistura entre as fases. VARGA *et al.* (2004) verificaram que 15% de sólidos totais de palha de milho pré-tratada podem ser eficientemente utilizados em um processo de fermentação e hidrólise simultâneas (do inglês, *Simultaneous saccharification and fermentation - SSF*). Porém, um aumento adicional da concentração de substrato reduziu a produção de etanol significativamente como resultado de problemas de transferência de massa. Portanto, o método utilizado para a agitação da suspensão celulósica apresenta um grande impacto sobre a velocidade da conversão por hidrólise enzimática. Por exemplo, ZHANG *et al.* (2009) observaram uma significativa redução no tempo de liquefação quando a hidrólise em alto teor de sólidos totais (20%) foi realizada em um reator com sistema de agitação de eixo rotativo (do inglês, *peg mixer*). O termo liquefação é utilizado para descrever o momento em que a suspensão celulósica, altamente pastosa, se torna visivelmente líquida devido à ação progressiva das enzimas celulolíticas. Esses autores verificaram que o tempo de liquefação no reator foi de 1 h, enquanto que no caso da hidrólise realizada em frascos com agitação orbital, um tempo muito maior foi necessário para alcançar o mesmo efeito.

Reatores com diversos tipos de agitação já foram propostos na literatura por promoverem uma eficiente mistura entre as fases na hidrólise enzimática em altos teores de sólidos totais (ZHANG *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; PALMQVIST *et al.*, 2015). No entanto, o consumo energético também deve ser levado em consideração, uma vez que se almeja o desenvolvimento de aplicações em escala industrial. ZHANG *et al.* (2010) estudaram a hidrólise enzimática em 30% de sólidos totais da palha de milho pré-tratada por explosão a vapor por dois tipos de agitação em reatores verticais. O primeiro sistema de agitação foi o helicoidal, que consumiu inicialmente 8 W kg<sup>-1</sup> de palha de milho pré-tratada que foi reduzido para 1 W kg<sup>-1</sup> após 72 h de hidrólise. O outro sistema utilizado foi o Rushton (um agitador que fornece um fluxo radial), em que foi observado um maior gasto energético de 40 W kg<sup>-1</sup> de palha de milho pré-tratada no início da reação e uma diminuição para somente 29 W kg<sup>-1</sup> após 72 h de hidrólise. Além disso, o primeiro sistema forneceu um menor tempo de liquefação, cerca de 2 h anterior ao observado para o agitador Rushton.

Alternativas para a condução da hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais incluem as reações em batelada alimentada (do inglês, *fed-batch*), onde a reação de hidrólise é facilitada pela diminuição da resistência à transferência de massas no início do ensaio. YANG *et al.* (2011) alcançaram 85% de conversão em 30 h de hidrólise com um substrato que continha 45% de celulose, percentual semelhante ao bagaço de cana explodido a vapor. A sacarificação foi iniciada com 15% de sólidos totais e, então, aumentou-se gradativamente a quantidade de substrato até 30%. KUHAD *et al.* (2010) conduziram experimentos em batelada alimentada utilizando papel jornal como matéria-prima e comprovaram que, dessa forma, houve uma melhora na produção de açúcares e, conseqüentemente, um aumento no rendimento em etanol.

A batelada alimentada permite o aumento da concentração de substrato no meio reacional, o que leva a aumentos nas concentrações de açúcar no hidrolisado e de etanol após a fermentação. Outra vantagem da batelada alimentada é a redução dos problemas de homogeneização, uma vez que, nesse processo, o substrato é adicionado gradualmente à medida que vem sendo consumido e isso mantém a viscosidade da reação em baixo nível e minimiza a energia necessária para agitação (CHEN *et al.*, 2007).

De modo a também aumentar a concentração de substrato no meio reacional, aditivos como surfactantes e polímeros naturais ou sintéticos podem ser utilizados para melhorar o processo de dessorção das enzimas no substrato e minimizar a adsorção inespecífica das enzimas sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (CHANDRA *et al.*, 2007). A adição de surfactantes como Tween 80 ou polietilenoglicol tem reduzido o tempo e aumentado a eficiência da hidrólise enzimática. Essas substâncias adsorvem sobre a superfície da lignina, reduzindo substancialmente a adsorção das enzimas a este polímero. BORJESSON *et al.* (2007) verificaram que a adsorção do polietilenoglicol sobre a lignina ocorre por interação hidrofóbica e comprovaram que a adição desse impede a adsorção não produtiva das enzimas sobre superfícies contendo lignina. KRISTENSEN *et al.* (2007) relatam que a utilização de surfactantes é capaz de aumentar a conversão da celulose em até 70%. Dessa forma, busca-se deixar as enzimas mais disponíveis para atuarem sobre o seu substrato verdadeiro e, conseqüentemente, melhorar a conversão desse em açúcares passíveis de fermentação. O uso desses aditivos merece atenção como alternativa para otimizar a hidrólise enzimática, particularmente em situações onde o teor de sólidos totais do substrato no meio de reação seja superior a 10% (ANDREAU *et al.*, 2008).

### 2.3.3 A importância da reologia na hidrólise enzimática

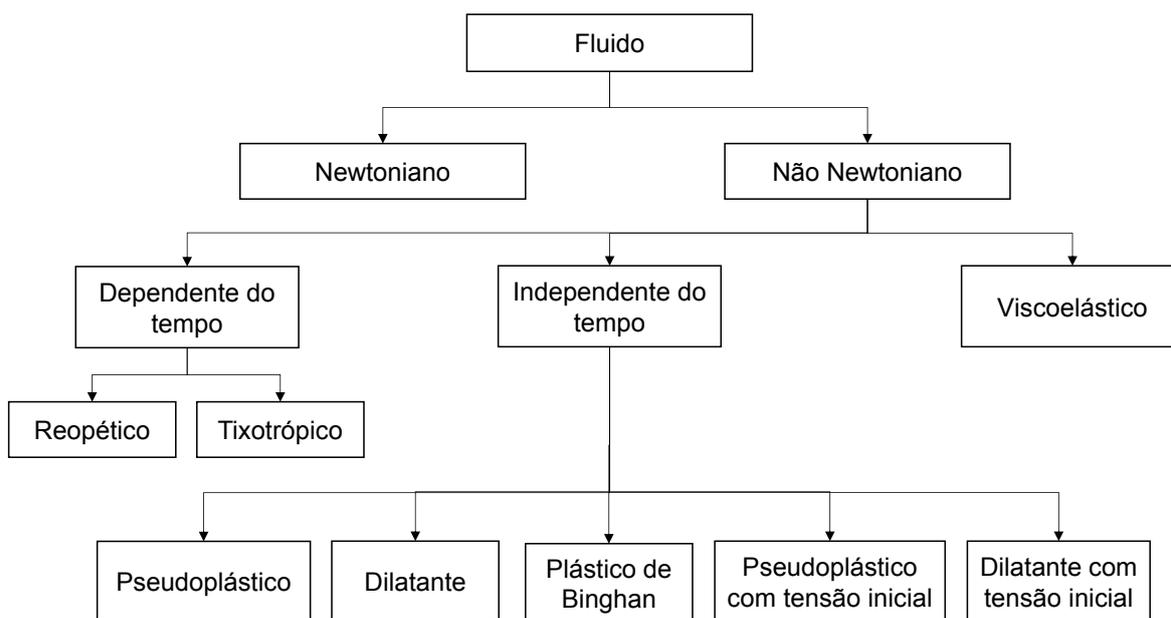
A reologia é uma importante ferramenta, não somente na etapa de hidrólise enzimática, mas em todo o processamento de biomassa para a produção de

biocombustíveis. A reologia é utilizada para compreender o escoamento e a deformação dos materiais envolvidos na transformação das matérias-primas em produtos. O conhecimento do comportamento reológico dos materiais envolvidos nas indústrias é importante para o projeto de equipamentos de processo. Em muitas operações industriais (agitação, evaporação, destilação e bombeamento) trabalha-se com produtos líquidos, pastosos ou suspensões, sendo de fundamental importância conhecer o comportamento reológico do fluido a ser processado para evitar erros no dimensionamento de equipamentos e propiciar possíveis reduções no consumo de energia (GABAS *et al.*, 2012).

De acordo com o seu comportamento reológico, os fluidos podem ser classificados em diferentes categorias (Figura 6), sendo que a viscosidade ( $\mu$ ) pode ser utilizada para classificá-los conforme o seu comportamento. A viscosidade de fluidos Newtonianos é influenciada somente pela sua temperatura ou composição, ou seja, são fluidos cuja relação entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade é constante. Exemplos de fluidos que possuem esse comportamento são água, solventes orgânicos e soluções de sacarose. Fluidos que não possuem esse tipo de comportamento são chamados de fluidos não-Newtonianos e a viscosidade é então substituída pela viscosidade aparente ( $\mu_{ap}$ ), que é válida para uma determinada taxa de deformação. Nesse caso, a viscosidade é também influenciada pela taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), o que significa que a relação entre a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento deixa de ser linear. Os fluidos não-Newtonianos geralmente são divididos em duas categorias: as dependentes e as independentes do tempo. No entanto, alguns fluidos apresentam um comportamento reológico que os classifica em uma região entre líquidos e sólidos (eles são viscosos e elásticos) e, por isso, podem ser chamados de viscoelásticos. Para os fluidos classificados como independentes do tempo, a uma temperatura constante, a viscosidade aparente depende somente da taxa de deformação, enquanto que para fluidos dependentes do tempo, a viscosidade aparente também depende do tempo de aplicação da tensão de cisalhamento (GABAS *et al.*, 2012).

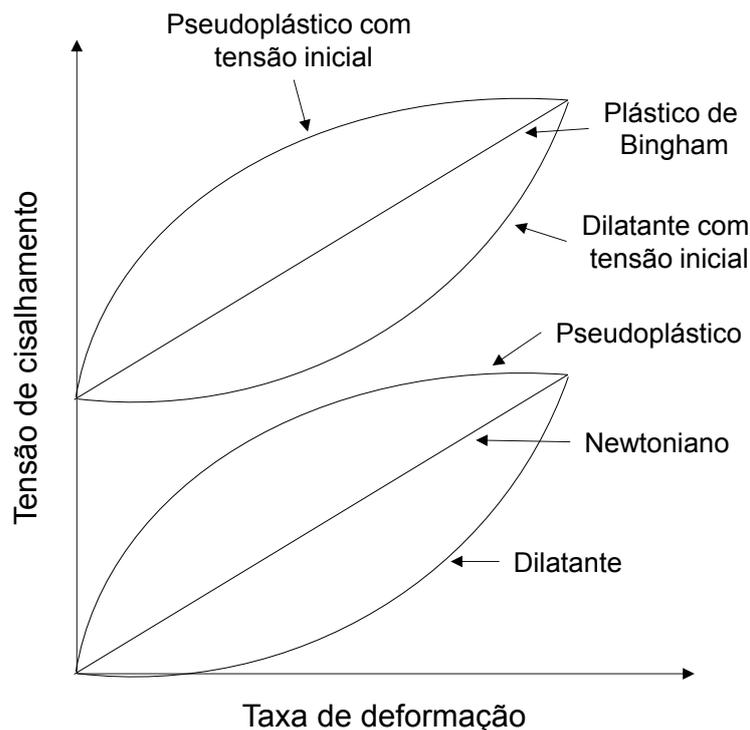
Os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo podem ser subdivididos em tixotrópicos e reopéticos (ou antitixotrópicos). Para os fluidos denominados tixotrópicos, a viscosidade diminui com o tempo a uma taxa de deformação fixa, enquanto que para os fluidos reopéticos ocorre o inverso, ou seja, a viscosidade aumenta. Por outro lado, a maioria dos fluidos não-Newtonianos são independentes do tempo e a taxa de acréscimo na tensão de cisalhamento diminui com o aumento da taxa de deformação, comportamento esse denominado de pseudoplástico. Uma possível explicação para esse comportamento é a modificação da estrutura de moléculas de cadeias longas com o aumento do gradiente de velocidade. Essas cadeias tendem a se alinhar paralelamente às linhas de corrente, diminuindo a resistência ao escoamento. Diversas substâncias como emulsões, suspensões ou dispersões de alta importância técnica e comercial pertencem a esse grupo.

Outra categoria são os fluidos dilatantes, que exibem o comportamento oposto ao pseudoplástico, ou seja, a taxa de acréscimo da tensão de cisalhamento aumenta com o aumento da taxa de deformação. O fenômeno de dilatância pode ser explicado pela existência de um sistema de partículas densamente empacotado. Se o sistema for submetido ao cisalhamento, deverá ocorrer certa separação das partículas antes do deslizamento entre elas. Como consequência, ocorrerá um aumento global do volume ocupado pelas partículas e à medida que as tensões aumentam, as partículas passam a interagir entre si, aumentando a viscosidade do fluido (GABAS *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Classificação do comportamento reológico dos fluidos (adaptado de GABAS *et al.* 2012).

Além dos dois tipos já citados, alguns fluidos não-Newtonianos apresentam uma tensão inicial de escoamento, ou seja, há uma tensão mínima que deve ser atingida para que o escoamento ocorra, normalmente devido a uma estrutura que precisa ser rompida antes que o fluido possa começar a escoar. Enquadram-se nessa classificação as soluções concentradas de polímeros ou dispersões concentradas de proteínas. A Figura 7 mostra o comportamento das curvas características dos fluidos independentes do tempo. É importante mencionar que a tensão de cisalhamento causa deformação nos sólidos, enquanto que em líquidos ela causa uma taxa de deformação. Isso significa que os sólidos são elasticamente deformados, enquanto os líquidos fluem (GABAS *et al.*, 2012).



**Figura 7.** Comportamento reológico dos fluidos independentes do tempo (adaptado de GABAS *et al.* 2012).

Quando materiais lignocelulósicos pré-tratados são utilizados para preparar suspensões em altos teores de sólidos totais, a reologia da suspensão celulósica exibe propriedades de fluxo não-Newtonianas, com uma grande viscosidade aparente e tensão de ruptura (do inglês, *yield stress*) que aumentam com a quantidade de sólidos insolúveis. Isto proporciona limitações de transferência de massa e calor em vários níveis dentro da suspensão celulósica (KNUTSEN e LIBERATORE, 2009; ROCHE *et al.*, 2009b; EHRHARDT *et al.*, 2010; WIMAN *et al.*, 2011; PALMQVIST *et al.*, 2015). Assim, uma conversão eficiente durante a hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais requer a distribuição adequada e uniforme de calor e das enzimas no meio. Além disso, é necessário um transporte de massa eficaz dos produtos no meio de reação para prevenir a acumulação localizada, que poderá levar à inibição enzimática (VIAMAJALA *et al.*, 2009).

Inúmeros trabalhos na literatura relatam que materiais pré-tratados de diferentes origens possuem um comportamento pseudoplástico (KNUTSEN e LIBERATORE, 2009; ROCHE *et al.*, 2009a; VIAMAJALA *et al.*, 2009). Isso significa que a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, provavelmente devido à quebra das estruturas altamente emaranhadas da lignocelulose e a diminuição da densidade dos agregados.

Durante a hidrólise enzimática de materiais pré-tratados, as propriedades reológicas das suspensões celulósicas sofrem mudanças dinâmicas dramáticas como

resultado da atividade celulolítica, já que componentes macromoleculares da estrutura são hidrolisados e transferidos à fase líquida (DASARI e BERSON, 2007; ROSGAARD *et al.*, 2007; VIAMAJALA *et al.*, 2009; PALMQVIST *et al.*, 2015). No entanto, a quantidade de enzimas que se ligam improdutivamente aos componentes da lignina pode aumentar em alto teor de sólidos totais, especialmente quando o teor de celulose diminuiu durante a reação (PALONEN, 2004). Portanto, ações para promover o entendimento fundamental das propriedades reológicas de suspensões altamente concentradas precisam ser desenvolvidas e utilizadas para projetar sistemas adequados de reação e bombeamento (VIAMAJALA *et al.*, 2009; WIMAN *et al.*, 2011).

#### 2.3.4 Aplicação do modelo cinético fractal na hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos se processa inicialmente em um sistema heterogêneo, com o substrato insolúvel e as enzimas solúveis no meio aquoso. Isto significa que as celulasas devem adsorver na superfície do substrato e em seguida difundir até um local reativo, sendo essa difusão considerada bidimensional (ZHANG e LYND, 2004a). A etapa de difusão demonstra uma grande diferença entre a reação de hidrólise enzimática da celulose e outras reações enzimáticas convencionais em meio homogêneo. Por muito tempo, a sacarificação enzimática da celulose foi submetida à análise cinética de Michaelis-Menten, apesar desta ser desenvolvida para reações homogêneas (WANG e FENG, 2010). Portanto, teorias cinéticas clássicas que descrevem a difusão e colisão termodinamicamente aleatória, derivadas da Lei de Fick, se mostram incapazes de descrever reações com tais irregularidades (XU e DING, 2007).

O acompanhamento da hidrólise enzimática por modelos cinéticos deve levar em consideração a complexidade que essa reação impõe. Um modelo empírico que vem sendo utilizado em diversos estudos de hidrólise enzimática da celulose é o modelo cinético fractal desenvolvido por VÄLJAMÄE *et al.* (2003), com base em estudos iniciais de KOPELMAN (1988) para reações heterogêneas. Esse modelo estabelece que, em um espaço heterogêneo (superfícies com obstáculos) com menos de três dimensões (como é o caso da hidrólise da celulose), o catalisador é adsorvido e/ou disperso em uma superfície na qual o espaço que hospeda a difusão, colisão e reação pode ser considerado uma dimensão fracionada (fractal). Assim, na cinética fractal, a constante da velocidade ( $k$ ), diferentemente de uma cinética convencional, é dependente do tempo. Além disso, esse modelo fornece o coeficiente fractal ( $h$ ), que está relacionado à constante de velocidade e revela os efeitos causados pelo pré-tratamento sobre a estrutura e a acessibilidade do substrato à ação enzimática (WANG e FENG, 2010).

BANSAL *et al.* (2009) e NGUYEN *et al.* (2015) demonstraram que a constante de velocidade  $k$  está relacionada com a reatividade entre o substrato pré-tratado e as enzimas

hidrolíticas. Uma redução nessa constante revela limitações na reação, como inibição e desativação das enzimas, assim como problemas de transferência de massa devido ao emprego de alto teor de sólidos totais. No entanto, um baixo valor de  $h$  revela que a hidrólise está próxima de ser uma reação de pseudo-primeira ordem ideal, onde não são observadas limitações de inibição enzimática, de transferência de massa e de disponibilidade de água. No caso do valor de  $h$  ser igual a zero, a velocidade da reação somente depende da concentração do substrato, como acontece na hidrólise de celulose com caráter totalmente amorfo.

WANG *et al.* (2010a) relataram os efeitos da carga enzimática e de surfactantes não-iônicos sobre a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos utilizando análise fractal. Mudanças no expoente fractal  $h$  foram associadas à acessibilidade do substrato, de modo que os melhores rendimentos de hidrólise foram para os substratos com baixos valores de  $h$ . WOJTUSIK *et al.* (2016) aplicaram o modelo cinético fractal na hidrólise enzimática em alto teor de sólidos de totais (20%,  $\text{m m}^{-1}$ ) da palha de trigo pré-tratada por explosão a vapor, sendo que as reações foram realizadas em biorreator com variações na velocidade de agitação de 50 para 500 rpm. Ambos os parâmetros obtidos pelo modelo ( $k$  e  $h$ ) apresentaram correlação com a velocidade de agitação durante a reação enzimática. Os valores de  $k$  aumentaram com os incrementos na agitação até 250 rpm e permaneceram constantes, indicando que as limitações de transferência de massa da suspensão foram superadas nas condições de maior agitação. Assim, os maiores valores de  $k$  indicaram rendimentos superiores de hidrólise enzimática. Por outro lado, os valores do coeficiente fractal ( $h$ ) diminuíram com os incrementos na agitação, o que sugeriu maior acessibilidade das enzimas ao substrato.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de pré-tratamentos ácidos e alcalinos sobre a composição química, as propriedades físicas e a suscetibilidade à hidrólise enzimática de diferentes materiais lignocelulósicos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- [1] Estabelecer condições reacionais que resultem em severidades equivalentes para o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana, na ausência e na presença de catalisadores ácidos exógenos ( $H_3PO_4$  e  $H_2SO_4$ );
- [2] Determinar os efeitos causados pelas diferentes condições de explosão a vapor na composição química, no comportamento reológico e no índice de cristalinidade dos substratos gerados, assim como na suscetibilidade à bioconversão utilizando complexos enzimáticos de última geração;
- [3] Caracterizar a fração solúvel em água derivada dos pré-tratamentos de explosão a vapor do bagaço de cana em relação à composição em carboidratos e demais coprodutos gerados;
- [4] Avaliar a influência dos parâmetros de pré-tratamento com dióxido de carbono supercrítico na presença de água (sistema  $CO_2/H_2O$ ) do bagaço de cana sobre a composição química, o índice de cristalinidade e os rendimentos de açúcares solúveis após hidrólise enzimática;
- [5] Caracterizar a fração solúvel em água derivada dos pré-tratamentos com o sistema  $CO_2/H_2O$  do bagaço de cana em relação à composição em carboidratos e demais coprodutos gerados;
- [6] Investigar alternativas de pré-tratamento para os resíduos do processamento do algodão, de modo a aumentar a suscetibilidade à hidrólise enzimática;
- [7] Analisar condições reacionais de pré-tratamento dos resíduos do algodão com hidróxido de sódio para a avaliação dos efeitos causados na composição química e nos rendimentos de açúcares solúveis;
- [8] Avaliar o pré-tratamento dos resíduos do algodão com imidazol baseado na composição química e na suscetibilidade à bioconversão dos materiais produzidos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

O bagaço de cana utilizado nesse trabalho foi fornecido pela empresa San Martin (São Paulo – SP), sendo que a sua coleta foi realizada pelo Centro de Tecnologia Canaveieira – CTC (Piracicaba – SP). Os resíduos provenientes do beneficiamento do algodão (pó de filtro e piolho sujo) foram provenientes da empresa Hantex Resíduos Têxteis Ltda (Gaspar – SC).

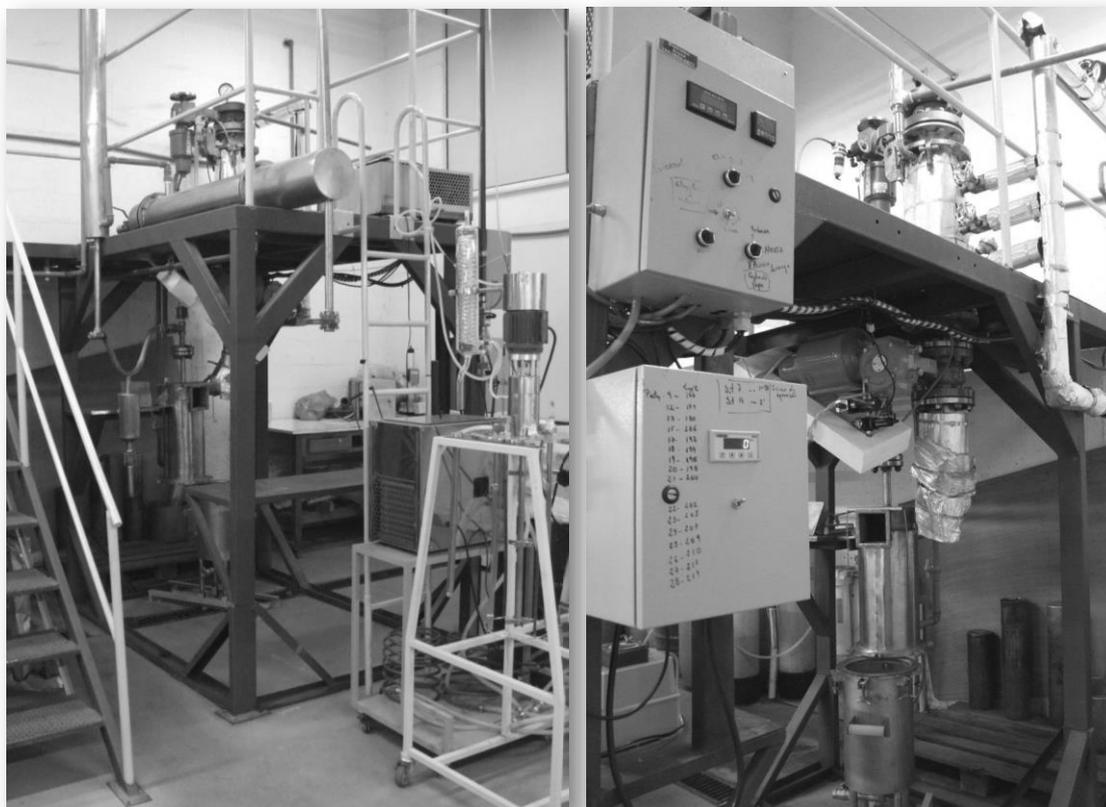
As preparações enzimáticas utilizadas na hidrólise dos diferentes tipos de substratos celulósicos (Cellic® CTec3, Cellic® CTec2 e Cellic® HTec3) foram fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária - PR). Cabe destacar que, conforme a ficha técnica fornecida com os complexos enzimáticos, a preparação mais recente (Cellic® CTec3) proporciona uma eficiência 1,5X maior na conversão dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos quando comparada com a sua geração anterior (Cellic® CTec2).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor

O bagaço de cana foi utilizado nos pré-tratamentos de explosão a vapor com cerca de 10% de umidade e sem nenhuma padronização granulométrica. Os ensaios foram realizados em um reator de aço inox com capacidade de 10 L, equipado com sensores para controle da temperatura e do tempo de reação. O reator foi acoplado a uma caldeira geradora de vapor, um compressor de ar e um ciclone, que foi empregado para a descarga do material e escape de vapores (Figura 8). Cerca de 500 g (massa seca) das amostras de bagaço foram introduzidos no reator pré-aquecido. A válvula de esfera superior foi então fechada e as válvulas de admissão do vapor foram imediatamente abertas. O aumento da temperatura foi acompanhado até atingir o valor desejado, quando iniciou-se a contagem do tempo de pré-tratamento. Ao término do tempo de residência do material no reator, as válvulas de entrada de vapor foram fechadas e a válvula de esfera inferior foi imediatamente aberta por meio de um atuador pneumático para promover a descompressão do material (explosão), que foi arrastado para o interior de um ciclone provido de um frasco coletor de aço inoxidável. Todo o material foi recolhido do coletor e centrifugado para separação da fração solúvel em água das fibras pré-tratadas. O material sólido foi lavado com água a um teor de sólidos totais de 5% ( $m\ v^{-1}$ ) sob agitação mecânica por 1 h, na temperatura ambiente. Essa suspensão foi centrifugada novamente e o material pré-tratado foi mantido sob vácuo em refrigerador para análises posteriores, como as determinações da composição química (item 4.2.5), do comportamento reológico (item 4.2.7) e do índice de cristalinidade (item 4.2.8), assim como para a produção de

holocelulose (item 4.2.6) e para os experimentos de hidrólise enzimática (item 4.2.10). As frações solúveis em água derivadas das duas filtrações foram caracterizadas em relação ao conteúdo de carboidratos, derivados furânicos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos conforme descrito nos itens 4.2.9.1, 4.2.9.2 e 4.2.9.3.



**Figura 8.** Reator utilizado para a explosão a vapor do bagaço de cana.

As condições reacionais basearam-se em estudos preliminares de PITARELO *et al.* (2016) e AGUIAR *et al.* (2013), onde empregou-se a temperatura de 195 °C, o tempo de reação de 7,5 min e a adição de dois catalisadores distintos, os ácidos fosfórico e sulfúrico, ambos na mesma concentração de 9,5 mg de ácido por g de substrato seco. Na Tabela 1 são mostradas as três condições inicialmente testadas, tanto na ausência (BA) quanto na presença de catálise sulfúrica e fosfórica (BS e BF, respectivamente). Baseado nesses experimentos, seis novas condições de pré-tratamento foram projetadas, envolvendo três ensaios de auto-hidrólise (nomeados de BA-1, BA-2 e BA-3) e três experimentos utilizando ácido sulfúrico (nomeados de BS-1, BS-2 e BS-3), conforme mostra a Tabela 1. Todos os pré-tratamentos foram realizados em duplicata. Para os experimentos realizados na presença de um catalisador exógeno (ácidos fosfórico e sulfúrico), a impregnação consistiu no borrifamento de uma solução do ácido correspondente sobre as amostras de bagaço, de modo a elevar o seu teor de umidade até 50%, enquanto que nos experimentos de auto-

hidrólise borrifou-se somente água destilada para se atingir o mesmo valor. Após a impregnação com água ou com a solução ácida correspondente, as amostras foram homogeneizadas, acondicionadas em sacos plásticos selados e conservadas em refrigerador até o momento do pré-tratamento. Tais procedimentos de impregnação foram realizados no dia anterior ao pré-tratamento (cerca de 15 h antes).

**Tabela 1.** Condições experimentais utilizadas para o pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Experimento	Condições reacionais		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	H <sup>+</sup> (mg g <sup>-1</sup> ss) <sup>1</sup>
BA	195	7,5	-
BS	195	7,5	9,5
BF	195	7,5	9,5
BA-1	195	15	-
BA-2	205	7,5	-
BA-3	200	10,5	-
BS-1	195	7,5	2,5
BS-2	170	7,5	9,5
BS-3	180	4	9,5

Legenda: BA, bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise; BS, bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica; BF, bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica.

<sup>1</sup>Quantidade do ácido exógeno adicionado (mg de ácido g<sup>-1</sup> de substrato seco).

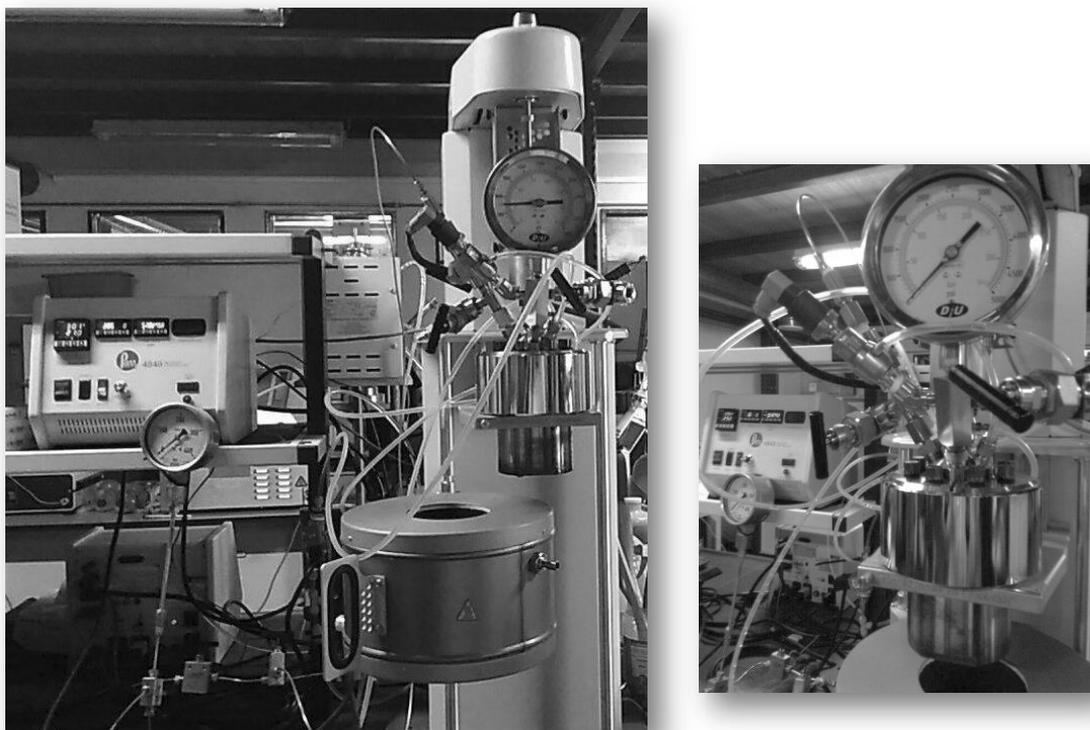
O fator de severidade combinada (FSC) foi utilizado para unificar os dados obtidos pelas diferentes combinações de temperatura, tempo de residência e, quando empregado, a concentração do catalisador ácido. Para o cálculo do FSC foi empregado o pH medido na fração solúvel em água após o pré-tratamento. Valer ressaltar que o tempo de aquecimento (cerca de 40 s) e de resfriamento foram desconsiderados no cálculo do log R<sub>o</sub> (fator de severidade).

Os rendimentos mássicos dos materiais pré-tratados foram determinados por gravimetria, utilizando a diferença entre a massa seca do bagaço de cana inicialmente alimentado no reator e a massa seca de substrato obtido após os pré-tratamentos. Os rendimentos mássicos das frações solúveis em água, derivadas das duas etapas de centrifugação, foram determinados pelo procedimento descrito por SLUITER *et al.* (2008a) (NREL/TP-510-42621). O ensaio consistiu em adicionar alíquotas de 5 mL das frações solúveis em água em recipientes tarados, os quais foram mantidos em 105 °C por 24 h. Após esse período, as massas obtidas foram utilizadas para determinar o rendimento mássico em relação à massa seca do material utilizado no pré-tratamento.

Os rendimentos mássicos e as composições químicas dos materiais pré-tratados e das frações solúveis em água foram utilizados para calcular as recuperações mássicas relativas a cada um dos principais componentes do bagaço de cana nativo (anidroglicose, anidroxilose, anidroarabinose, grupo acetila e lignina total).

#### 4.2.2 Pré-tratamento do bagaço de cana pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O

Os experimentos de pré-tratamento com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O foram realizados no Laboratório Nacional de Energia e Geologia – LNEG/Portugal, ao longo do período de doutorado sanduíche. Nesse pré-tratamento houve a necessidade de padronizar a granulometria do bagaço de cana entre 0,7 e 1,5 mm devido às menores quantidades empregadas. Os ensaios foram realizados em reator Parr de 250 mL de volume interno, com controle de temperatura, pressão e agitação (Figura 9).



**Figura 9.** Reator utilizado para o pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

Cerca de 14 g (massa seca) das amostras de bagaço e 140 mL de água foram adicionados no reator (razão líquido/sólido de 10). O CO<sub>2</sub> foi adicionado no reator até apresentar uma pressão inicial de 50 bar. Durante a pressurização, o gás foi injetado a uma temperatura de -10 °C para diminuir o efeito de eventuais diferenças na densidade do CO<sub>2</sub>. Após a pressurização, o reator foi aquecido e o aumento da temperatura foi

acompanhado até atingir o valor desejado, quando iniciou-se a contagem do tempo de pré-tratamento. A agitação do meio foi ajustado em um valor fixo de 200 rpm. Ao término do tempo de pré-tratamento, o reator foi rapidamente esfriado para 25 °C utilizando uma serpentina interna com passagem contínua de água e também pelo contato externo do mesmo com um banho de água gelada. A despressurização foi realizada lentamente, de modo a minimizar a perda de co-produtos voláteis e garantir a obtenção de um balanço de massas mais representativo. Os materiais pré-tratados e as frações solúveis em água foram separadas pelo uso de prensa manual. Os resíduos pré-tratados foram lavados com 280 mL de água destilada, prensados novamente e armazenados em refrigerador para a utilização em análises posteriores, como as determinações da composição química (item 4.2.5), do índice de cristalinidade (item 4.2.8) e da suscetibilidade à hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados (item 4.2.10). As frações solúveis em água derivadas das duas prensagens foram caracterizadas em relação ao conteúdo de carboidratos, derivados furânicos e ácidos alifáticos conforme descrito no item 4.2.9.1.

As condições reacionais foram baseadas nos estudos preliminares de MORAIS *et al.* (2015) e foram organizadas de acordo com o planejamento experimental Doehlert mostrado na Tabela 2. Nesse caso, todos os pré-tratamentos foram realizados em duplicata para a determinação do erro experimental. Para a condição otimizada pelo modelo estatístico (190 °C por 0 min), também foram realizadas experimentos controles utilizando auto-hidrólise e 50 bar de nitrogênio (sistema N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O).

**Tabela 2.** Planejamento experimental Doehlert (valores experimentais e codificados) aplicado para o pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

Experimento	Condições reacionais	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)
BC-1	180 (0)	7,5 (0)
BC-2	200 (+1)	7,5 (0)
BC-3	160 (-1)	7,5 (0)
BC-4	190 (0,5)	14 (0,866)
BC-5	170 (-0,5)	1 (-0,866)
BC-6	190 (0,5)	1 (-0,866)
BC-7	170 (-0,5)	14 (0,866)

Legenda: BC, bagaço de cana pré-tratado pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

O FSC foi utilizado para unificar os dados obtidos pelas diferentes combinações de temperatura e tempo de reação. Nesse cálculo foi utilizado o pH medido na fração solúvel em água após o pré-tratamento. Além disso, devido aos longos tempos de aquecimento

(cerca de 15 min) e resfriamento (cerca de 10 min), esses foram considerados no cálculo do log  $R_o$  (fator de severidade). Cabe destacar que o ácido carbônico gerado *in situ* não é totalmente contabilizado nos valores de pH medidos após a despressurização do sistema. Por isso, a equação empírica desenvolvida por VAN WALSUM (2001) foi utilizada para determinar o valor do pH no momento da reação, considerando a solubilidade e a pressão parcial do  $CO_2$  na temperatura empregada em cada condição experimental. O fator de severidade que utiliza o valor do pH teórico da reação foi denominado de  $FSC_{CO_2}$ .

Os rendimentos mássicos dos materiais pré-tratados foram determinados por gravimetria, utilizando a diferença entre a massa seca do bagaço de cana inicialmente alimentado no reator e a massa seca de substrato obtido após o pré-tratamento. Os rendimentos mássicos das frações solúveis em água derivadas das prensagens foram determinados conforme descrito por SLUITER *et al.* (2008a) (NREL/TP-510-42621). O ensaio consistiu em adicionar alíquotas de 5 mL das frações solúveis em água em recipientes tarados, que foram mantidos a 105 °C por 24 h. Após esse período, as massas obtidas foram utilizadas para determinar o rendimento mássico em relação à massa seca do material utilizado no pré-tratamento.

Os rendimentos mássicos e as composições químicas dos materiais pré-tratados e das frações solúveis em água foram utilizados para calcular as recuperações mássicas relativas a cada um dos principais componentes do bagaço de cana nativo (anidroglicose, anidroxilose, anidroarabinose, grupo acetila e lignina total).

#### 4.2.3 Pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com hidróxido de sódio

As amostras do pó de filtro (PF) e do piolho sujo (PS) com cerca de 10% de umidade foram utilizadas sem nenhuma padronização granulométrica nos pré-tratamentos com NaOH. Para os ensaios, 10 g (massa seca) da amostra e 100 mL de solução aquosa de NaOH (razão líquido/sólido de 10) foram adicionados em frasco de vidro e pré-tratados por um período fixo de 1 h em autoclave. Após o término do período de pré-tratamento, a suspensão foi filtrada para separar as fibras parcialmente deslignificadas (material pré-tratado) da fração que continha a lignina solúvel em solução alcalina. Os materiais pré-tratados foram lavados com água até pH neutro, drenados sob pressão reduzida em funil de Büchner e armazenados em refrigerador para utilização em análises posteriores, como na determinação da composição química (item 4.2.5) e em experimentos de hidrólise enzimática (item 4.2.10). Já as frações aquosas contendo lignina foram descartadas sem terem sido submetidas a nenhum procedimento de análise.

As condições reacionais escolhidas para o estudo de cada substrato foram organizadas de acordo com o planejamento experimental do tipo  $2^2$ , conforme mostra a

Tabela 3. Nesse caso, o erro experimental foi determinado pela realização de triplicata no ponto central.

Os rendimentos mássicos dos materiais pré-tratados foram determinados por gravimetria, utilizando a diferença entre a massa seca de cada resíduo inicialmente adicionado à reação e a massa seca de substrato obtido após os pré-tratamentos. Através dos rendimentos mássicos e das composições químicas dos materiais pré-tratados, foram determinadas as recuperações mássicas relativas a cada um dos principais componentes macromoleculares dos resíduos do processamento do algodão (anidroglicose, anidroxilose e lignina total).

**Tabela 3.** Planejamento experimental fatorial  $2^2$  (valores experimentais e codificados) realizado para o pré-tratamento com NaOH do pó de filtro e do piolho sujo.

Experimento	Condições reacionais	
	Concentração NaOH (%) <sup>1</sup>	Temperatura (°C)
PT/PF-1	4 (+1)	120 (+1)
PT/PF-2	2 (-1)	120 (+1)
PT/PF-3	4 (+1)	100 (-1)
PT/PF-4	2 (-1)	100 (-1)
PT/PF-5	3 (0)	110 (0)
PT/PS-1	4 (+1)	120 (+1)
PT/PS-2	2 (-1)	120 (+1)
PT/PS-3	4 (+1)	100 (-1)
PT/PS-4	2 (-1)	100 (-1)
PT/PS-5	3 (0)	110 (0)

Legenda: PT/PF, pré-tratamento do pó de filtro; PT/PS, pré-tratamento do piolho sujo.

<sup>1</sup>As concentrações de 2, 3 e 4% ( $m v^{-1}$ ) de NaOH correspondem a 0,2, 0,3 e 0,4 g de NaOH  $g^{-1}$  de substrato seco.

#### 4.2.4 Pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com imidazol

Os experimentos de pré-tratamento na presença de imidazol foram realizados no Laboratório Nacional de Energia e Geologia – LNEG/Portugal, ao longo do período de doutorado sanduíche. As amostras dos resíduos do processamento do algodão com cerca de 10% de umidade foram utilizadas sem nenhuma padronização granulométrica. Os ensaios foram realizados em frasco de vidro contendo 5 g (massa seca) da amostra e 45 g de imidazol (razão biomassa/imidazol de 9), com aquecimento fornecido em banho de óleo termostaticado. Após o término do período de pré-tratamento, o frasco foi removido do banho de óleo e cerca de 90 mL de água destilada foram adicionados. A suspensão foi então mantida em agitação por 1 h na temperatura ambiente e filtrada para separação do

material pré-tratado da fração aquosa contendo lignina solúvel em álcali. Os materiais pré-tratados foram lavados com 135 mL de etanol 96% e drenados sob pressão reduzida em funil de Büchner. Em seguida, esses mesmos materiais foram lavados com 135 mL de água destilada, drenados novamente sob pressão reduzida em funil de Büchner e armazenados em refrigerador para utilização em análises posteriores, como na determinação da composição química (item 4.2.5) e em experimentos de hidrólise enzimática (item 4.2.10). Os extratos alcalinos também foram descartados sem terem sido submetidos a nenhum procedimento de análise.

Devido à disponibilidade limitada de imidazol no laboratório, os efeitos do pré-tratamento foram avaliados primeiramente para o piolho sujo. As condições reacionais escolhidas para o estudo foram organizadas de acordo com o planejamento experimental fatorial  $2^2$ , conforme mostra a Tabela 4, sendo que o erro experimental foi determinado pela realização de triplicata no ponto central.

**Tabela 4.** Planejamento experimental fatorial  $2^2$  (valores experimentais e codificados) realizado para o pré-tratamento com imidazol do piolho sujo.

Experimento	Condições reacionais	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)
PT/PS-1	120 (-1)	1 (-1)
PT/PS-2	160 (+1)	1 (-1)
PT/PS-3	120 (-1)	3 (+1)
PT/PS-4	160 (+1)	3 (+1)
PT/PS-5	140 (0)	2 (0)

Legenda: PT/PS, pré-tratamento do piolho sujo.

Os rendimentos mássicos dos materiais pré-tratados foram determinados por gravimetria, utilizando a diferença entre a massa seca de cada resíduo inicialmente adicionado a reação e a massa seca de substrato obtido após os pré-tratamentos. Através dos rendimentos mássicos e das composições químicas dos materiais pré-tratados, foram determinadas as recuperações mássicas relativas a cada um dos principais componentes macromoleculares dos resíduos do processamento do algodão (anidroglicose, anidroxilose e lignina total).

#### 4.2.5 Composição química dos substratos nativos e pré-tratados

Os ensaios de determinação da composição química foram realizados de acordo com as recomendações do Laboratório Nacional de Energias Renováveis (NREL, do inglês *National Renewable Energy Laboratory*) dos Estados Unidos. A determinação da massa

seca do material nativo e dos materiais pré-tratados foi realizada em balança de infravermelho a 105 °C até massa constante. A quantidade de cinzas foi determinada em mufla a 575 °C por 4 h, segundo o procedimento descrito por SLUITER *et al.* (2008b) (NREL/TP-510-42622). Os extraíveis foram obtidos a partir de um processo de extração em Soxhlet, primeiramente com água (16 h) e após com etanol (95%) por cerca de 24 h, de acordo com o procedimento de SLUITER *et al.* (2008d) (NREL/TP-510-42619).

A composição química dos materiais celulósicos foi realizada por meio da hidrólise com ácido sulfúrico 72% (v v<sup>-1</sup>) por 1 h a 30 °C. Em seguida, o material foi diluído para uma concentração de 3% (v v<sup>-1</sup>) e condicionado a 121 °C por 1 h para posterior filtragem em cadinho de vidro sinterizado de porosidade média. O teor de lignina insolúvel em meio ácido dos materiais celulósicos foi determinado pela massa retida no cadinho e a lignina solúvel em ácido foi quantificada por espectroscopia no ultravioleta, utilizando os comprimentos de onda de 240 e 320 nm (SLUITER *et al.*, 2012) (NREL/TP-510-42618). A composição em carboidratos dos substratos celulósicos e seus respectivos produtos de desidratação foram determinados nos hidrolisados ácidos resultantes utilizando um sistema cromatográfico em fase líquida Shimadzu modelo LC10AD. Esse sistema era provido de amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e de detectores nos modelos RID10A para índice de refração e SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Hi-Plex H (Agilent, 300 x 7,7 mm) a 65 °C, precedida por pré-coluna Hi-Plex H (Agilent, 50 x 7,7 mm) e eluída com fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol L<sup>-1</sup> a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> (RAMOS e FONTANA, 2004). As quantificações foram efetuadas por padronização externa, com base em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado (celobiose, glucose, xilose, arabinose e ácido acético), levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida, que serviram para converter cada componente em seu respectivo derivado anidro: 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose, 0,88 para xilose e arabinose e 0,98 para o ácido acético. Os produtos de desidratação de hexoses e pentoses (HMF e furfural) também foram quantificados, entretanto, não foram convertidos nos seus respectivos carboidratos de origem, uma vez que não é possível determinar a origem destes produtos durante o procedimento de hidrólise ácida da biomassa.

#### 4.2.6 Holocelulose e $\alpha$ -celulose dos substratos nativos e pré-tratados

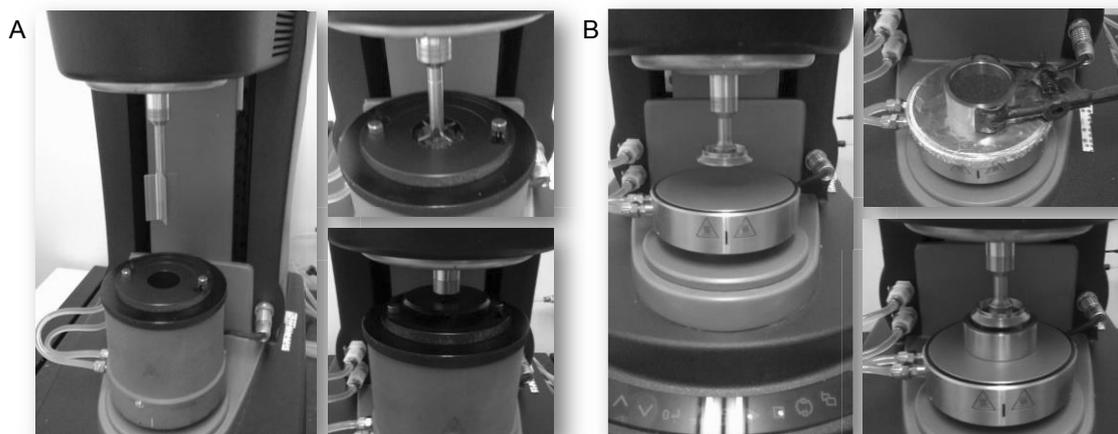
Amostras de bagaço de cana nativo livre de extraíveis e pré-tratadas por explosão a vapor foram deslignificadas para produzir as suas respectivas frações holocelulósicas e  $\alpha$ -celulósicas. Para isso, em um erlenmeyer contendo cerca de 100 mL de água destilada foram adicionados cerca de 5 g de amostra seca, 3 mL de ácido acético glacial, 21,5 mL

de acetato de sódio 20% (m v<sup>-1</sup>) e 8,5 mL de clorito de sódio 40% (m v<sup>-1</sup>). A mistura foi mantida em agitação a 75 °C por 30 min de reação e, em seguida, as mesmas quantidades de ácido acético, acetato de sódio e clorito de sódio foram readicionadas ao meio. Essa operação foi repetida mais duas vezes até completar 2 h de reação. Ao final, a mistura foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado previamente tarado e o resíduo foi lavado com 1 L de água gelada e 2 vezes com acetona (FENGEL e WEGENER, 1989). O material fibroso (holocelulose) foi seco em estufa a 40 °C e submetido à caracterização de sua composição química, conforme descrito no item 4.2.5.

A obtenção de  $\alpha$ -celulose foi realizada apenas para amostras de holocelulose derivadas de bagaço de cana nativo. Para isso, 3 g de amostra foram misturados com 100 mL de KOH 5% (m v<sup>-1</sup>) em um erlenmeyer e a mistura foi agitada por 120 min a 25 °C. Posteriormente, o material foi filtrado, lavado novamente com solução alcalina (KOH 5%) e depois com água. Esse mesmo procedimento foi então repetido, porém, com a utilização de 100 mL de KOH 24% (m v<sup>-1</sup>). O material foi novamente filtrado, o resíduo fibroso foi lavado com água até pH neutro e, em seguida, lavado com pequenas porções de acetona (FENGEL e WEGENER, 1989). A fração de  $\alpha$ -celulose foi seca em estufa a 40 °C e submetida à caracterização de sua composição química, conforme descrito no item 4.2.5.

#### 4.2.7 Comportamento reológico dos materiais produzidos

Esses experimentos foram realizados no Laboratório de Polpa e Papel da Universidad Pontificia Bolivariana – UPB/Colômbia. O equipamento empregado para as medidas reológicas foi o reômetro da marca TA Instruments, modelo Discovery HR-2, em regime oscilatório ou em fluxo (Figura 10). Todos os experimentos foram conduzidos a 50 °C, que foi a mesma temperatura utilizada nos experimentos de hidrólise enzimática. Os ensaios oscilatórios foram realizados utilizando geometria de placas paralelas (40 mm de diâmetro), com um *gap* de aproximadamente 1,0 mm (o *gap* foi regulado para não exceder a força axial de 0,5 N), para avaliar o comportamento reológico dos materiais pré-tratados nos teores de sólidos totais de 10, 15 e 20%. Para evitar a perda de água por evaporação, utilizou-se um pequeno cilindro metálico (15 mm de altura e 41,5 mm de diâmetro interno) como recipiente de amostra, que foi colocado sobre uma placa de aquecimento Peltier para controlar a temperatura. A viscosidade complexa dos diversos teores de sólidos totais empregados foi determinada pelo método de cisalhamento oscilatório de pequena amplitude (do inglês, *small amplitude oscillatory shear* - SAOS) na região de viscoelasticidade linear (amplitude da deformação de aproximadamente 0,05%), variando a frequência angular de 1 para 1000 rad s<sup>-1</sup>. Cada teste oscilatório foi repetido pelo menos duas vezes com amostras frescas para garantir a repetibilidade dos dados experimentais.



**Figura 10.** Configuração do reômetro usado nos experimentos realizados (A) em fluxo e (B) em sistema oscilatório.

Os experimentos em fluxo foram realizados para avaliar as mudanças das propriedades reológicas dos materiais pré-tratados após a hidrólise enzimática nos tempos de 3, 6, 9, 12 e 24 h. Esse tipo de experimento foi utilizado para reduzir o deslizamento do material nas paredes do recipiente, uma vez que a suspensão celulósica tornou-se cada vez mais líquida com o avanço da reação de hidrólise. A geometria empregada nessa análise consistiu de um rotor de quatro pás com 42 mm de altura e 28 mm de diâmetro, que foram colocados em um recipiente de 30 mm de diâmetro contendo a amostra. Para obter dados reológicos consistentes e eliminar os efeitos tixotrópicos após o carregamento da amostra no reômetro, todas as análises foram precedidas por um período curto de pré-cisalhamento com um tempo posterior de relaxamento para a recuperação parcial da estrutura. A variação na taxa de cisalhamento foi de 1 para 1000  $s^{-1}$ , a partir da qual foi obtida a viscosidade aparente das suspensões fibrosas.

#### 4.2.8 Cristalinidade dos substratos nativos e pré-tratados

A difratometria de raios-X (DRX) foi realizada para analisar as propriedades cristalográficas dos materiais nativos e pré-tratados, assim como das frações de holocelulose e  $\alpha$ -celulose. A análise foi realizada em difratômetro Shimadzu, modelo XRD-6000. O equipamento continha um tubo gerador da radiação correspondente à linha  $K\alpha$  ( $\lambda = 0,1542$  nm) de átomos de cobre, que operou a 40 kV e 30 mA. As intensidades de difração foram medidas no intervalo  $5^\circ \leq 2\theta \leq 50^\circ$  na taxa de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ , com aquisições a cada variação angular de  $0,02^\circ$ . O índice de cristalinidade (ICr) das amostras foi determinado pelo método empírico proposto por SEGAL *et al.* (1959), apresentado na Equação 8.

$$ICr (\%) = \frac{I_{200} - I_{am}}{I_{200}} \times 100$$

**Equação 8**

onde  $I_{200}$  e  $I_{am}$  correspondem às intensidades de difração na região cristalina em  $22,5^\circ$  de  $2\theta$  e na região amorfa em  $18,5^\circ$  de  $2\theta$ , respectivamente.

#### 4.2.9 Composição química das frações solúveis em água

##### 4.2.9.1 Carboidratos, ácidos alifáticos e compostos furânicos por CLAE

As frações solúveis em água, derivadas da filtração após os pré-tratamentos ácidos, foram caracterizadas pelo mesmo sistema cromatográfico descrito no item 4.2.5 para a quantificação por padronização externa de ácido fórmico, ácido levulínico, ácido acético, HMF e furfural. Além disso, foi necessária a realização de uma reação de pós-hidrólise segundo o método de SLUITER *et al.* (2008c) (NREL/TP-510-42623) para a conversão dos oligossacarídeos em monossacarídeos e tais hidrolisados foram analisados novamente nas mesmas condições cromatográficas do item 4.2.5 para a quantificação por padronização externa de celobiose, glucose, xilose e arabinose.

##### 4.2.9.2 Derivados fenólicos e compostos furânicos por CLAE

As frações solúveis em água também foram analisadas em um sistema cromatográfico em fase líquida Metrohm, modelo 882 Compact IC Plus, equipado com um amostrador automático 863 Compact e um detector de absorção no ultravioleta 887 Professional. A análise foi realizada em coluna Kinetex C18 (Phenomenex, 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) a uma vazão de 0,8 mL min<sup>-1</sup>, temperatura ambiente e fase móvel contendo água/metanol/ácido acético 80:20:1 em modo isocrático. Os seguintes compostos foram quantificados por padronização externa nos seus comprimentos de onda de absorção máxima: ácido vanílico (AV), ácido 4-hidroxibenzoico (4-AH), siringaldeído (SD) e 4-hidroxibenzaldeído (4-HD) em 215 nm; 5-metil-2-furfural (5-MF) e ácido siríngico (AS) em 280 nm; e ácido ferúlico (AF), ácido p-cumárico (p-AC) e ácido cafeico (AC) em 310 nm.

##### 4.2.9.3 Derivados fenólicos e compostos furânicos por CG-EM

Alíquotas de 1 mL das frações solúveis em água foram extraídas com quatro porções de 0,5 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro. Uma derivatização por siliilação foi então realizada reagindo 50  $\mu$ L dos extratos orgânicos com 50  $\mu$ L de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida contendo 1% de trimetilclorossilano a 70 °C durante 30 min. As análises das amostras siliiladas foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa Shimadzu modelo GC2010, acoplado a um espectrômetro de massas modelo QP2010-Plus. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram de 280 °C. Cerca de 1  $\mu$ L das amostras foram injetadas em modo

*splitless* na coluna capilar VF5-MS (Agilent, 30 m × 0,25 mm; 0,25 μm), utilizando hélio como gás de arraste a 1 mL min<sup>-1</sup> e o seguinte gradiente de temperatura: 75 °C por 3 min, 5 °C min<sup>-1</sup> até 150 °C, 0,5 °C min<sup>-1</sup> até 160 °C, 2 °C min<sup>-1</sup> até 190 °C, 5 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, 70 °C min<sup>-1</sup> até 325 °C mais 3 min nessa temperatura (MITCHELL *et al.*, 2014).

Os compostos identificados por CLAE no item 4.2.9.2 foram confirmados pela análise em CG-EM após reação de siliilação dos padrões comerciais e comparação entre seus respectivos tempos de retenção e espectros de massas. Além disso, outros componentes foram identificados apenas por comparação com espectros de massas disponíveis no banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, *National Institute of Standards and Technology - NIST*) ou por interpretação dos espectros de massas e comparação com dados da literatura.

#### 4.2.10 Ensaios de hidrólise enzimática dos substratos nativos e pré-tratados

Diferentes ensaios de hidrólise enzimática foram realizados para os materiais celulósicos nativos e pré-tratados. As diferenças empregadas foram no teor de sólidos totais (% m v<sup>-1</sup>) e na carga enzimática (FPU g<sup>-1</sup> de glucanas), enquanto que os demais parâmetros da reação foram mantidos constantes, como a temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e tampão acetato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> em pH 5,2 para os complexos enzimáticos Cellic CTec3 e Cellic HTec3 e em pH 4,8 para o complexo Cellic CTec2. Em determinados períodos da reação enzimática, alíquotas foram coletadas, filtradas em filtro de 0,45 μm e conduzidas à análise cromatográfica. A liberação de açúcares (celobiose, glucose e xilose) durante o processo hidrolítico foi monitorada por CLAE, utilizando as mesmas condições descritas no item 4.2.5. Os rendimentos de hidrólise foram calculados em relação à quantidade de carboidratos presentes nos materiais utilizados. Para glucanas, o rendimento foi expresso como equivalentes de glucose (EqGlc), que considera o somatório das concentrações de glucose e celobiose presentes no meio reacional ([GlcEq] = [glucose] + 1,0526 [celobiose]).

##### 4.2.10.1 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e pré-tratado por explosão a vapor

A primeira condição de hidrólise enzimática empregada para amostras de bagaço de cana nativo e pré-tratado por explosão a vapor foi para avaliar a acessibilidade enzimática dos materiais de acordo com o procedimento proposto pelo NREL. Esse ensaio foi realizado por 72 h empregando 2% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec3. Em seguida, foram realizados experimentos em condições mais realísticas por 96 h de hidrólise, em que se buscou elevar o teor de sólidos totais para 15% (m v<sup>-1</sup>) e diminuir a carga enzimática empregada para 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). Essa condição de hidrólise enzimática também foi submetida a

um aumento de escala para 1000 mL, mediante o uso do biorreator de bancada Labfors 5-HT BioEtOH (Infors, Suíça), conforme mostra a Figura 11. O consumo de energia durante a hidrólise no biorreator foi determinado pelo produto entre o torque ( $T_r$ ) requerido para agitação da suspensão celulósica e a velocidade angular ( $v$ ) do agitador, que foi de 150 rpm ( $15,7 \text{ rad s}^{-1}$ ), segundo a Equação 9 (ASCANIO *et al.*, 2004; CORRÊA *et al.*, 2016).

$$\text{Consumo de energia (W)} = T_r \times v$$

**Equação 9**

**Figura 11.** Biorreator de bancada utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática.

Por último, o material produzido na condição de menor severidade (BA, FSC = 0,44) foi selecionado para realizar um estudo de otimização de sua hidrólise enzimática. O efeito do teor de sólidos totais e da carga enzimática foi avaliado por meio de um planejamento fatorial  $2^2$ , com triplicata no ponto central e 4 pontos axiais (Tabela 5). Para essa série de experimentos também foi monitorada a viscosidade aparente, antes e durante 24 h de hidrólise enzimática, conforme descrito no procedimento do item 4.2.7.

**Tabela 5.** Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na condição de auto-hidrólise (195 °C e 7,5 min).

Experimento	Condições reacionais	
	Carga enzimática (FPU g <sup>-1</sup> de glucanas)	Sólidos totais (%, m v <sup>-1</sup> )
HE/BA-1	7,7 (-1)	20 (+1)
HE/BA-2	38,6 (+1)	20 (+1)
HE/BA-3	23,1 (0)	15 (0)
HE/BA-4	7,7 (-1)	10 (-1)
HE/BA-5	38,6 (+1)	10 (-1)
HE/BA-6	1,4 (-1,41)	15 (0)
HE/BA-7	44,9 (+1,41)	15 (0)
HE/BA-8	23,1 (0)	8 (-1,41)
HE/BA-9	23,1 (0)	22 (+1,41)

Legenda: HE/BA, hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise.

#### 4.2.10.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e pré-tratado pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O

Duas condições de hidrólise enzimática foram utilizadas para o bagaço de cana nativo e pré-tratado pelos diferentes pré-tratamentos com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. A primeira foi utilizada para avaliar a acessibilidade dos materiais pré-tratados, empregando 2% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec3 por 72 h (procedimento NREL). A segunda condição foi realizada em 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais por 96 h com 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec3, que foi suplementado com 176,5 mg g<sup>-1</sup> de xilanas do complexo enzimático Cellic HTec3 (hemicelulases).

#### 4.2.10.3 Hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão nativos e pré-tratados com hidróxido de sódio

A condição de hidrólise enzimática empregada para avaliar a eficiência dos pré-tratamentos dos resíduos do algodão com hidróxido de sódio foi de 5% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2) por 96 h. Além disso, a melhor condição de pré-tratamento para cada material foi submetida a um estudo mais detalhado de hidrólise enzimática, de modo a aumentar os rendimentos e concentração de açúcares nos hidrolisados. Um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central foi empregado para avaliar o efeito do teor de sólidos totais e da carga enzimática (Cellic CTec3) sobre a hidrólise enzimática do material pré-tratado (Tabela 6).

**Tabela 6.** Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão após pré-tratamento a 120 °C com 4% de NaOH.

Experimento	Condições reacionais	
	Sólidos totais (%, m v <sup>-1</sup> )	Carga enzimática (FPU g <sup>-1</sup> de glucanas)
HE/PF-1	15 (+1)	25 (+1)
HE/PF-2	5 (-1)	25 (+1)
HE/PF-3	15 (+1)	15 (-1)
HE/PF-4	5 (-1)	15 (-1)
HE/PF-5	10 (0)	20 (0)
HE/PS-1	15 (+1)	25 (+1)
HE/PS-2	5 (-1)	25 (+1)
HE/PS-3	15 (+1)	15 (-1)
HE/PS-4	5 (-1)	15 (-1)
HE/PS-5	10 (0)	20 (0)

Legenda: HE/PF, hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado; HE/PS, hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado.

#### 4.2.10.4 Hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão nativos e pré-tratados com imidazol

Assim como no caso anterior, a condição de hidrólise enzimática empregada para avaliar a eficiência dos pré-tratamentos dos resíduos do algodão com imidazol foi de 5% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2) por 96 h. A melhor condição de pré-tratamento para cada material também foi submetida a um estudo mais detalhado de hidrólise enzimática, de modo a aumentar os rendimentos e concentração de açúcares nos hidrolisados. Para isso, um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com triplicata no ponto central foi empregado para avaliar o efeito do teor de sólidos totais e da carga enzimática (Cellic CTec3) sobre o rendimento de hidrólise do material pré-tratado (Tabela 7).

**Tabela 7.** Planejamento experimental fatorial 2<sup>2</sup> (valores experimentais e codificados) realizado para a hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão após pré-tratamento com imidazol a 140 °C por 2 h.

Experimento	Condições reacionais	
	Carga enzimática (FPU g <sup>-1</sup> de glucanas)	Sólidos totais (%, m v <sup>-1</sup> )
HE/PF-1	15 (-1)	4 (-1)
HE/PF-2	25 (+1)	4 (-1)
HE/PF-3	15 (-1)	12 (+1)
HE/PF-4	25 (+1)	12 (+1)
HE/PF-5	20 (0)	8 (0)
HE/PS-1	15 (-1)	4 (-1)
HE/PS-2	25 (+1)	4 (-1)
HE/PS-3	15 (-1)	12 (+1)
HE/PS-4	25 (+1)	12 (+1)
HE/PS-5	20 (0)	8 (0)

Legenda: HE/PF, hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado; HE/PS, hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado.

#### 4.2.11 Atividade enzimática dos complexos enzimáticos

A determinação das atividades enzimáticas dos complexos Cellic CTec3 e Cellic CTec2 foi realizada por meio dos procedimentos descritos por SCHWALD *et al.* (1988). Para isso, acondicionou-se em tubos de ensaio 1 mL de solução enzimática, 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol L<sup>-1</sup> e uma tira de papel de filtro Whatman n° 1 (1,0 x 8,5 cm) com 70 ± 1 mg de massa. Os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C por 1 h e então adicionou-se 3 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) para interromper a reação. A reação do DNS com açúcares redutores leva à redução do grupamento nitro na posição 3, formando o ácido 3-amino-2-hidróxi-5-nitro-benzóico que apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda de 540 nm quando em solução aquosa. Portanto, após 10 min de ebulição das amostras em banho-maria, foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

A quantificação dos açúcares redutores liberados após o período reacional foi baseada na curva de calibração da glucose, que foi analisada em diferentes concentrações (1, 1,5, 2, 2,5 e 3 mg mL<sup>-1</sup>). Assim, determinou-se a diluição do complexo enzimático no qual 2 mg de açúcar redutor (equivalentes de glucose) é liberado no meio de reação enzimática após 60 min de hidrólise. Para isso foi necessária a utilização de várias diluições dos complexos enzimáticos, capazes de liberar entre 1 a 3 mg de açúcar redutor, sendo que o valor desejado para os cálculos de atividade foi obtido pela resolução da equação

obtida. Esse procedimento mede a capacidade das enzimas em termos de unidades de papel de filtro (FPU, do inglês *filter paper unit*) por mL da solução enzimática empregada como referência, conforme mostra a Equação 10, proposta por GHOSE (1987).

$$\text{Atividade enzimática (FPU mL}^{-1}\text{)} = \frac{2}{0,18 \times 60 \times 1} \times [E] \quad \text{Equação 10}$$

onde 2 é a massa de açúcar redutor liberado a partir do papel de filtro no período reacional (em mg), 0,18 é a quantidade absoluta de glucose liberada no ensaio em  $\mu\text{mol mg}^{-1}$ , 60 é o período reacional em min, 1 é o volume da solução enzimática na reação em mL e [E] representa a concentração da enzima que foi capaz de liberar exatamente 2 mg de açúcar redutor no meio reacional.

#### 4.2.12 Aplicação do modelo cinético fractal

Todos os dados de hidrólise enzimática foram ajustados pelo modelo cinético fractal descrito por VÄLJAMÄE *et al.* (2003) com base nos estudos desenvolvidos por KOPELMAN (1988). Esse modelo é baseado em uma reação de pseudo primeira ordem em que a constante de velocidade ( $k$ ) é dependente do tempo ( $h^{-1}$ ) e relacionada com um coeficiente fractal ( $h$ ), que está confinado no intervalo  $0 \leq h < 1$  (Equação 11).

$$P(t) = S_0 \left[ 1 - e^{-k \times t^{1-h}} \right] \quad \text{Equação 11}$$

onde  $P(t)$  é a concentração do produto que foi liberada em função do tempo,  $S_0$  é a concentração inicial do substrato e  $t$  é o tempo de reação ( $h$ ). O modelo foi utilizado para revelar a influência das características estruturais do substrato ao longo do perfil de hidrólise enzimática. Os ajustes foram realizados pelo programa OriginPro 8.5.1.

#### 4.2.13 Análise estatística dos planejamentos experimentais

Os planejamentos experimentais aplicados nesse estudo foram analisados por modelos matemáticos lineares, quando foram empregados planejamentos fatoriais simples, ou por modelos quadráticos, que foram utilizados para planejamentos fatoriais completos (onde se encontram incluídos os pontos axiais) e no planejamento Doehlert. Para validação dos modelos matemáticos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os efeitos das variáveis independentes foram apresentados na forma de gráficos de Pareto, sendo que somente os modelos quadráticos foram utilizados para a construção de gráficos de contorno. Além disso, em vários casos, o teste de Tukey no

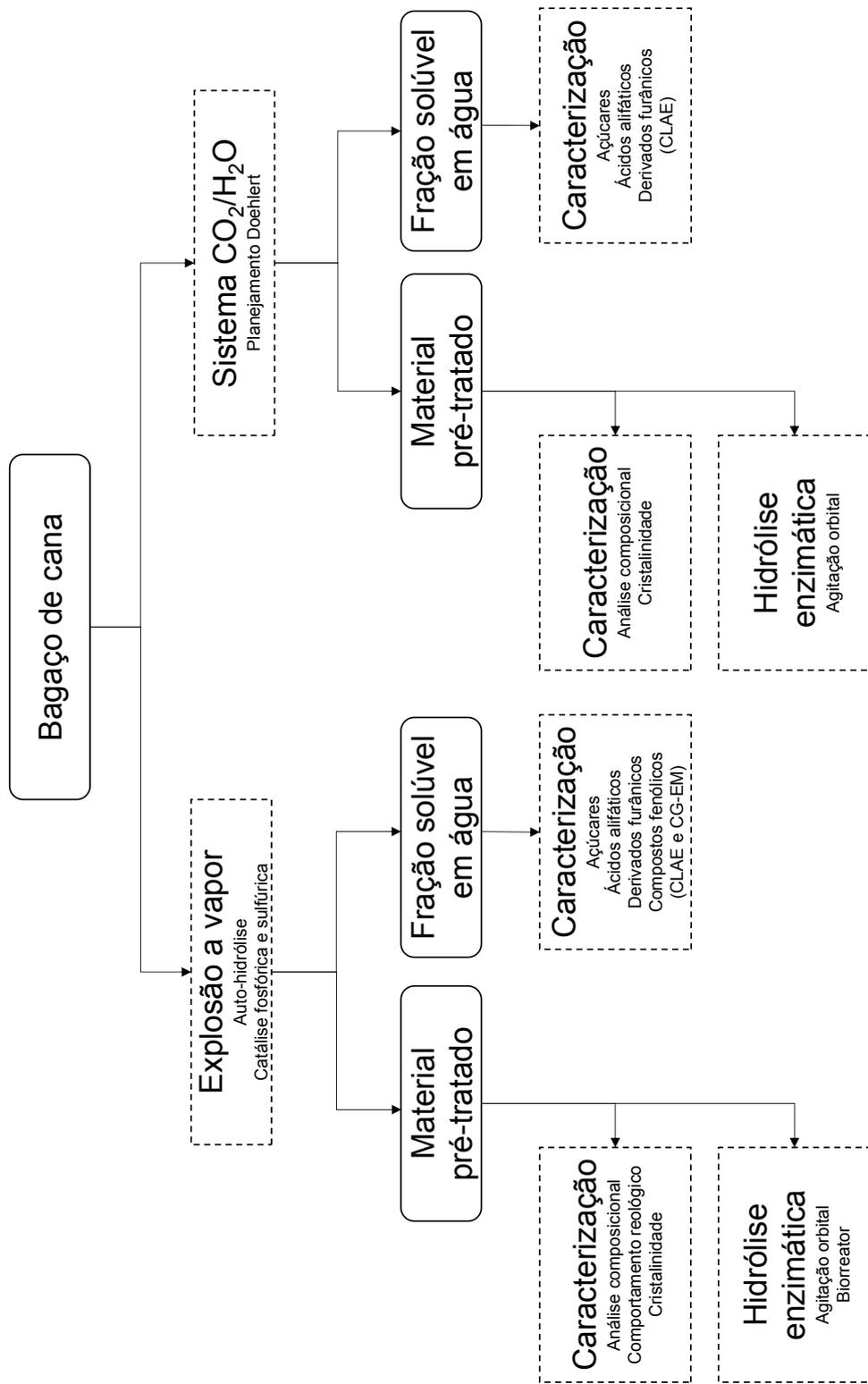
intervalo de confiança de 95% foi empregado para avaliar a diferença estatística observada entre valores médios. Todas essas análises foram realizadas no Software Statistica 8.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

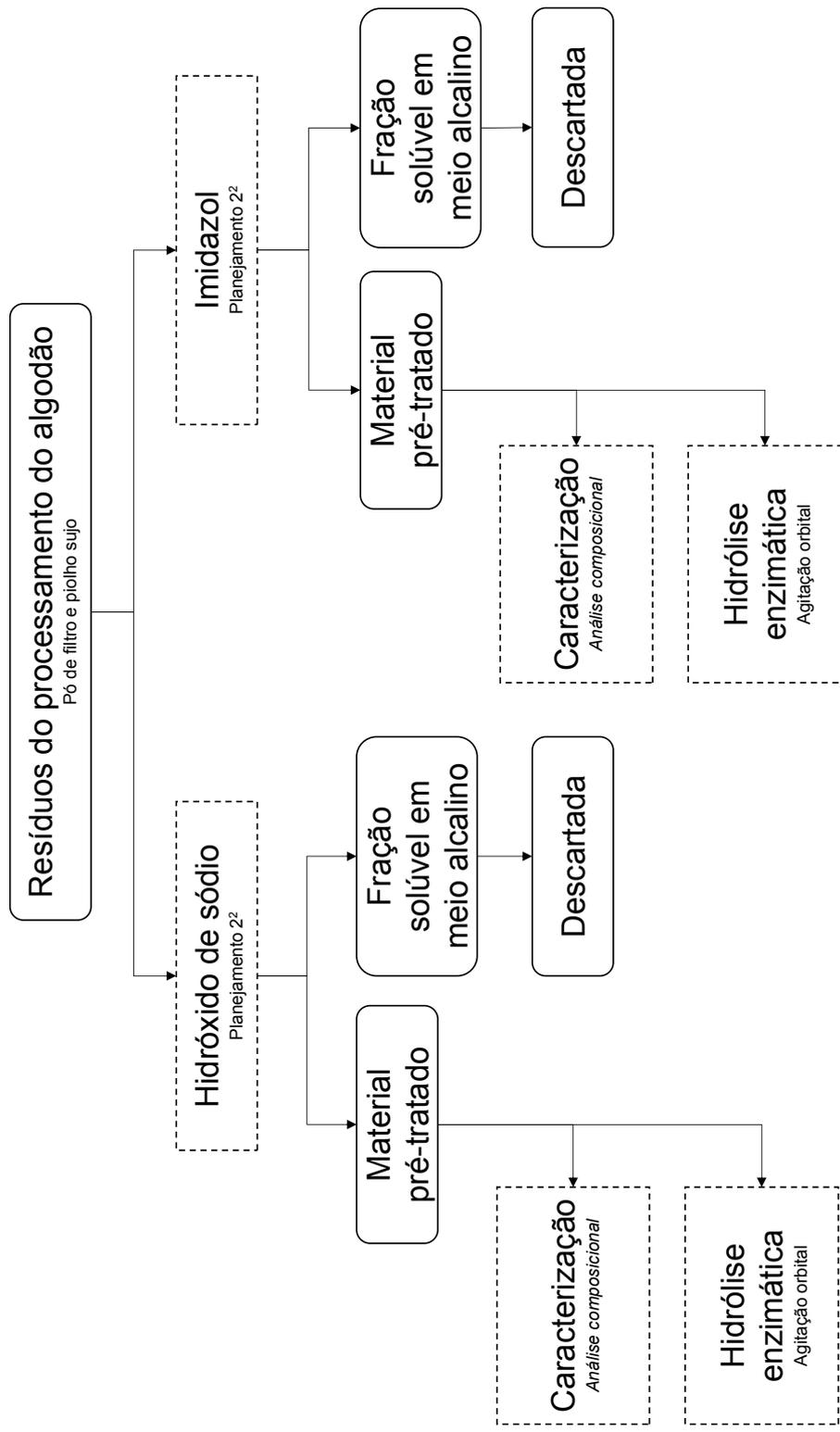
Nesse trabalho foram abordadas diferentes técnicas de pré-tratamento para dois tipos de materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana e os resíduos do processamento do algodão. Ambos são produzidos em grande escala no Brasil e, portanto, correspondem a materiais de grande potencial para transformação em produtos de interesse comercial, como o etanol celulósico. Os métodos de pré-tratamento aplicados para cada biomassa foram selecionados a partir de estudos preliminares e na possibilidade de sua execução no laboratório. É importante mencionar que a escolha do pré-tratamento está relacionada diretamente com a estrutura e a composição da biomassa. Deste modo, nem sempre é possível desenvolver metodologias que sejam eficientes para diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.

Os pré-tratamentos estudados para o bagaço de cana foram os métodos ácidos de explosão a vapor (na condição de auto-hidrólise e catalisada pelos ácidos fosfórico ou sulfúrico) e de dióxido de carbono supercrítico na presença de água ( $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ ). A Figura 12 mostra de uma forma resumida as etapas desenvolvidas para esse material, assim como as principais análises realizadas em cada método de pré-tratamento.

Os resíduos do processamento do algodão podem ser gerados em diferentes etapas do processo industrial de beneficiamento das fibras de algodão. Nesse trabalho escolheu-se estudar os resíduos produzidos em maior quantidade na cadeia de produção, denominados piolho sujo e pó de filtro. O piolho sujo é composto por resíduos de fibras de algodão, cascas, caules, folhas e demais sujidades que possam estar presentes durante a colheita. Por outro lado, o pó de filtro contém resíduos de fibras curtas de algodão que são recuperados nas telas dos filtros, durante os processos de fiação e tecelagem. A principal vantagem destes resíduos de algodão em comparação com outros materiais lignocelulósicos é seu alto teor de carboidratos e baixo teor de lignina. Desta forma, duas estratégias de pré-tratamento alcalinos foram empregadas para o estudo desses resíduos, de modo a aumentar a acessibilidade da celulose para a etapa de hidrólise enzimática. Os reagentes escolhidos para o pré-tratamento foram o hidróxido de sódio e o imidazol. As etapas e as análises realizadas para esses materiais nos diferentes pré-tratamentos estão representadas na Figura 13.



**Figura 12.** Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse trabalho para o pré-tratamento do bagaço de cana.



**Figura 13.** Fluxograma das etapas desenvolvidas nesse trabalho para pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão.

## 5.1 PRÉ-TRATAMENTOS ÁCIDOS DO BAGAÇO DE CANA

Uma grande variedade de métodos de pré-tratamento são relatados na literatura para o fracionamento dos principais constituintes do bagaço de cana (HARRISON *et al.*, 2013; ZHANG e WU, 2013; BATALHA *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2016; NEVES *et al.*, 2016). A explosão a vapor é amplamente aplicada devido à inúmeras vantagens, mas, apesar dos avanços alcançadas com esse método nas últimas décadas, estudos ainda são necessários para entender os efeitos causados por diferentes condições reacionais sobre as propriedades químicas e físicas do material lignocelulósico, bem como sobre a complexidade da composição química da fração solúvel em água gerada no processo. Nesse sentido, a primeira parte desse trabalho está focada no estudo de diferentes condições de explosão a vapor, catalisadas por ácidos exógenos (ácidos fosfórico e sulfúrico) ou por auto-hidrólise (sem adição de ácido exógeno). É importante mencionar que este pré-tratamento foi realizado em escala piloto (reator de 10 L), o que permite utilizar o bagaço de cana sem prévia etapa de moagem e assim visualizar os efeitos causados de forma mais realística.

Outra abordagem de pré-tratamento ácido aplicado nesse estudo foi o sistema de alta pressão CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Este método é relativamente recente quando comparado com a explosão a vapor, porém, diversos trabalhos já publicados demonstram sua efetividade para vários tipos de biomassa (FERREIRA-LEITAO *et al.*, 2010; SRINIVASAN e JU, 2012; MAGALHÃES DA SILVA *et al.*, 2014; PHAN e TAN, 2014; MOHARRERI *et al.*, 2017). A utilização do CO<sub>2</sub> na presença de água tem por consequência a formação do ácido carbônico *in situ*, que irá catalisar principalmente a hidrólise das hemiceluloses. Além disso, o CO<sub>2</sub> também pode ser utilizado como agente de impregnação do material lignocelulósico antes ou durante a realização da explosão a vapor. No entanto, devido a limitações na disponibilidade de equipamento, um sistema reacional em escala de laboratório (reator de 0,25 L) foi utilizado sem a rápida liberação da pressão (explosão) após a passagem do tempo reacional proposto para o pré-tratamento.

### 5.1.1 Pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor

O bagaço de cana utilizado para os pré-tratamentos por explosão a vapor foi caracterizado pelos procedimentos do Laboratório Nacional de Energia Renovável - NREL (do inglês, *National Renewable Energy Laboratory*). As determinações dos percentuais de cinzas e extraíveis foram realizadas diretamente em amostras do bagaço nativo, enquanto que os percentuais de carboidratos e lignina foram determinados a partir de amostras de bagaço livre de extraíveis. O procedimento de extração tem por finalidade a remoção dos compostos que não estão ligados diretamente à parede celular (compostos não estruturais), uma vez que podem interferir na quantificação dos demais componentes

presentes nos materiais lignocelulósicos. Além disso, durante a determinação dos carboidratos pela hidrólise ácida, a barreira química formada pelos extraíveis pode inibir a penetração do ácido sulfúrico na estrutura e resultar em uma hidrólise incompleta dos polissacarídeos (SLUITER *et al.*, 2008d). O teor de extraíveis totais do bagaço de cana foi de 7,6%, sendo que 5,3% foram removidos com água e 2,3% com etanol (Tabela 8). A extração com água remove compostos hidrossolúveis como carboidratos de baixa massa molar (sacarose) e substâncias pécnicas. Já a extração com etanol remove compostos oxigenados, como ácidos cinâmicos, fenóis, flavonóides, lipídeos e lignanas, dentre outros (SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014).

**Tabela 8.** Composição química do bagaço de cana nativo utilizado nos pré-tratamentos de explosão a vapor.

Componente	Percentual (%)
Anidroglucose <sup>1</sup>	31,8 ± 0,5
Anidroxilose <sup>2</sup>	12,2 ± 0,3
Anidroarabinose <sup>2</sup>	0,8 ± 0,1
Grupo acetila <sup>2</sup>	3,2 ± 0,2
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,4 ± 0,02
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	2,7 ± 0,7
Lignina total <sup>5</sup>	29,6 ± 1,3
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	5,2 ± 0,9
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	24,3 ± 0,4
Cinzas	8,3 ± 0,2
Extraíveis totais	7,6 ± 0,4
<i>Extraíveis em água</i>	5,3 ± 0,1
<i>Extraíveis em etanol</i>	2,3 ± 0,3
<b>Total</b>	<b>96,5</b>

<sup>1</sup>Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

O teor de glucanas (medidas como resíduos de glucopiranosil ou anidroglucose) foi de 31,8% e o percentual de hemiceluloses foi de 16,2%, considerando resíduos de xilopiranosil (ou anidroxilose), arabinofuranosil (ou anidroarabinose) e grupos acetila. Também foi possível quantificar os produtos de desidratação das hexoses e pentoses formadas durante a hidrólise ácida, identificados como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF) e furfural, respectivamente (Tabela 8). Como já mencionado anteriormente, o HMF pode ser

formado pela desidratação de hexoses como glucose e galactose, enquanto que o furfural é oriundo da desidratação de unidades de xilose e arabinose. Portanto, estes percentuais não foram convertidos aos seus polissacarídeos de origem, uma vez que não é possível determinar o percentual de desidratação de cada açúcar individualmente durante o procedimento de hidrólise ácida. No entanto, ao considerar que o HMF tenha origem principalmente na desidratação da glucose, o percentual de glucanas após a aplicação do fator de correção mássica aumentaria de 31,8% para 32,2%. Considerando que o furfural tem origem na desidratação de pentoses, o teor de hemiceluloses do bagaço aumentaria de 16,2% para 19,9% após a aplicação do fator de correção mássica. Por outro lado, é provável que a maior parte do furfural tenha tido origem nas unidades de arabinofuranose, já que este monossacarídeo é mais suscetível que a xilose às reações de hidrólise e desidratação.

O teor de cinzas presente no bagaço de cana nativo foi de 8,3% (Tabela 8). MORAES ROCHA *et al.* (2015) relataram que este conteúdo apresenta grande variação entre diferentes estudos (de 0,7 até 7,9%). A variação no teor de cinzas é atribuída a vários fatores como a variedade da cana utilizada, a localização geográfica do cultivo e impurezas oriundas do processo de colheita e do uso de trituradores industriais (SZCZERBOWSKI *et al.*, 2014).

O percentual de lignina total (somatório das ligninas solúvel e insolúvel em meio ácido) correspondeu a 29,6%, sendo superior a outros trabalhos desenvolvidos com bagaço de cana. Por exemplo, ROCHA *et al.* (2011) e SZCZERBOWSKI *et al.* (2014) encontraram valores de 21,1% e 20,6%, respectivamente. No entanto, o valor obtido nesse trabalho deve estar parcialmente superestimado. A primeira causa está na determinação da lignina insolúvel em ácido, cujo valor não foi subtraído de seu teor de cinzas. A segunda possibilidade para este alto valor está na presença de interferentes durante a determinação da lignina solúvel em ácido, realizada em espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 240 nm conforme proposto pelo método NREL (SLUITER *et al.*, 2012). Nessas condições, compostos furânicos (HMF e furfural), formados ainda que em pequena concentração durante a hidrólise ácida, absorvem fortemente apesar desse comprimento de onda estar em uma região de mínimo nos seus respectivos espectros de absorção. HYMAN *et al.* (2008) observaram uma contribuição significativa de compostos furânicos na determinação de lignina solúvel em ácido em hidrolisados de palha de milho no comprimento de onda de 240 nm, que corresponderam a 16% para o furfural e a 12% para o HMF do valor total da medida. De modo a diminuir a contribuição desses componentes na determinação de lignina solúvel em ácido, esses autores sugeriram realizar a leitura da absorbância em 320 nm, onde a influência dos compostos furânicos é muito menor. Em um estudo inter-laboratorial da determinação da composição química do bagaço de cana,

SLUITER *et al.* (2016) concluíram que a determinação da lignina solúvel em ácido em 240 nm resultou em um valor de 5,0%, enquanto que a leitura em 320 nm forneceu um valor de apenas 1,3%.

Após a caracterização química do material nativo, experimentos de explosão a vapor foram realizados para investigar a aplicabilidade do FSC em diferentes sistemas de pré-tratamento por auto-hidrólise, bem como ensaios baseados no uso de ácidos exógenos. Para isso, estudos de otimização não foram realizados devido aos inúmeros trabalhos já relatados na literatura para o bagaço de cana, inclusive de nosso próprio grupo de pesquisa. Dessa forma, como premissa inicial, três condições reacionais relatadas anteriormente por AGUIAR *et al.* (2013) foram utilizadas para avaliar o comportamento desses sistemas reacionais sobre a composição química dos materiais pré-tratados, bem como sobre os rendimentos globais de açúcares solúveis após a hidrólise enzimática. Essas três condições utilizaram a mesma temperatura (195 °C) e o mesmo tempo de residência no reator (7,5 min), empregando auto-hidrólise (sem adição de catalisador exógeno, nomeado BA), catálise fosfórica (nomeada BF) e catálise sulfúrica (nomeada BS), sendo que, nesses últimos dois casos, utilizou-se a mesma carga ácida de 9,5 mg g<sup>-1</sup> de substrato seco. A adição dos catalisadores ácidos aumentou a severidade dos pré-tratamentos, que pode ser mensurada a partir do cálculo do fator de severidade combinada (FSC) levando-se em consideração o pH da fração solúvel em água após o pré-tratamento. Como esperado, o FSC foi menor para o experimento de auto-hidrólise (0,44) quando comparado às catálises fosfórica (0,75) e sulfúrica (1,44). Os maiores valores de FSC para as catálises sulfúrica e fosfórica são devidos à maior força ácida dos ácidos sulfúrico (pKa = -3,0) e fosfórico (pKa = 2,1), uma vez que esses foram utilizados na mesma concentração. O desempenho dos pré-tratamentos foi avaliado principalmente pelos resultados de recuperação de glucanas e de hidrólise enzimática pelo procedimento padrão do NREL (SELIG *et al.*, 2008). Para os experimentos BA, BF e BS, as recuperações de glucanas após os pré-tratamentos foram de 98,2%, 98,6% e 73,1%, enquanto que os rendimentos de equivalentes de glucose (EqGlc) na hidrólise enzimática após 72 h foram de 87,9%, 90,9% e 98,0%, respectivamente.

A comparação entre os pré-tratamentos realizados em diferentes severidades revelou resultados esperados, como altas recuperações de glucanas em FSC menores e melhor desempenho de hidrólise enzimática em FSC maiores. Portanto, para comparar o desempenho de substratos produzidos pela utilização de catalisadores ácidos exógenos e por auto-hidrólise, o substrato BF (FSC = 0,75) foi selecionado como referência para a produção de materiais pré-tratados com FSC equivalentes. A escolha desse material foi devida a resultados satisfatórios de recuperação de glucanas e desempenho de hidrólise enzimática, bem como em função das condições reacionais que seriam exigidas

(temperaturas muito elevadas ou muito baixas) caso outro material fosse escolhido como referência. Por exemplo, se a catálise sulfúrica tivesse sido escolhida, os experimentos de auto-hidrólise demandariam elevadas temperaturas e/ou tempos reacionais para se atingir um FSC equivalente, o que provavelmente levaria à formação de produtos de degradação de carboidratos e lignina em altas concentrações. Por outro lado, se o experimento de auto-hidrólise fosse escolhido como referência, as condições reacionais das catálises fosfórica e sulfúrica seriam muito brandas, ou seja, temperaturas muito baixas e tempos de reação muito curtos que apresentariam pouco impacto sobre a estrutura associativa da parede celular (JACQUET *et al.*, 2015).

Com base nestas observações, três experimentos de auto-hidrólise (sem adição de ácido exógeno) e três de catálise sulfúrica foram realizados para se obter FSC semelhantes ou equivalentes à catálise fosfórica. Os três experimentos de auto-hidrólise foram realizados com o aumento no tempo (nomeado BA-1), na temperatura (nomeado BA-2) ou em ambas as variáveis de reação (nomeado BA-3). Já para a catálise sulfúrica, o primeiro experimento foi realizado na mesma temperatura e tempo de reação, ajustando-se a concentração de ácido (nomeado BS-1), enquanto que o segundo e o terceiro foram realizados na mesma concentração de ácido, alterando-se a temperatura (nomeado BS-2) e o tempo (nomeado BS-3) de reação, respectivamente. Os resultados de cálculo dos FSC para os diferentes tipos de pré-tratamento estão dispostos na Tabela 9.

**Tabela 9.** Fatores de severidade combinada (FSC) após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Experimento	Condições reacionais			log R <sub>o</sub> <sup>2</sup>	Média pH <sup>3</sup>	FSC <sup>4</sup>
	T (°C)	t (min)	H <sup>+</sup> (mg g <sup>-1</sup> ss) <sup>1</sup>			
BF	195	7,5	9,5	3,67	2,93	0,75
BA-1	195	15,0	-	3,97	3,18	0,79
BA-2	205	7,5	-	3,97	3,18	0,79
BA-3	200	10,5	-	3,97	3,19	0,78
BS-1	195	7,5	2,5	3,67	2,93	0,74
BS-2	170	7,5	9,5	2,95	2,18	0,76
BS-3	180	4,0	9,5	2,95	2,22	0,74

Legenda: BF, bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica; BA, bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise; BS, bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica.

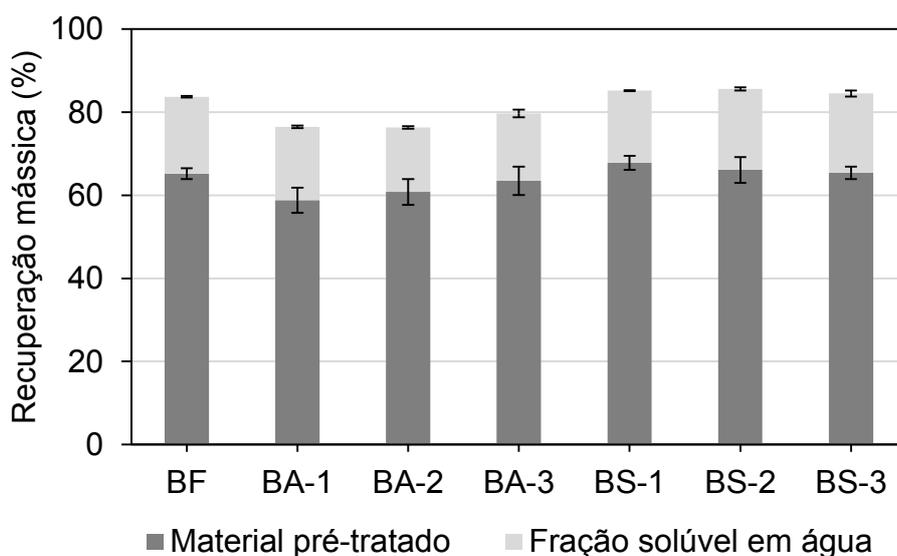
<sup>1</sup>Quantidade do ácido exógeno adicionado (mg de ácido g<sup>-1</sup> de substrato seco);

<sup>2</sup>log R<sub>o</sub> é o fator de severidade desenvolvido por OVEREND *et al.* (1987);

<sup>3</sup>Média do pH obtido na fração solúvel em água;

<sup>4</sup>FSC = log R<sub>o</sub> – pH.

As diferentes condições de pré-tratamento com ajuste no FSC apresentaram valores variando entre 0,74 e 0,79, o que produz um valor médio de  $0,76 \pm 0,02$ . Dessa forma, é possível afirmar que estas estratégias produziram substratos com praticamente o mesmo nível de severidade que, portanto, podem ser comparados entre si. Os rendimentos de recuperação mássica após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor estão apresentados na Figura 14. Os experimentos de auto-hidrólise resultaram em menores rendimentos totais de recuperação mássica, provavelmente devido ao emprego de maiores temperaturas (205 e 200 °C nos experimentos BA-2 e BA-3) e maiores tempos de reação (15 e 10,5 min nos experimentos BA-1 e BA-3). Já os rendimentos das frações insolúvel e solúvel em água para os pré-tratamentos de catálise sulfúrica mostraram valores similares ao observado no experimento de catálise fosfórica. As perdas mássicas observadas durante os pré-tratamentos foram atribuídas à volatilização de componentes de baixa massa molar, tais como terpenos, ácidos orgânicos, álcoois alifáticos, derivados de ácidos cinâmicos e coprodutos gerados da desidratação de açúcares, como furfural e HMF (RAMOS, 2003; CAPOBIANGO *et al.*, 2013).



**Figura 14.** Rendimentos de recuperação mássica nas frações insolúvel (material pré-tratado) e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

#### 5.1.1.1 Composição química dos materiais pré-tratados

As frações insolúveis em água (material fibroso) foram caracterizadas quanto a sua composição química e os resultados estão apresentados na Tabela 10. Para todos os materiais pré-tratados, as quantidades percentuais de anidroglicose e de lignina aumentaram em relação aos percentuais observados no material nativo. Este aumento é devido à remoção de grande parte das hemiceluloses, pois essas apresentam baixo grau de polimerização e não possuem regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetíveis à hidrólise ácida. Os componentes das hemiceluloses mais fortemente afetados por essa reação foram a anidroarabinose e os grupamentos acetila, que estão presentes como ramificações da cadeia principal de xilanas e, portanto, apresentam maior acessibilidade química. Mais de 70% das xilanas presentes no bagaço de cana foram hidrolisados durante os pré-tratamentos, com exceção para os experimentos catalisados pelo ácido sulfúrico, nos quais foram empregadas as menores temperaturas de reação (BS-2 e BS-3). Esses substratos apresentaram um maior teor de anidroxilose (6,6 e 5,9%, respectivamente), indicando que mesmo com FSC equivalentes, as xilanas sofreram hidrólise em menor extensão sob essas condições de pré-tratamento, em comparação com os demais substratos produzidos nesse estudo.

#### 5.1.1.2 Comportamento reológico dos materiais pré-tratados

Os efeitos causados no bagaço de cana pelas diferentes condições reacionais de pré-tratamento foram avaliados através da medida de viscosidade complexa. Experimentos oscilatórios foram realizados em pratos paralelos para os teores de sólidos totais de 10 a 20%. Neste tipo de ensaio, a amostra está contida entre duas placas paralelas, cuja distância é denominada de *gap*, e quando placa superior se move, a placa inferior permanece estacionária. Uma força por unidade de área é necessária na placa superior para o movimento, o que resulta em uma tensão de cisalhamento. A Figura 15 mostra o comportamento reológico do material BF como exemplo, pois todos os outros materiais pré-tratados apresentaram comportamentos semelhantes. A diminuição gradual da viscosidade complexa com o aumento da frequência angular indica que essas suspensões exibem comportamento pseudoplástico na faixa testada.

A viscosidade complexa é um parâmetro essencial para caracterizar as propriedades reológicas de suspensões celulósicas. Em geral, valores baixos indicam materiais que são facilmente deformados, enquanto que a deformação é mais difícil em suspensões com altas viscosidades complexas (LOU *et al.*, 2014). Esse mesmo tipo de comportamento já foi observado em trabalhos realizados com palha de milho pré-tratada, como os relatados por VIAMAJALA *et al.* (2009) e LAN *et al.* (2013).

**Tabela 10.** Composição química da fração insolúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Componente	Percentual (%)						
	BF	BA-1	BA-2	BA-3	BS-1	BS-2	BS-3
Anidroglicose <sup>1</sup>	49,7 ± 0,8	50,8 ± 0,6	49,7 ± 0,7	51,5 ± 0,4	49,4 ± 0,6	48,0 ± 0,5	50,0 ± 0,2
Anidroxilose <sup>2</sup>	2,3 ± 0,4	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,1	3,5 ± 0,5	3,3 ± 0,3	6,6 ± 0,5	5,9 ± 0,2
Anidroarabinose <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald	ald	ald
Grupo acetila <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald	ald	ald
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Lignina Total <sup>5</sup>	35,2 ± 0,3	34,5 ± 0,9	34,9 ± 0,5	33,1 ± 0,6	35,2 ± 0,9	33,3 ± 0,9	30,8 ± 0,3
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	3,3 ± 0,1	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,0	3,7 ± 0,0	4,3 ± 0,5	3,6 ± 0,2
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	31,9 ± 0,6	30,7 ± 0,6	31,1 ± 0,1	29,4 ± 0,6	31,5 ± 0,6	29,0 ± 0,4	27,2 ± 0,4
Cinzas	10,3 ± 0,5	10,6 ± 0,2	10,7 ± 0,3	10,5 ± 0,5	10,4 ± 0,4	9,4 ± 0,9	10,9 ± 0,3
Total	98,3	99,7	99,0	99,6	99,4	98,6	99,2

Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup> Presente como componente das β-(1 →4)-D-glucanas (celulose);

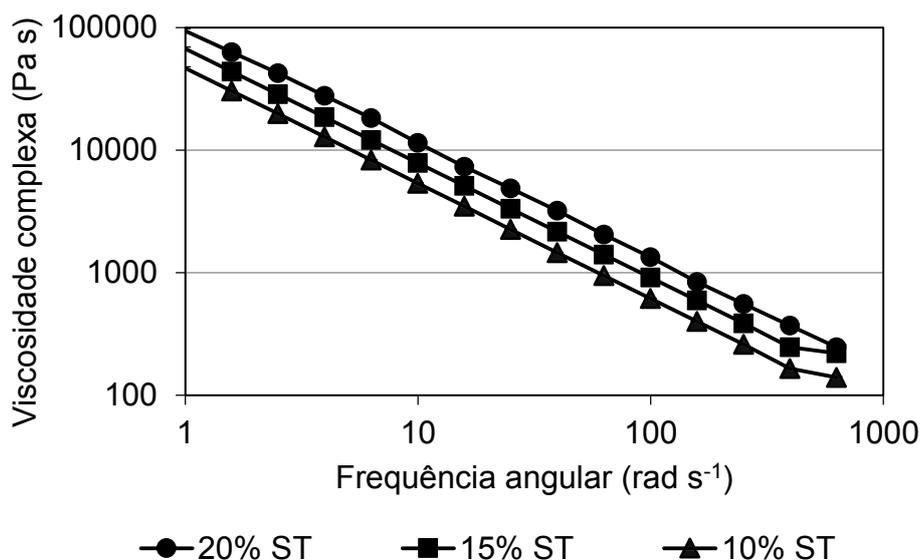
<sup>2</sup> Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup> Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup> Quantificado como furfural;

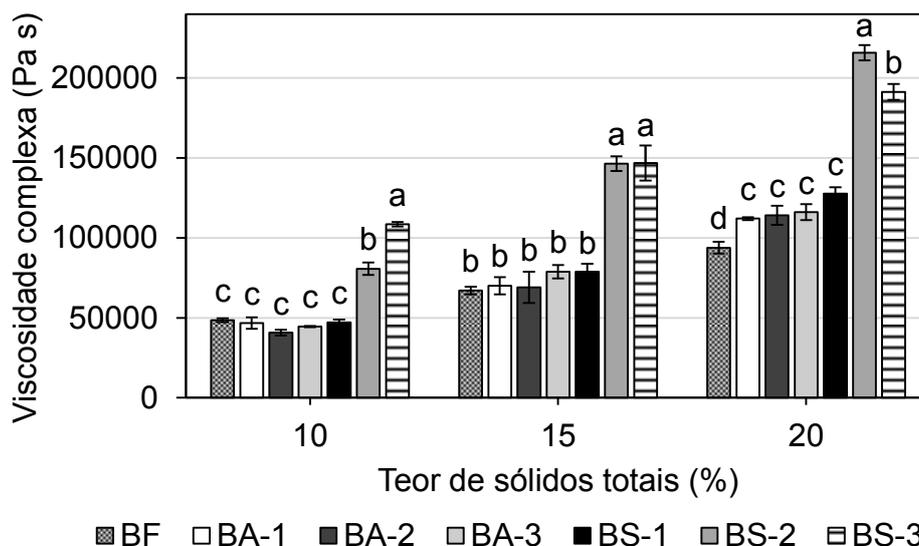
<sup>5</sup> Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído

O mecanismo que explica o comportamento pseudoplástico de suspensões celulósicas é desconhecido, porém, DU *et al.* (2014) e ZHU e ZHUANG (2012) atribuíram o fenômeno de pseudoplasticidade às estruturas altamente emaranhadas da lignocelulose que, com o aumento progressivo do cisalhamento, provocam quebras das ligações que unem essas estruturas e, como consequência, tem-se uma diminuição da viscosidade aparente.



**Figura 15.** Perfil típico de varredura da frequência oscilatória para o material BF (195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco) em diferentes teores de sólidos totais (ST).

A Figura 16 mostra a viscosidade complexa, na frequência angular de 1 rad s<sup>-1</sup>, de suspensões em 10, 15 e 20% de sólidos totais de todos os substratos produzidos nas diferentes condições de pré-tratamento empregadas nesse estudo. Claramente, os materiais BS-2 e BS-3 apresentaram valores maiores de viscosidade complexa, independentemente do teor de sólidos totais ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). Ao serem comparados com o material de referência (BF) a 10% de sólidos totais, o valor da viscosidade complexa foi 1,6 vezes maior para o material BS-2 e cerca de 2 vezes maior para o material BS-3. Provavelmente, a causa para essas observações está relacionada ao menor impacto dos pré-tratamentos BS-2 e BS-3 sobre os componentes macromoleculares do bagaço, gerando materiais que mantiveram boa parte da estrutura associativa de sua parede celular.



**Figura 16.** Viscosidade complexa na frequência angular de  $1 \text{ rad s}^{-1}$  em função do teor de sólidos totais para os materiais pré-tratados pelas diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor. As mesmas letras acima das barras para cada teor de sólidos totais não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF:  $195 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7,5 min e  $9,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido fosfórico de substrato seco; BA-1:  $195 \text{ }^\circ\text{C}$  e 15,0 min; BA-2:  $205 \text{ }^\circ\text{C}$  e 7,5 min; BA-3:  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  e 10,5 min; BS-1:  $195 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7,5 min e  $2,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido sulfúrico de substrato seco; BS-2:  $170 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7,5 min e  $9,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido sulfúrico de substrato seco; BS-3:  $180 \text{ }^\circ\text{C}$ , 4,0 min e  $9,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ácido sulfúrico de substrato seco.

### 5.1.1.3 Cristalinidade do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados

A estrutura macromolecular da celulose é cristalina porque os grupos hidroxilas dos resíduos de anidroglicose formam uma rede de ligações de hidrogênio entre si e com o par de elétrons não ligante do oxigênio do anel (POPESCU *et al.*, 2010). Por isso, a cristalinidade da celulose é amplamente relatada como um dos principais fatores que determinam a suscetibilidade à hidrólise enzimática de materiais pré-tratados (MANSFIELD *et al.*, 1999; ZHANG e LYND, 2004b). A técnica de difratometria de raio-X (DRX) é capaz de revelar nuances dessa estrutura cristalina, embora de maneira muito mais difusa do que a observada para materiais inorgânicos de alta cristalinidade. Isso se dá porque as medidas convencionais de DRX em materiais nativos e pré-tratados são limitadas pela presença de hemiceluloses (estruturas organizadas de maneira mais randomizada) e lignina (comportamento tipicamente amorfo), cujas propriedades afetam a cristalinidade do material como um todo (KIM e HOLTZAPPLE, 2006; ZHU *et al.*, 2008).

Os difratogramas de DRX do bagaço de cana nativo ou derivado dos materiais pré-tratados a vapor apresentou picos em torno de 22,2° e 16,0° de 2 $\theta$ , atribuídos à celulose cristalina do tipo I. O vale em torno de 18,5° de 2 $\theta$  é atribuído ao componente amorfo, que incluem frações de celulose amorfa, hemiceluloses e lignina. Baseado nessas considerações, os índices de cristalinidade (ICr) dos materiais nativos e pré-tratados foram determinadas nos difratogramas segundo o procedimento descrito por SEGAL *et al.* (1959) e os resultados se encontram na Tabela 11. O ICr dos materiais pré-tratados variou de 62,6 a 70,1%, enquanto que o bagaço de cana nativo apresentou um valor de 61,9%. Esses aumentos aparentes do ICr nos materiais pré-tratados estão relacionados principalmente com a remoção das hemiceluloses e por isso não refletem as mudanças causadas na cristalinidade da celulose pelo processo de explosão a vapor.

**Tabela 11.** Índice de cristalinidade (ICr) dos materiais pré-tratados e após o procedimento de deslignificação em comparação com o bagaço de cana nativo.

Experimento	Índice de cristalinidade (%)	
	Material pré-tratado	Material pré-tratado e deslignificado <sup>1</sup>
BF	67,8	82,9
BA-1	66,9	83,4
BA-2	69,7	87,9
BA-3	69,4	85,8
BS-1	70,1	83,2
BS-2	64,9	78,9
BS-3	62,6	78,8
Nativo	61,9	73,1

Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

<sup>1</sup>Referente a fração de hemicelulose dos materiais pré-tratados e do bagaço de cana nativo.

MOSIER *et al.* (2005) relataram que pré-tratamentos hidrotérmicos, tais como a explosão a vapor, podem alterar a estrutura cristalina da celulose através da quebra das ligações de hidrogênio inter e intramoleculares que existem entre as cadeias de celulose, mas devido à significativa remoção das hemiceluloses, esse resultado é mascarado por um aumento aparente do ICr da biomassa. Além disso, todos os materiais pré-tratados apresentaram valores de lignina superiores a 30% em suas composições químicas (Tabela 10). Assim, para facilitar a observação de mudanças na cristalinidade da celulose, a deslignificação oxidativa desses materiais foi aplicada para

produzir as suas respectivas frações holocelulósicas. Os ICr dos materiais celulósicos deslignificados (holocelulose) estão mostrados na Tabela 11.

As holoceluloses preparadas a partir dos materiais pré-tratados apresentaram mais de 80% de glucanas em sua composição e teores de lignina inferiores a 6%, enquanto que as quantidades percentuais de anidroxilose foram proporcionais aos valores encontrados nos materiais pré-tratados (Tabela 12).

A partir da preparação das frações holocelulósicas, os resultados de DRX puderam ser interpretados em relação ao componente celulósico, principalmente porque o método de deslignificação empregado nesse estudo tem a característica de preservar a estrutura dos carboidratos (FENGEL e WEGENER, 1989). O bagaço de cana nativo deslignificado apresentou um ICr menor do que todos os materiais pré-tratados, entretanto a sua composição química revelou a presença de 25% de hemiceluloses e 6% de lignina, sendo somente 58,2% correspondente a glucanas (Tabela 12). De modo a diminuir o efeito das hemiceluloses na determinação do ICr, estas foram removidas por extração alcalina e a correspondente fração de  $\alpha$ -celulose apresentou 90% de glucanas, 5,7% de hemiceluloses e 2,6% de lignina. Surpreendentemente, o ICr da  $\alpha$ -celulose oriunda do bagaço de cana nativo foi de somente 67,8%, sugerindo que celulose amorfa foi parcialmente removida durante o pré-tratamento, uma vez que todos os outros materiais produziram valores de ICr maiores que 78%. Cabe destacar que não houve mudança da celulose I para celulose II após os procedimentos de obtenção da holocelulose e da  $\alpha$ -celulose para todas as amostras. Como exemplo, na Figura A1.1 (página 200) é possível verificar o mesmo padrão de DRX para a amostra de bagaço de cana nativo. As condições de pré-tratamento realizadas em baixas temperaturas (BS-2 e BS-3) resultaram em frações de holoceluloses com valores de ICr inferiores aos obtidos para os outros materiais (78,9 e 78,8%, respectivamente). Isto pode ser parcialmente explicado pelo alto conteúdo de hemiceluloses (xilanas) de seus respectivos substratos pré-tratados a vapor. Assim, as frações holocelulósicas não revelaram mudanças na cristalinidade da celulose que, caso significativas, poderiam ser visualizadas nas frações  $\alpha$ -celulósicas correspondentes, já que nelas a interferência das hemiceluloses poderia ser diminuída a níveis negligenciáveis.

**Tabela 12.** Composição química da holocelulose derivada do material nativo e das frações insolúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Componente	Percentual (%)							
	Nativo	BF	BA-1	BA-2	BA-3	BS-1	BS-2	BS-3
Anidroglicose <sup>1</sup>	58,2 ± 0,8	85,9 ± 0,3	87,4 ± 0,5	89,1 ± 0,4	86,7 ± 0,3	88,2 ± 0,6	81,0 ± 0,0	81,6 ± 0,7
Anidroxilose <sup>2</sup>	20,5 ± 0,4	6,8 ± 0,6	5,0 ± 0,1	6,1 ± 0,3	7,6 ± 0,2	9,5 ± 0,2	13,8 ± 0,7	13,0 ± 0,4
Anidroarabinose <sup>2</sup>	1,2 ± 0,0	ald						
Grupo acetila <sup>2</sup>	3,2 ± 0,2	ald						
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	2,4 ± 0,3	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
Lignina Total <sup>5</sup>	6,0 ± 0,5	3,9 ± 0,3	3,8 ± 0,1	2,8 ± 0,0	4,8 ± 0,1	2,3 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,0 ± 0,1
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	0,1 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	5,9 ± 0,5	3,0 ± 0,5	2,6 ± 0,1	1,6 ± 0,0	3,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,0 ± 0,1
Total	92,3	97,6	96,9	98,6	99,7	100,9	99,2	98,5

Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup> Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup> Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

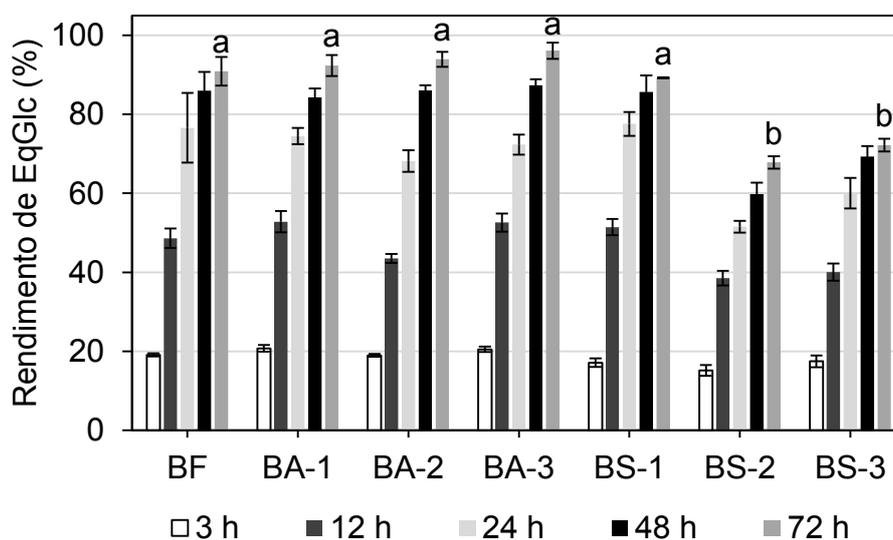
<sup>3</sup> Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup> Quantificado como furfural;

<sup>5</sup> Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

#### 5.1.1.4 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados

A eficiência dos pré-tratamentos foi avaliada através do procedimento de hidrólise enzimática proposto pelo NREL (SELIG *et al.*, 2008). Nesse ensaio, o emprego de um baixo teor de sólidos totais e de uma alta carga enzimática permite avaliar a acessibilidade do substrato. Os resultados obtidos durante a hidrólise enzimática estão mostrados na Figura 17, onde é possível observar valores de rendimento de EqGlc significativamente menores em 72 h de reação para os materiais BS-2 e BS-3 ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). As demais condições reacionais de pré-tratamento revelaram valores estatisticamente equivalentes de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Esse resultado, em torno de 90% de rendimento de EqGlc, revelou que os substratos produzidos sob um mesmo CSF (exceto BS-2 e BS-3) apresentaram acessibilidade equivalente à hidrólise enzimática.

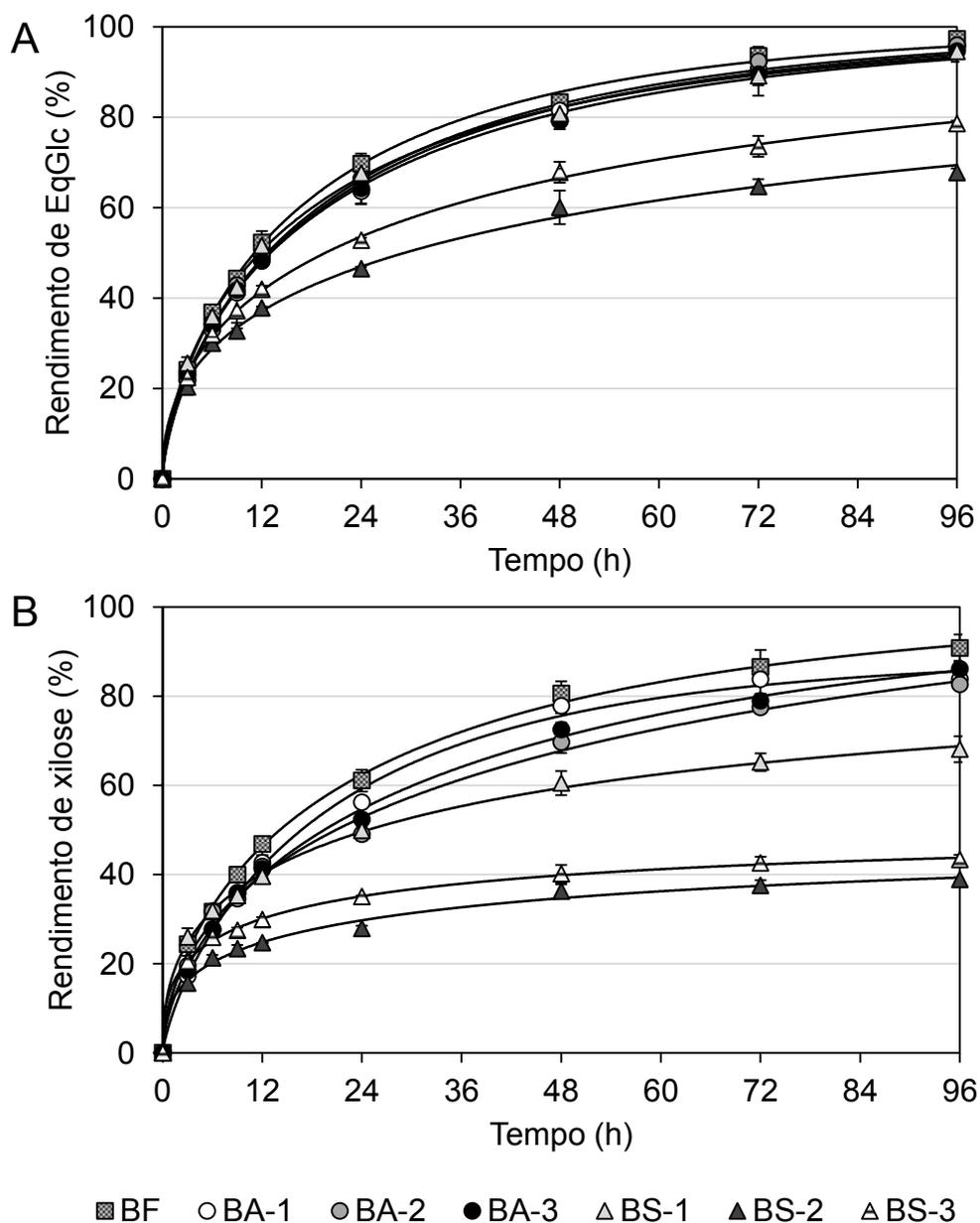


**Figura 17.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições de explosão a vapor descritas na Tabela 1. Condições da hidrólise enzimática: 2% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 60 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico  $g^{-1}$  de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco.

Provavelmente, o menor desempenho na hidrólise dos materiais catalisados pelo ácido sulfúrico se deve às menores temperaturas utilizadas durante o pré-tratamento (170 para BS-2 e 180 °C para BS-3), que produziram substratos com maior teor de xilanas (Tabela 10) e um efeito menos pronunciado da explosão a vapor sobre a estrutura da parede celular e a morfologia das fibras. Apesar disso, a catálise sulfúrica promoveu um aumento de cerca de 6 vezes na acessibilidade do bagaço de cana nativo, que apresentou apenas 9,9% de rendimento de EqGlc após 72 h de hidrólise enzimática.

Ensaio de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados foram também realizados em uma condição mais realística, em que se buscou elevar o teor de sólidos totais e diminuir a carga enzimática empregada no ensaio. O perfil de hidrólise de glucanas e xilanas ajustado pelo modelo cinético fractal encontram-se na Figura 18. Como já observado na determinação de acessibilidade à hidrólise de acordo com o procedimento proposto pelo NREL, os rendimentos de EqGlc para todos os materiais produzidos sob diferentes condições de explosão a vapor foram similares, exceto para os materiais BS-2 e BS-3 (Figura 18A). Além disso, foi observada uma diminuição da velocidade da reação após 12 a 24 h de hidrólise. Esta diminuição é ocasionada por diversos fatores, como a maior recalcitrância da celulose remanescente (mais cristalina), o acúmulo dos produtos no meio de reação (glucose e celobiose) e a diminuição da atividade enzimática devido aos efeitos de cisalhamento e desnaturação térmica, assim como a adsorção não-produtiva das enzimas sobre fragmentos de complexos lignina-carboidrato, também motivado pelo acúmulo de lignina no meio reacional (ARANTES e SADDLER, 2011).

Altas concentrações de açúcares (glucose e celobiose) foram obtidas após 96 h de reação, que foram em torno de 80 g L<sup>-1</sup> para os materiais BF, BA-1, BA-2, BA-3 e BS-1, 54 g L<sup>-1</sup> para o BS-2 e 66 g L<sup>-1</sup> para o BS-3 (Figura 18B). A concentração de celobiose, utilizada no cálculo de rendimento de EqGlc, representou menos de 3,0% do total para todos os materiais pré-tratados. Essa observação revelou que o complexo enzimático Cellic CTec3 possui atividade β-glucosidásica suficiente para manter relativamente baixa a concentração de celobiose durante toda a hidrólise enzimática e, assim, reduzir os efeitos de inibição das celobioidrolases. Embora não existam estudos de avaliação dos níveis de inibição de celobiose para o preparado enzimático utilizado nesse trabalho, TEUGJAS e VÄLJAMÄE (2013) observaram que celobioidrolases de *Trichoderma reesei* apresentaram inibição com concentrações de celobiose acima de 2,6 mmol L<sup>-1</sup> ou 0,9 g L<sup>-1</sup>. Essas concentrações não são necessariamente aplicáveis à Cellic CTec3, mas sugerem que esse complexo necessita de suplementação com β-glucosidases para evitar a inibição por celobiose para hidrólise realizadas em altos teores de sólidos totais.



**Figura 18.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições de explosão a vapor. Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco.

A análise da cinética fractal, aplicada aos dados experimentais de hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados, forneceu os ajustes apresentados na Figura 18. Além disso, essa análise permitiu a obtenção dos parâmetros  $k$  (constante de velocidade) e  $h$  (coeficiente fractal), assim como os valores de  $R^2$  (coeficiente de determinação) que podem ser visualizados na Tabela 13. O parâmetro fractal  $h$  revela os múltiplos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura e a acessibilidade do substrato à ação enzimática, de modo que baixos valores de  $h$  caracterizam substratos mais acessíveis. Os altos valores de  $R^2$  para todos os experimentos de hidrólise revelaram a habilidade do modelo fractal em descrever a liberação de EqGlc e xilose em função do tempo. Na hidrólise das glucanas, os materiais pré-tratados pelas condições de auto-hidrólise (BA-1, BA-2 e BA-3) mostraram valores de  $k$  e  $h$  similares em comparação com o substrato de referência (BF), uma vez que o desvio padrão obtido para esses parâmetros foi em torno de 0,01, indicando que o ajuste dos FSC produziu substratos com mesma acessibilidade enzimática. Dos materiais produzidos pelas diferentes condições de catálise sulfúrica, apenas o material BS-1 apresentou um perfil de hidrólise das glucanas e valores de  $k$  e  $h$  similares ao material BF. Os materiais BS-2 e BS-3 revelaram menores rendimentos de EqGlc, alcançando em 96 h apenas 67,8 e 78,6%, respectivamente. Apesar disso, os valores da constante  $k$  foram semelhantes aos dos demais materiais, o que demonstra a mesma velocidade de reação nos períodos iniciais de hidrólise. Uma hipótese para esta observação é a preservação de uma certa quantidade de celulose amorfa nos materiais BS-2 e BS-3, que é amplamente reconhecida por ser mais acessível à hidrólise enzimática. Por outro lado, os menores rendimentos de EqGlc observados após 6 h de reação refletiram em valores significativamente maiores do parâmetro  $h$ , fato que está associado ao pior desempenho desses substratos na hidrólise enzimática.

Ao contrário das glucanas, o rendimento de xilose apresentou maiores diferenças entre os diferentes materiais pré-tratados, como demonstrado na Figura 18B. Em geral, os materiais produzidos nas condições de auto-hidrólise resultaram em rendimentos de xilose similares ao material BF, que conseqüentemente revelaram valores de  $k$  e  $h$  similares (Tabela 13). Contudo, um desempenho inesperadamente menor na hidrólise das xilanas foi obtido para o material BS-1, que alcançou um rendimento de apenas 68,1%. Da mesma forma, os materiais BS-2 e BS-3 produziram rendimentos de xilose ainda menores (cerca de 40%), que foram refletidos pelos maiores valores de  $h$  pela análise cinética fractal. Tais resultados foram provavelmente ocasionados por um menor efeito de desestruturação das fibras após os pré-tratamentos, que proporcionaram menores rendimentos de hidrólise das glucanas e xilanas presentes nesses materiais.

**Tabela 13.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática em agitador orbital dos diferentes materiais produzidos por explosão a vapor.

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>
BF	0,128	0,298	0,999	0,124	0,348	0,998
BA-1	0,117	0,305	0,999	0,100	0,327	0,996
BA-2	0,117	0,298	0,997	0,120	0,416	0,993
BA-3	0,124	0,329	0,999	0,105	0,362	0,997
BS-1	0,140	0,352	0,999	0,187	0,597	0,998
BS-2	0,151	0,549	0,996	0,137	0,711	0,991
BS-3	0,151	0,488	0,999	0,186	0,746	0,999

Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

#### 5.1.1.5 Aumento de escala da hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados

O aumento de escala da hidrólise enzimática foi demonstrado pela comparação de experimentos realizados em agitador orbital (50 mL) e em biorreator de bancada (1000 mL). Em princípio, o biorreator forneceu uma distribuição mais uniforme da temperatura e do substrato fibroso no meio reacional devido ao uso de um sistema de agitação múltipla, composto pela sequência de uma hélice naval com *downflow*, quebradores de viscosidade, um impelidor helicoidal e um impelidor de fundo. No entanto, os resultados obtidos demonstraram que, na maioria dos casos, a hidrólise das glucanas foi apenas ligeiramente melhorada pelo uso do biorreator (Figura A1.2 até A1.8, páginas 201-207), indicando que o emprego de 15% de sólidos totais não apresenta limitações pronunciadas nas transferências de massa e de calor. O maior efeito da utilização do biorreator foi para os experimentos BS-2 e BS-3, que apresentaram maiores rendimentos de EqGlc nos estágios iniciais da hidrólise das glucanas, mas ao final do período reacional, os rendimentos foram equivalentes ao uso do agitador orbital. Os parâmetros fractais obtidos para a hidrólise de glucanas e xilanas no biorreator encontram-se apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática em bioreator de bancada dos diferentes materiais produzidos neste estudo.

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$
BF	0,140	0,338	0,998	0,184	0,428	0,995
BA-1	0,119	0,275	0,999	0,159	0,410	0,992
BA-2	0,117	0,251	0,999	0,149	0,388	0,996
BA-3	0,120	0,282	0,997	0,130	0,378	0,993
BS-1	0,127	0,340	0,993	0,208	0,525	0,997
BS-2	0,278	0,681	0,987	0,184	0,693	0,995
BS-3	0,253	0,629	0,992	0,199	0,693	0,997

Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico  $g^{-1}$  de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco.

No rendimento de EqGlc, valores similares foram obtidos ao comparar com os experimentos realizados sob agitação orbital, exceto para os materiais BS-2 e BS-3. O maior valor de  $k$  para esses dois experimentos confirmam a presença de celulose amorfa sendo hidrolisada em uma maior velocidade nos estágios iniciais da reação. De fato, os materiais BS-2 e BS-3 apresentaram menores valores de ICr do que os derivados de outras condições, mesmo após a etapa de deslignificação (Tabela 11), o que pode ser indicativo da presença de um material celulósico com maior caráter amorfo. Apesar disso, nenhuma diferença significativa foi observada ( $p > 0,05$  no teste de Tukey) ao comparar o rendimento de EqGlc após 96 h de reação para ambos os sistemas reacionais (Tabela 15).

Em geral, os parâmetros fractais para a hidrólise das xilanas no biorreator foram relativamente similares aos obtidos no agitador orbital (Tabela 14). No entanto, o perfil de hidrólise de xilanas dos materiais produzidos pela catálise sulfúrica (BS) foi ligeiramente melhor (Figura A1.6, A1.7 e A1.8, páginas 205-207), resultando em rendimentos de xilose 10% superiores aos obtidos em agitador orbital após 96 h de hidrólise (Tabela 15). Provavelmente, esse efeito foi devido à eficiência de agitação mecânica no biorreator, que forneceu uma melhor transferência de massa e calor para a hidrólise das xilanas quando comparado com a agitação orbital.

**Tabela 15.** Rendimentos de açúcares obtidos após 96 h de hidrólise enzimática por agitação orbital e pelo biorreator do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor.

Experimento	Rendimento de EqGlc (%) <sup>1</sup>		Rendimento de xilose (%) <sup>1</sup>	
	Biorreator	Agitador orbital	Biorreator	Agitador orbital
BF	93,1 ± 2,8 <sup>a</sup>	97,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	92,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	90,8 ± 3,1 <sup>a</sup>
BA-1	97,6 ± 3,1 <sup>a</sup>	95,3 ± 0,7 <sup>a</sup>	90,8 ± 1,5 <sup>a</sup>	83,8 ± 3,4 <sup>a</sup>
BA-2	95,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	96,0 ± 2,3 <sup>a</sup>	91,0 ± 1,7 <sup>a</sup>	82,6 ± 0,4 <sup>b</sup>
BA-3	94,1 ± 2,0 <sup>a</sup>	94,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	88,5 ± 4,2 <sup>a</sup>	86,1 ± 1,8 <sup>a</sup>
BS-1	89,8 ± 4,2 <sup>a</sup>	94,6 ± 2,3 <sup>a</sup>	80,5 ± 2,7 <sup>a</sup>	68,1 ± 2,9 <sup>b</sup>
BS-2	67,3 ± 1,1 <sup>a</sup>	67,8 ± 0,9 <sup>a</sup>	51,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	38,9 ± 0,5 <sup>b</sup>
BS-3	70,9 ± 2,9 <sup>a</sup>	78,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	55,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	43,4 ± 1,0 <sup>b</sup>

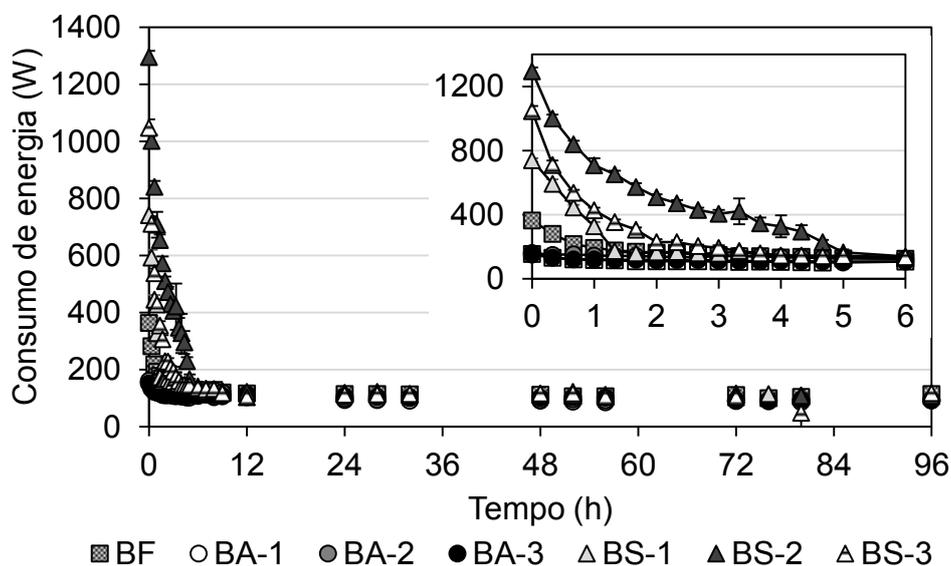
Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

<sup>1</sup>Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). Valores médios com a mesma letra na mesma linha não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O efeito do pré-tratamento sobre a hidrólise enzimática de substratos celulósicos é normalmente discutida em relação ao rendimento de liberação de açúcares solúveis no meio de reação, como celobiose, glucose e xilose (CARA *et al.*, 2008; BATALHA *et al.*, 2015; NEVES *et al.*, 2016). No entanto, outros fatores como o consumo de energia requerido para a agitação de suspensões de alta viscosidade e o tempo necessário para atingir altos rendimentos de hidrólise também são extremamente importantes para comprovar a viabilidade técnica e econômica do processo. Por exemplo, a determinação do consumo de energia durante a etapa de hidrólise é essencial para demonstrar a possibilidade de aumento de escala, principalmente nos casos em que são utilizados altos teores de sólidos totais (DASARI *et al.*, 2008).

A Figura 19 demonstra o consumo de energia observado durante a hidrólise enzimática no biorreator de todos os materiais produzidos por explosão a vapor. Os três materiais produzidos por auto-hidrólise (BA) necessitaram cerca de 156 W nos estágios iniciais de hidrólise, enquanto que o material BF consumiu 364 W. Os maiores consumos de energia foram observados para os materiais oriundos da catálise sulfúrica, que corresponderam a 740, 1296 e 1047 W para BS-1, BS-2 e BS-3, respectivamente. Assim, o menor consumo de energia, observado na hidrólise de materiais produzidos por auto-hidrólise, está relacionado à utilização de maiores temperaturas e tempos de residência no reator durante o pré-tratamento, o que resultou em materiais pré-tratados mais homogêneo e com menor incidência de agregados fibrosos.

O consumo de energia para agitação do meio após 12 h de hidrólise foi cerca de 100 W para todos os materiais pré-tratados, porém, o tempo necessário para alcançar o estado de menor consumo de energia não foi o mesmo. Os substratos BA alcançaram este valor em menos de 3 h, sendo que o torque necessário para agitação da suspensão já foi baixo desde início da reação, quando comparados aos demais materiais pré-tratados. Para os materiais produzidos por catálise sulfurica em temperaturas menores (BS-2 e BS-3), a hidrólise a 15% de sólidos totais necessitou um consumo de energia para agitação muito maior e o tempo necessário para alcançar valores em torno de 100 W foi de aproximadamente 6 h, como demonstrado pela expansão da Figura 19. Nesse tempo reacional, o torque necessário para agitação do meio foi reduzido em cerca de 90% para os materiais BS-2 e BS-3, enquanto que essa redução foi de aproximadamente 82% para o material BS-1.

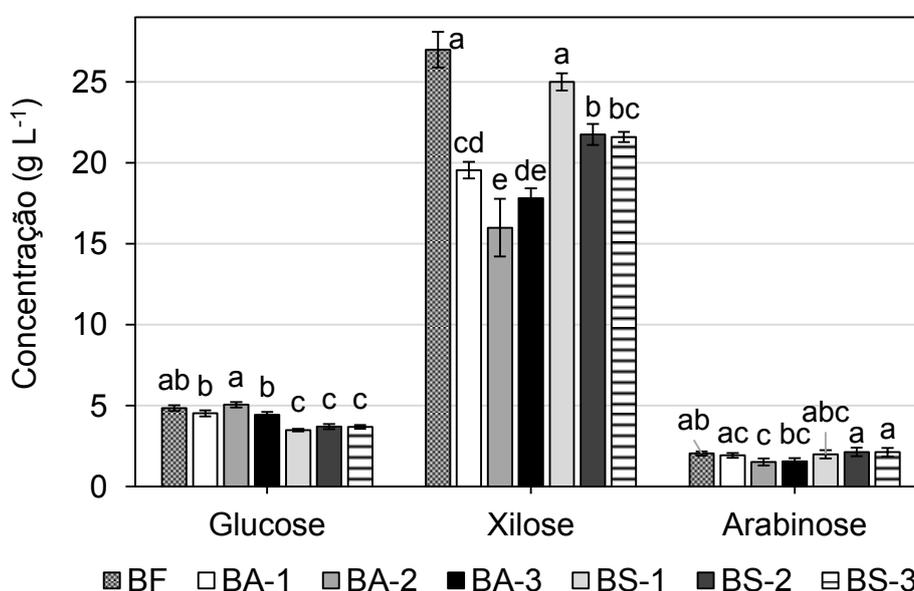


**Figura 19.** Consumo de energia durante a hidrólise enzimática em 15% de sólidos totais do bagaço de cana pré-tratado a vapor no biorreator de bancada. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

#### 5.1.1.6 Composição química das frações solúveis em água

As frações solúveis em água derivadas das diversas condições de pré-tratamento foram caracterizadas quanto às suas respectivas composições em carboidratos, derivados furânicos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos. É importante

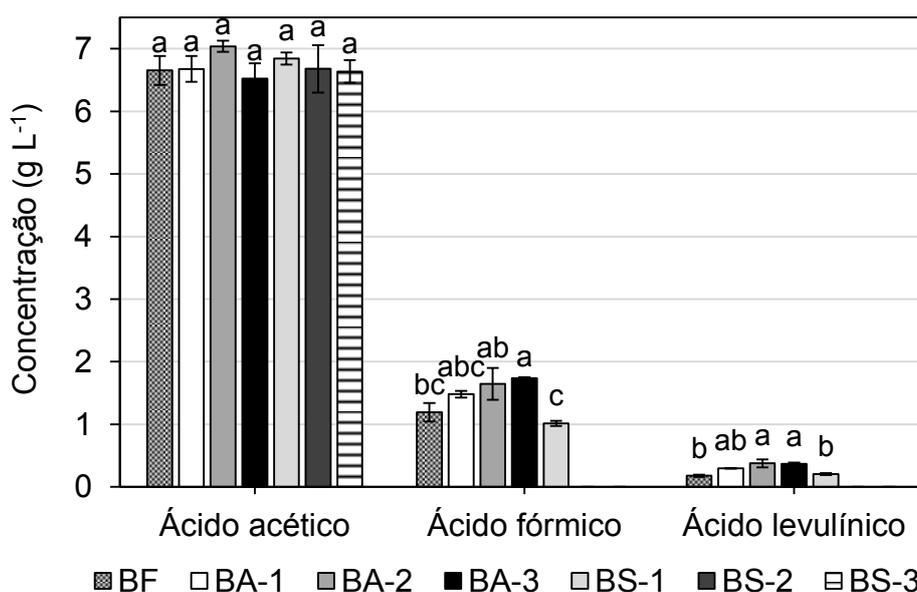
mencionar que os carboidratos foram quantificados após reação de pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído, uma vez que estavam majoritariamente presentes no meio como oligossacarídeos. Os volumes das frações solúveis em água após os pré-tratamentos variaram entre 1,9 e 2,8 L, portanto, para tornar comparáveis as concentrações dos analitos presentes nestas frações, todos os resultados foram normalizados para 2 L. A xilose foi o principal componente presente nas frações solúveis em água, alcançando valores maiores (cerca de 25 g L<sup>-1</sup>) para os materiais BF e BS-1 ( $p < 0,05$  no teste de Tukey) conforme mostra a Figura 20. Por outro lado, os experimentos de auto-hidrólise realizados nas maiores temperaturas (205 °C para BA-2 e 200 °C para BA-3), resultaram em concentrações de xilose significativamente menores, provavelmente devido a reações de degradação tais como a sua desidratação a furfural.



**Figura 20.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de carboidratos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

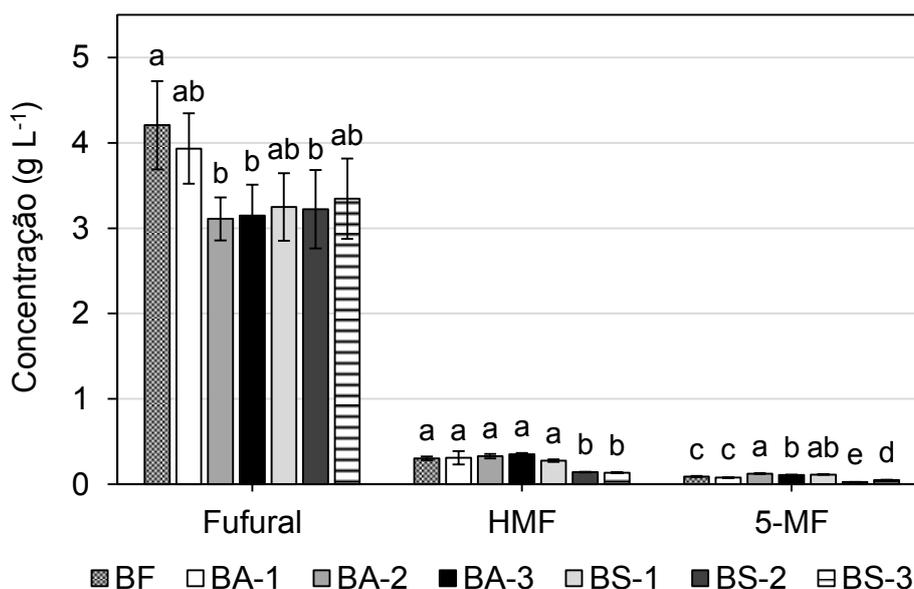
Os ácidos alifáticos quantificados nas frações solúveis em água foram os ácidos acético, fórmico e levulínico. Na Figura 21 é possível observar que o ácido acético não variou significativamente entre os pré-tratamentos ( $p > 0,05$  no teste de Tukey), indicando que as condições reacionais empregadas foram suficientes para promover as

desacetilação praticamente total das hemiceluloses. Diferentemente do ácido acético, que é formado pela hidrólise de hemiceluloses acetiladas, os ácidos fórmico e levulínico são produzidos pela reação de reidratação do HMF. Os maiores acúmulos desses ácidos foram observados nos experimentos de auto-hidrólise que foram realizados em temperaturas maiores (BA-2 e BA-3), enquanto que nos experimentos catalisados pelo ácido sulfúrico em temperaturas menores (BS-2 e BS-3), tais ácidos se encontravam abaixo do limite de detecção do método.



**Figura 21.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de ácidos alifáticos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

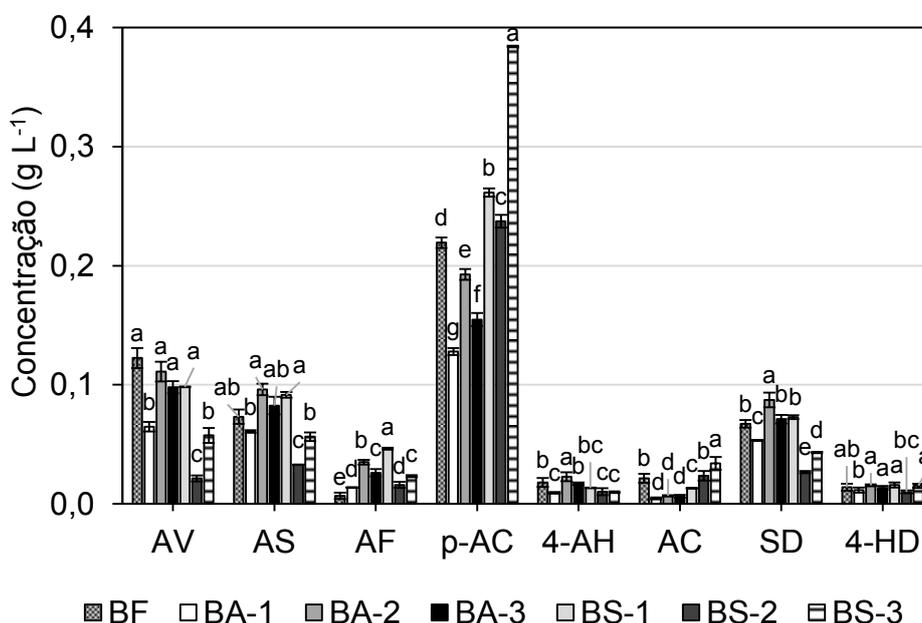
Em relação aos compostos furânicos quantificados (Figura 22), o furfural se apresentou em maiores concentrações, que foram de cerca de 4 g L<sup>-1</sup> nos experimentos BF e BA-1. Independentemente da utilização de um catalisador ácido exógeno, o acúmulo de HMF e 5-MF foi dependente da temperatura empregada no pré-tratamento. Por exemplo, os ensaios realizados em menores temperaturas (BS-2 e BS-3) apresentaram as menores concentrações desses produtos de desidratação ( $p < 0,05$  no teste de Tukey).



**Figura 22.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de derivados furânicos. HMF: 5-(hidroximetil)-furfural, 5-MF: 5-metil-2-furfural. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $\text{g}^{-1}$  de substrato seco.

Os diversos compostos fenólicos caracterizados por CLAE foram formados a partir das reações de hidrólise, clivagem homolítica ou oxidação de subestruturas da lignina (Figura 23). As reações de hidrólise da lignina ocorrem principalmente pela quebra de ligações aril-éter dos tipos  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 existentes em sua estrutura, promovendo a liberação de subestruturas de baixa massa molar e de ácidos fenólicos. Além da hidrólise, a clivagem homolítica das ligações aril-éter também resulta na liberação de ácidos fenólicos. Em geral, esses compostos foram encontrados em baixas concentrações (menores que  $0,4 \text{ g L}^{-1}$ ), com o ácido *p*-cumárico presente em maior concentração em todos os experimentos. A concentração desse ácido foi significativamente maior quando o pré-tratamento foi catalisado por ácido sulfúrico ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), indicando que o emprego de um ácido mais forte durante o pré-tratamento favoreceu a reação de hidrólise dos grupamentos *p*-hidroxifenila da estrutura da lignina, com a subsequente liberação de ácido *p*-cumárico no meio. Vale ressaltar que o ácido *p*-cumárico está presente na rota biossintética da lignina, sendo derivado

da oxidação do álcool *p*-cumarílico, que atua como precursor monomérico da estrutura da lignina juntamente com os álcoois sinapílico e coniferílico.



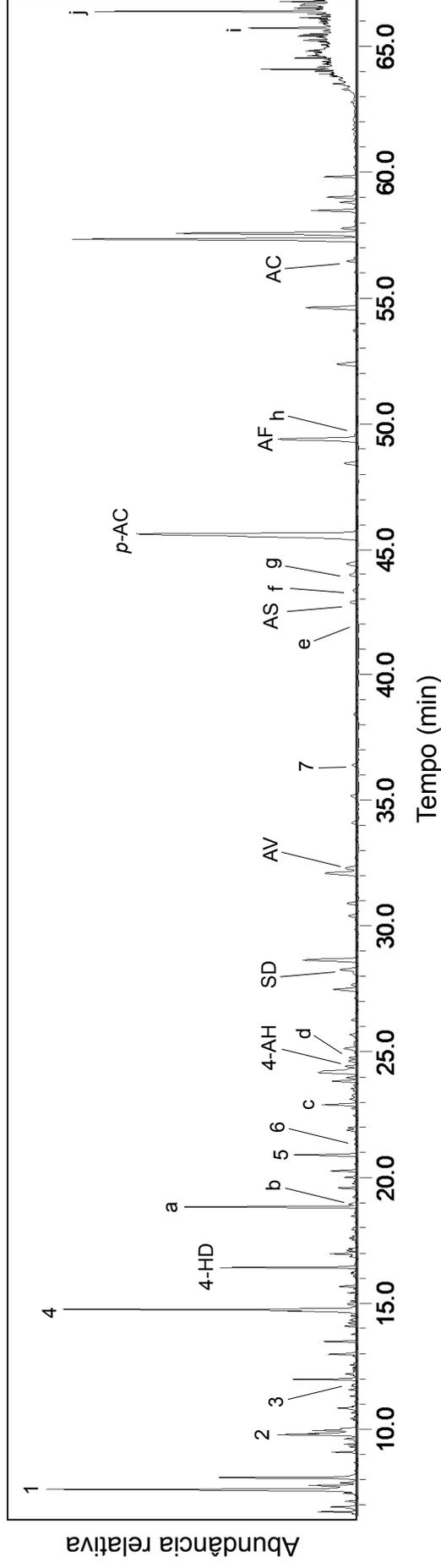
**Figura 23.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de compostos fenólicos. AV: ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico), AS: ácido sirínigico (ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico), AF: ácido ferúlico (ácido (E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico), *p*-AC: ácido *p*-cumárico (ácido (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoico), 4-AH: ácido 4-hidroxibenzóico, AC: ácido cafeico (ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoico), SD: siringaldeído (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldeído), 4-HD: 4-hidroxibenzaldeído. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

No conceito da biorrefinaria, as frações solúveis em água derivadas dos pré-tratamentos devem ser utilizadas para produzir biocombustíveis ou produtos de valor agregado, geralmente pela fermentação de açúcares como as pentoses. No entanto, subprodutos hidrossolúveis como produtos de degradação de carboidratos (ácidos alifáticos e furanos) e derivados de lignina (compostos fenólicos) são geralmente prejudiciais ao desempenho dos microrganismos que executam a fermentação. LARSSON *et al.* (1999) verificaram que os ácidos acético, fórmico e levulínico,

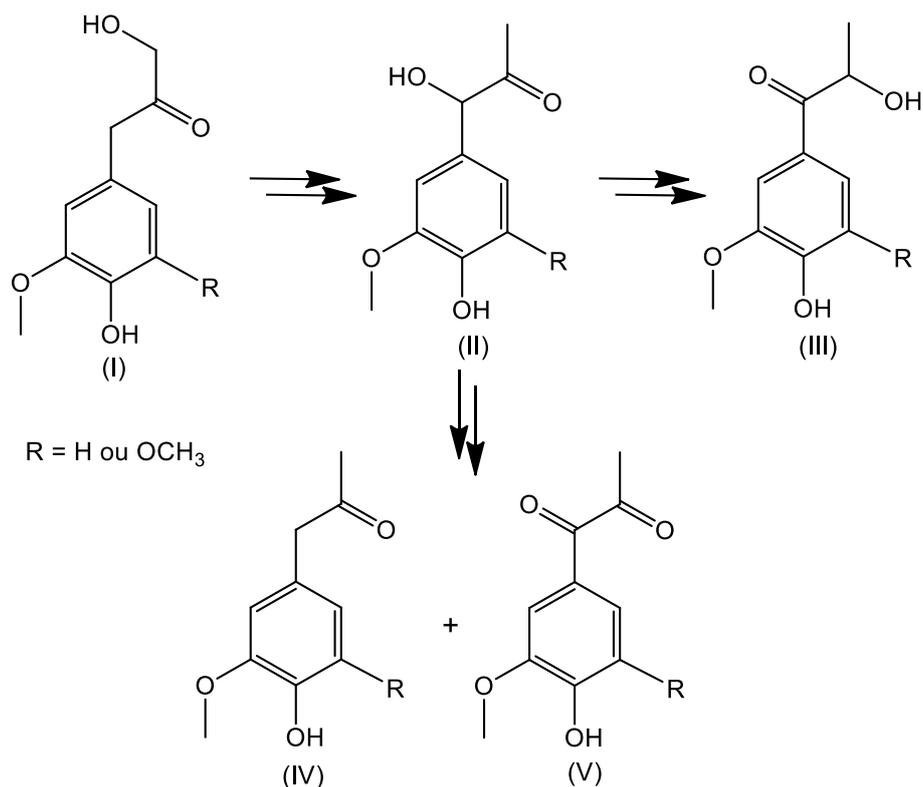
presentes nas frações solúveis em água do pré-tratamento ácido da madeira de *Picea abies*, foram inibitórios para *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 100 mmol L<sup>-1</sup> (6,0, 4,6 e 11,6 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). Portanto, as concentrações destes ácidos nas frações solúveis em água derivadas das diferentes condições de explosão a vapor (Figura 21), somente o ácido acético, que apresentou uma concentração média de 6,7 g L<sup>-1</sup>, poderia exibir uma ligeira inibição na fermentação com *S. cerevisiae*. Por outro lado, YLITERVO *et al.* (2014) mostraram que *S. cerevisiae* foi capaz de produzir etanol a partir de 25 g L<sup>-1</sup> de sacarose em taxas de 5-6 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> na presença de até 15 g L<sup>-1</sup> de ácido acético.

Mesmo em concentrações muito inferiores a outros componentes como o furfural e o ácido acético, compostos fenólicos são altamente inibitórios para *S. cerevisiae* e isso está associado aos seus efeitos na funcionalidade da membrana celular microbiana (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000). Por exemplo, o efeito inibitório do ácido ferúlico pode ser duas ordens de grandeza superior ao de ácidos alifáticos (ácidos acético, fórmico e levulínico). LARSSON *et al.* (2000) observaram que o ácido ferúlico foi altamente inibidor para *S. cerevisiae* em concentração de apenas 0,20 g L<sup>-1</sup> (1,0 mmol L<sup>-1</sup>). Além disso, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico são altamente inibitórios para as  $\beta$ -glucosidases fúngicas, enquanto que o seu efeito sobre a atividade total das celulasas é muito menos pronunciado (XIMENES *et al.*, 2011).

Para confirmar a presença dos compostos fenólicos acima mencionados, as frações solúveis em água foram trimetilsililadas e analisadas por cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). Todas as frações solúveis em água derivadas dos pré-tratamentos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes e, por esta razão, a Figura 24 apresenta apenas o cromatograma obtido para a condição de catálise fosfórica (BF). Os compostos identificados por CLAE na Figura 23 foram confirmados pela análise em CG-EM através da comparação com os tempos de retenção e espectros de massa de padrões comerciais. Além disso, outros componentes foram identificados através da comparação com os espectros de massas disponíveis no banco de dados NIST. No entanto, em vários casos, os espectros resultantes de compostos abundantes no cromatograma não se assemelharam a nenhum espectro da NIST. Assim, trabalhos da literatura foram utilizados para propor prováveis estruturas, como as cetonas de Hibbert (fenilpropanonas) e seus derivados (feniletanonas). Após a descoberta desses compostos em 1940 por Harold Hibbert, vários estudos demonstraram a sua presença em frações solúveis em água derivadas de pré-tratamentos ácidos (MITCHELL *et al.*, 2014; MILES-BARRETT *et al.*, 2016). Alguns exemplos de cetonas de Hibbert são mostrados na Figura 25.

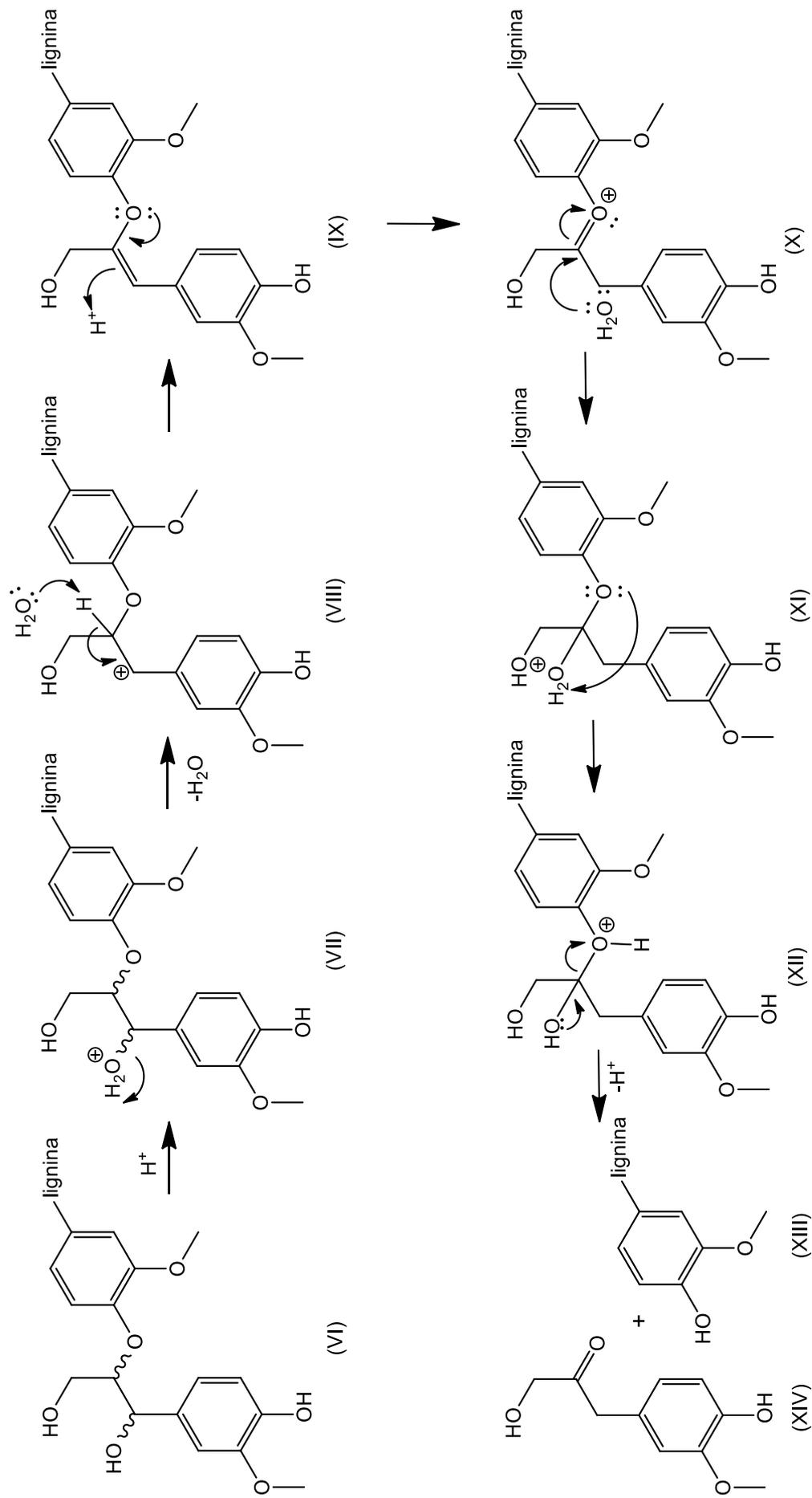


**Figura 24.** Cromatograma da fração solúvel em água trimetilsililada resultante do pré-tratamento catalisado por ácido fosfórico (BF). Os compostos trimetilsililados foram derivados do: **1**: ácido 2-hidroxi-propanoico (ácido láctico); **2**: ácido furoico; **3**: ácido benzoico; **4**: 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina); **5**: ácido 5-hidroxi-metil-2-furoico; **6**: ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (ácido protocatecuico); **a**: 1-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)propan-2-ona; **b**: 4-propilfenol; **c**: 4-(1-hidroxietil)-2-metoxifenol; **d**: 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; **e**: 1-hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; **f**: 4-(3-hidroxi-propil)-2,6-dimetoxifenol; **g**: ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)propanoico; **h**: 4-(3-hidroxi-prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol (álcool sináplico); **i** e **j**: dímeros do ácido fenilpropenoico com arabinose.



**Figura 25.** Exemplos das estruturas de cetonas de Hibbert obtidas após a hidrólise ácida da lignina (adaptado de KULKA e HIBBERT, 1943 e FISHER *et al.*, 1944).

A formação das diversas cetonas de Hibbert é derivada, primeiramente, da liberação da estrutura (I) no meio reacional. Esse composto pode ser formado pela clivagem catalisada por ácido da ligação aril-éter do tipo  $\beta$ -O-4 da lignina, como apresentado na proposta mecanística da Figura 26. A reação de hidrólise ácida é iniciada pela protonação da hidroxila benzílica da estrutura hipotética de lignina (VI). A saída da água na estrutura (VII) leva à formação do intermediário carbocátion (VIII), que em seguida é estabilizado pela retirada do hidrogênio vizinho ao carbocátion. O par de elétrons da ligação éter na estrutura (IX) é deslocado para a formação do íon oxônio na estrutura (X). O ataque do par de elétrons do oxigênio da água forma a estrutura (XI), que retira o hidrogênio para formar o respectivo hemiacetal (XII) e, com o deslocamento eletrônico da estrutura (XII), tem-se a formação da cetona de Hibbert (XIV).

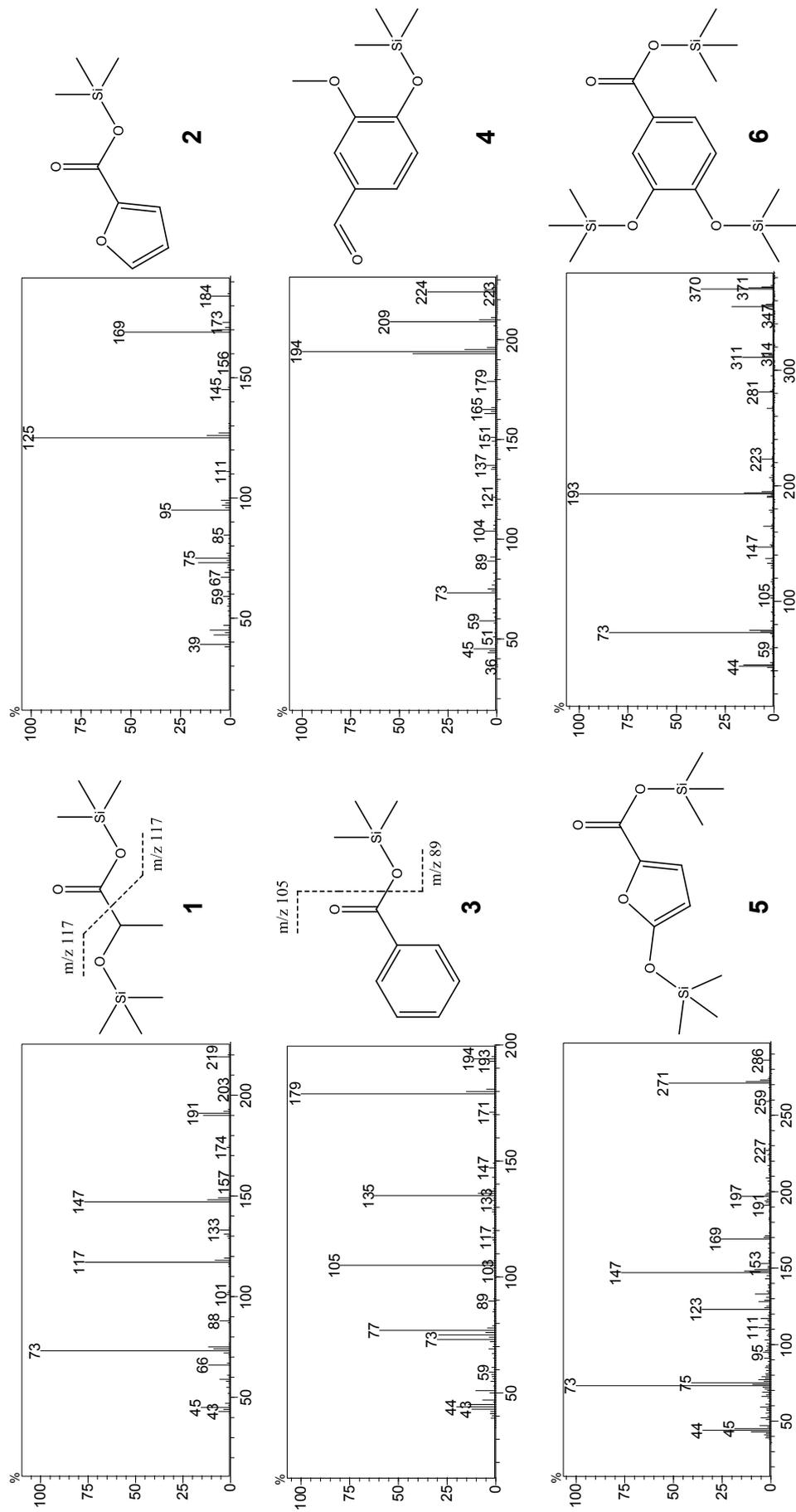


**Figura 26.** Proposta de mecanismo para a clivagem da ligação aril éter do tipo  $\beta$ -O-4 da lignina catalisada por ácido com a formação de uma cetona de Hibbert (adaptado de MITCHELL *et al.*, 2014 e MILES-BARRETT *et al.*, 2016).

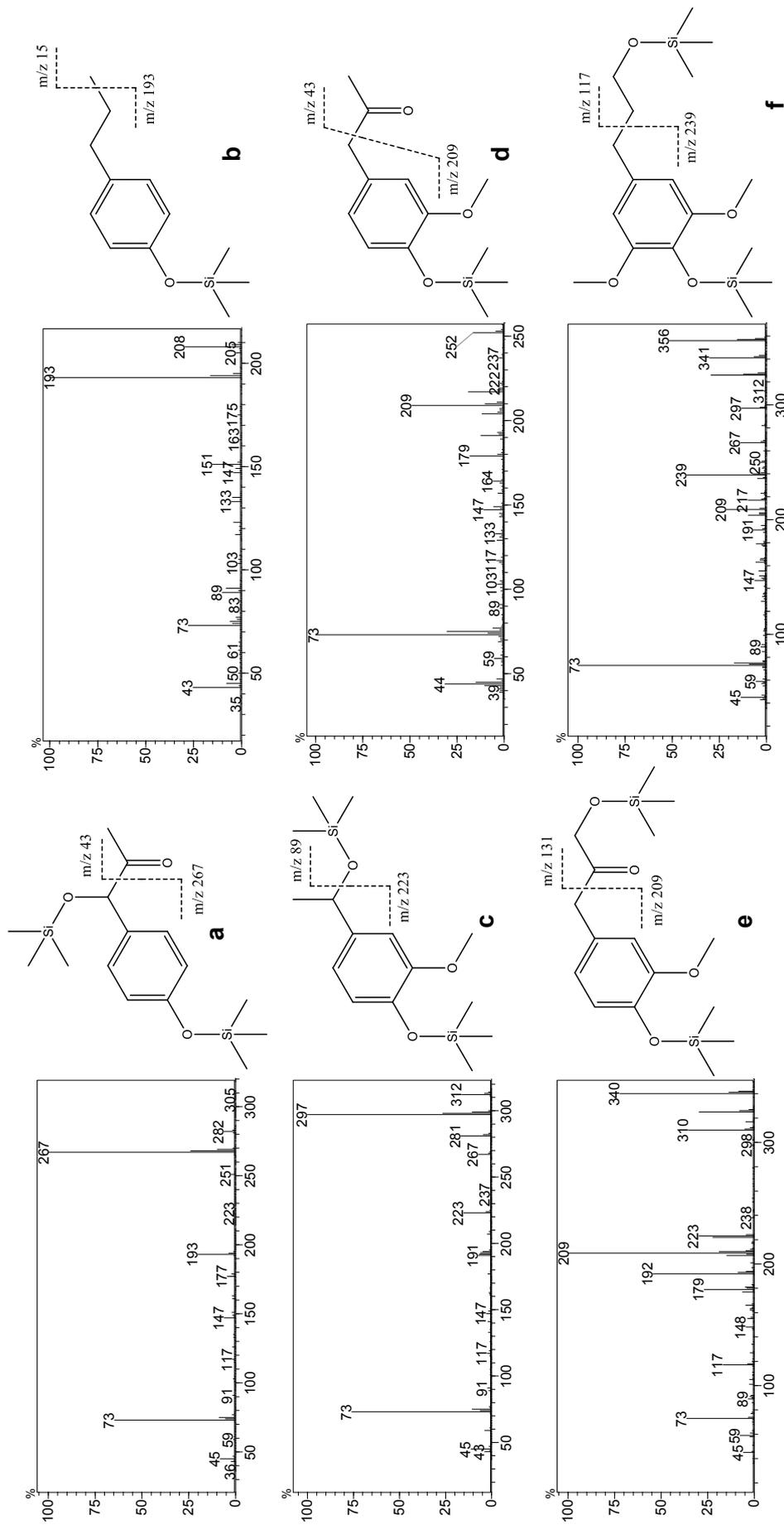
Além de confirmar os compostos quantificados por CLAE, a análise do cromatograma da Figura 24 também revelou a presença de alguns compostos comuns já relatados nas frações solúveis em água de diversos pré-tratamentos (com ácido sulfúrico, amônia, água quente, explosão a vapor e processos oxidativos) da palha de milho e das madeiras de álamo e pinus (DU *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2013). Estes compostos foram identificadas pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados NIST (Figura 27). Por exemplo, os ácidos furoico (**2**) e 5-hidroximetil-2-furoico (**5**) são produtos de oxidação de furfural e HMF, respectivamente.

Outros compostos foram identificados com base em seu padrão de fragmentação e nas estruturas das cetonas de Hibbert já relatadas (Figuras 28 e 29). Na maioria dos casos, a diferença de massa entre o íon molecular e os fragmentos de maiores abundâncias ajudou na elucidação da estrutura. Por exemplo, para a estrutura **e** na Figura 28, o fragmento de  $m/z$  209 revela a presença de grupo carbonila no carbono  $\beta$  da cadeia lateral e a diferença de massa do íon molecular ( $m/z$  340) e o fragmento de  $m/z$  131 (referente ao carbono  $\alpha$ ) demonstra que a cadeia lateral corresponde ao 1-hidroxi-2-propanona.

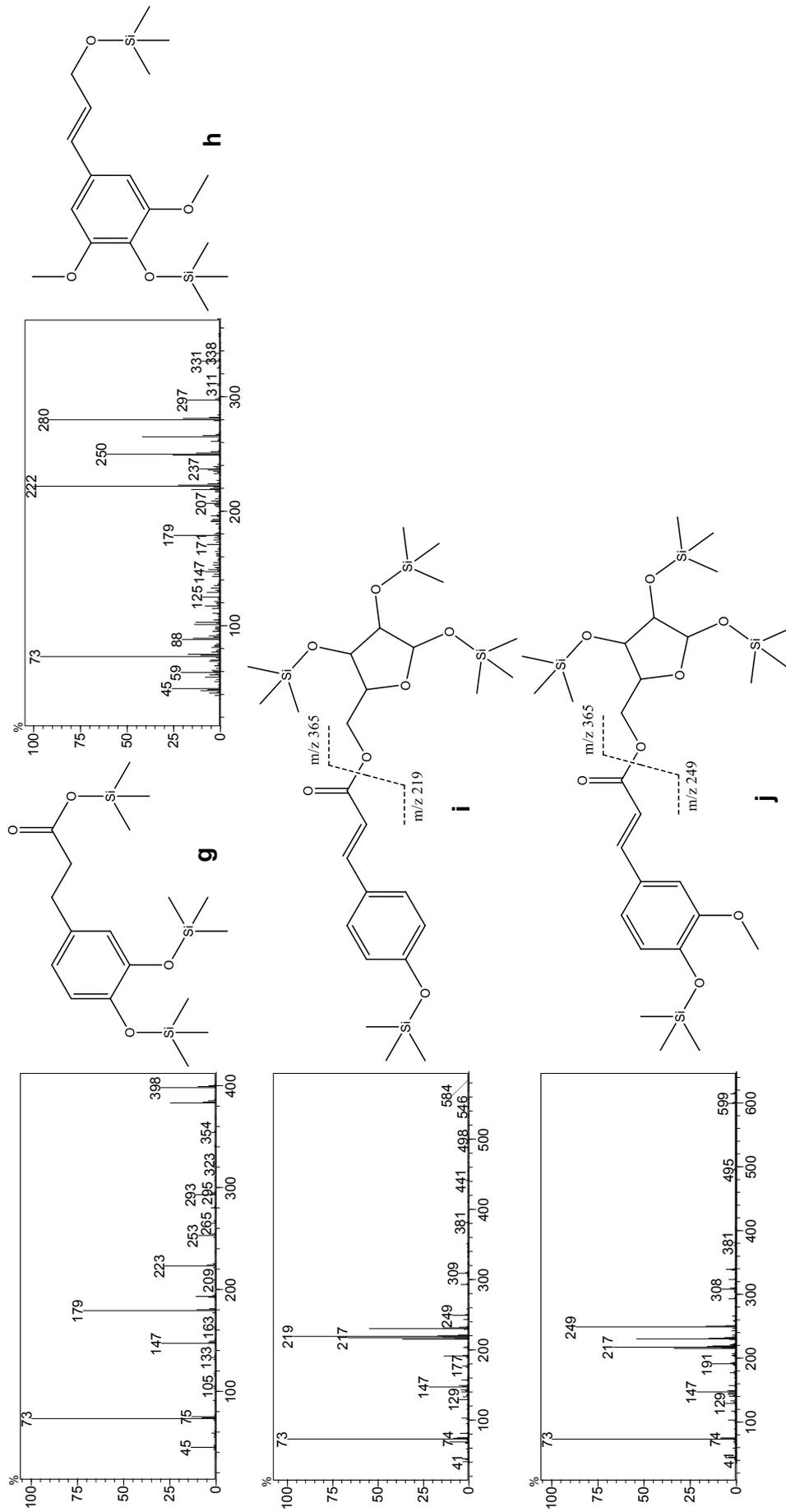
Além dos monômeros fenólicos, também foram identificados derivados do éster cinâmico com arabinose (estruturas **i** e **j** na Figura 29) e estes compostos são tipicamente atribuídos à ligação covalente entre hemicelulose e lignina. Nestes casos, a presença dos fragmentos de  $m/z$  73, 147, 191, 217 e 230 indicou o padrão de fragmentação de uma pentose trimetilsililada, enquanto que o fragmento de  $m/z$  365 é oriundo do resíduo de arabinose sililado. A presença dos fragmentos de  $m/z$  219 e 249 é consistente com a presença de subestruturas do éster derivado dos ácidos ferúlico e *p*-cumárico nas estruturas **i** e **j**, respectivamente. Os íons moleculares de  $m/z$  614 e 584 também foram consistentes com a massa molecular destes derivados de éster cinâmico com arabinose. Do total de compostos fenólicos identificados, nove foram derivados do álcool coniferílico (uma metoxilação), três do álcool sinapílico (duas metoxilações) e seis do álcool *p*-cumarílico (nenhuma metoxilação).



**Figura 27.** Espectros de massas dos compostos trimetilsililados proposto pelo banco de dados NIST com a similaridade em parênteses. **1:** ácido 2-hidroxi-propanoico (ácido láctico, 96%); **2:** ácido furoico (95%); **3:** ácido benzoico (89%); **4:** 4-hidroxi-3-metoxibenzenaldeído (vanilina, 95%); **5:** ácido 5-hidroxi-metil-2-furoico (90%); **6:** ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ácido protocateico, 93%).



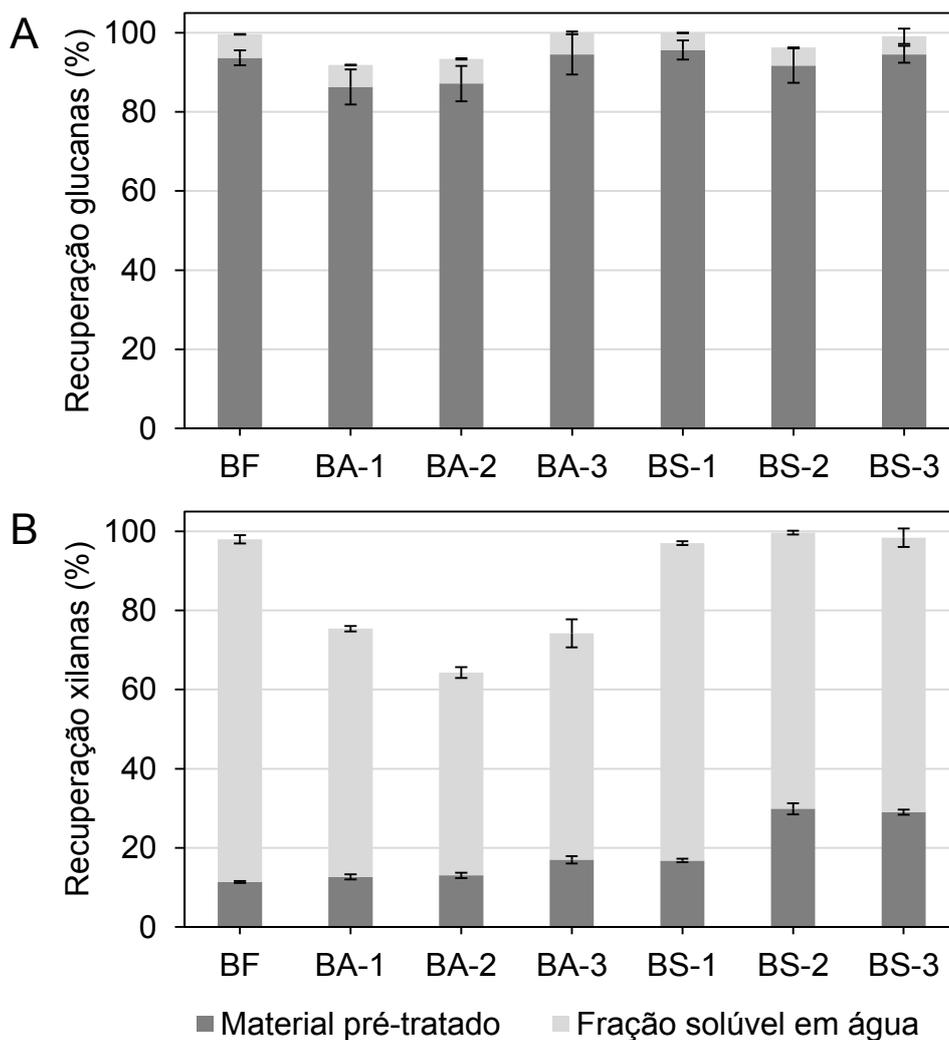
**Figura 28.** Espectros de massas dos propostos compostos trimetilsililados baseados no padrão de fragmentação. **a:** 1-hidroxi-1-(4-hidroxi)propan-2-ona; **b:** 4-propilfenol; **c:** 4-(1-hidroxi)propan-2-ona; **d:** 1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; **e:** 1-hidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propan-2-ona; **f:** 4-(3-hidroxi)propil)-2,6-dimetoxifenol.



**Figura 29.** Espectros de massas dos propostos compostos trimetilsililados baseados no padrão de fragmentação. **g:** ácido 3-(3,4-dihidroxi)fenil)propanoico; **h:** 4-(3-hidroxi)prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol (álcool sináplico); **i:** éster derivado do ácido *p*-cumárico com arabinose; **j:** éster derivado do ácido ferúlico com arabinose.

### 5.1.1.7 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos

A recuperação dos principais carboidratos após a etapa de pré-tratamento é essencial para o desenvolvimento sustentável das biorefinerías. Assim, a recuperação dos principais componentes da biomassa (glucanas e xilanas) nas frações insolúvel e solúvel em água está representada na Figura 30 para todos os experimentos realizados neste estudo.



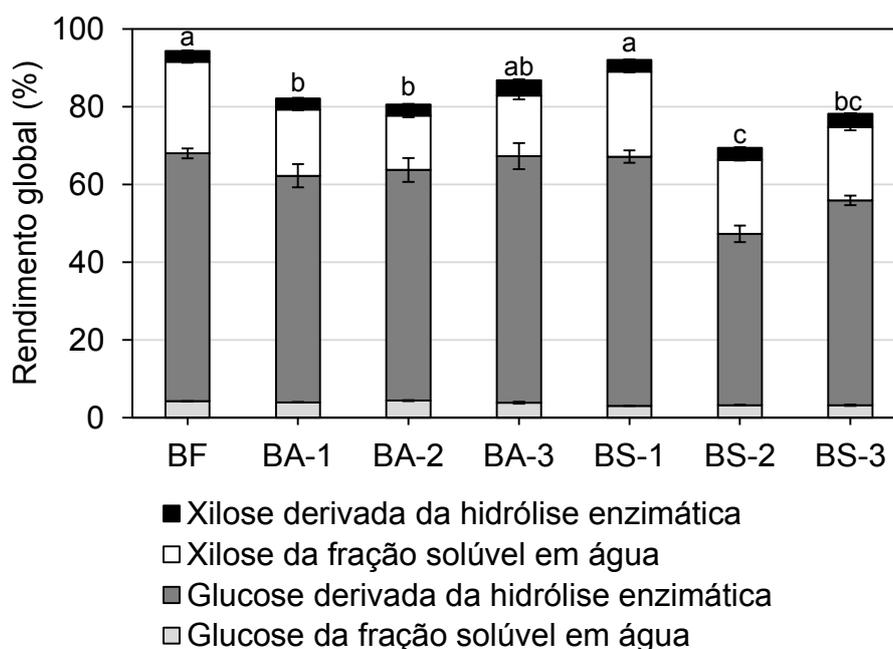
**Figura 30.** Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nos materiais pré-tratados e frações solúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço da cana. Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico g<sup>-1</sup> de substrato seco.

Em geral, a recuperação das glucanas foram superiores a 90%, sendo obtidas principalmente fração insolúvel em água (Figura 30A), enquanto que as xilanas estavam majoritariamente presentes na fração solúvel em água (Figura 30B).

A recuperação das xilanas na fração solúvel em água foi consideravelmente menor para os experimentos de auto-hidrólise (BA-1, BA-2 e BA-3), revelando que maiores temperaturas e/ou tempos de reação aumentam a degradação destes constituintes em produtos de menor massa molar, tais como furfural e ácido levulínico. No entanto, somente o ácido levulínico foi observado nas frações solúveis desses pré-tratamentos, uma vez que o furfural possui um ponto de ebulição menor (162 °C) do que o do ácido levulínico (245 °C) e por isso pode ter sido perdido por volatilização durante a abertura do reator de explosão a vapor. As recuperações dos demais constituintes do bagaço de cana, como anidroarabinose, grupo acetila e lignina total estão representadas na Tabela A1.1 (página 208).

#### 5.1.1.8 Rendimento global de açúcares

O rendimento global de açúcares solúveis para todas as condições de explosão a vapor do bagaço de cana está mostrado na Figura 31, em que são considerados os açúcares liberados na fração solúvel em água do pré-tratamento e após 96 h de hidrólise enzimática do material pré-tratado, empregando 15% de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> glucanas.



**Figura 31.** Rendimento global de açúcares obtidos nas frações solúveis em água do pré-tratamento por explosão a vapor e após 96 h de hidrólise enzimática do bagaço de

cana pré-tratado. Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BF: 195 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido fosfórico  $g^{-1}$  de substrato seco; BA-1: 195 °C e 15,0 min; BA-2: 205 °C e 7,5 min; BA-3: 200 °C e 10,5 min; BS-1: 195 °C, 7,5 min e 2,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-2: 170 °C, 7,5 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco; BS-3: 180 °C, 4,0 min e 9,5 mg de ácido sulfúrico  $g^{-1}$  de substrato seco.

As condições de pré-tratamento BF, BA-3 e BS-1 resultaram em rendimentos globais de açúcares significativamente maiores ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), sendo capazes de solubilizar 94,4%, 86,8% e 92,1% dos carboidratos presentes originalmente na matéria-prima (glucanas e xilanas), respectivamente. O pior desempenho foi observado para a condição reacional BS-2, mas, mesmo assim, este ensaio liberou 69,4% de açúcares livres após o pré-tratamento e hidrólise enzimática. Deste modo, o pré-tratamento por explosão de vapor, catalisado por um ácido exógeno ou por auto-hidrólise, foi seletivo para extrair pentoses (principalmente xilose) na fração solúvel em água, gerando um material sólido com alto teor de glucanas que foi facilmente convertido em açúcares solúveis (principalmente glucose) por hidrólise enzimática.

#### 4.1.1.9 Estudo detalhado da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor

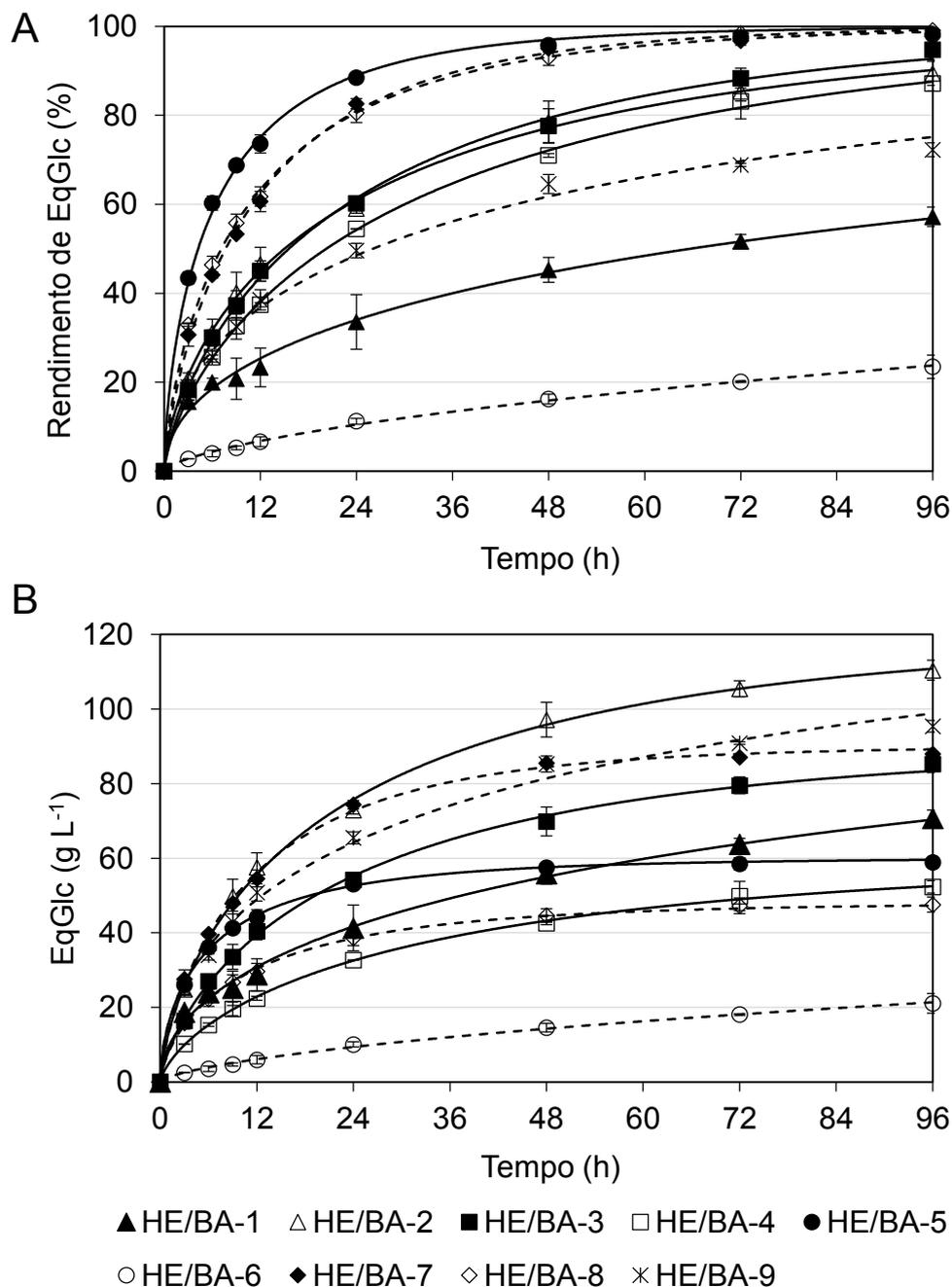
O desenvolvimento de um pré-tratamento adequado é o primeiro grande desafio de um processo de conversão de biomassa, visando maximizar a recuperação de seus carboidratos constituintes. No entanto, o material pré-tratado também deve apresentar alta suscetibilidade à hidrólise enzimática. Os principais fatores que afetam a eficiência da hidrólise enzimática são o teor de sólidos totais, a carga enzimática empregada, o tempo de reação e as características estruturais dos substratos. De modo a avaliar alguns dos fatores supracitados, o material produzido na condição de menor severidade (BA, FSC = 0,44), cuja composição química está mostrada na Tabela A1.2 (página 209), foi selecionado para realizar um estudo de otimização de sua hidrólise enzimática. Apesar de produzido com FSC menor do que os demais experimentos de pré-tratamento, esse material (BA) resultou em alta recuperação de glucanas e em bons resultados empregando o procedimento padrão do NREL para determinação de acessibilidade à hidrólise.

Os fatores escolhidos para este estudo de hidrólise enzimática foram o teor de sólidos totais e a carga enzimática, avaliados por meio de um planejamento fatorial  $2^2$  (Tabela 5). A Figura 32 mostra o perfil hidrolítico das diferentes condições reacionais

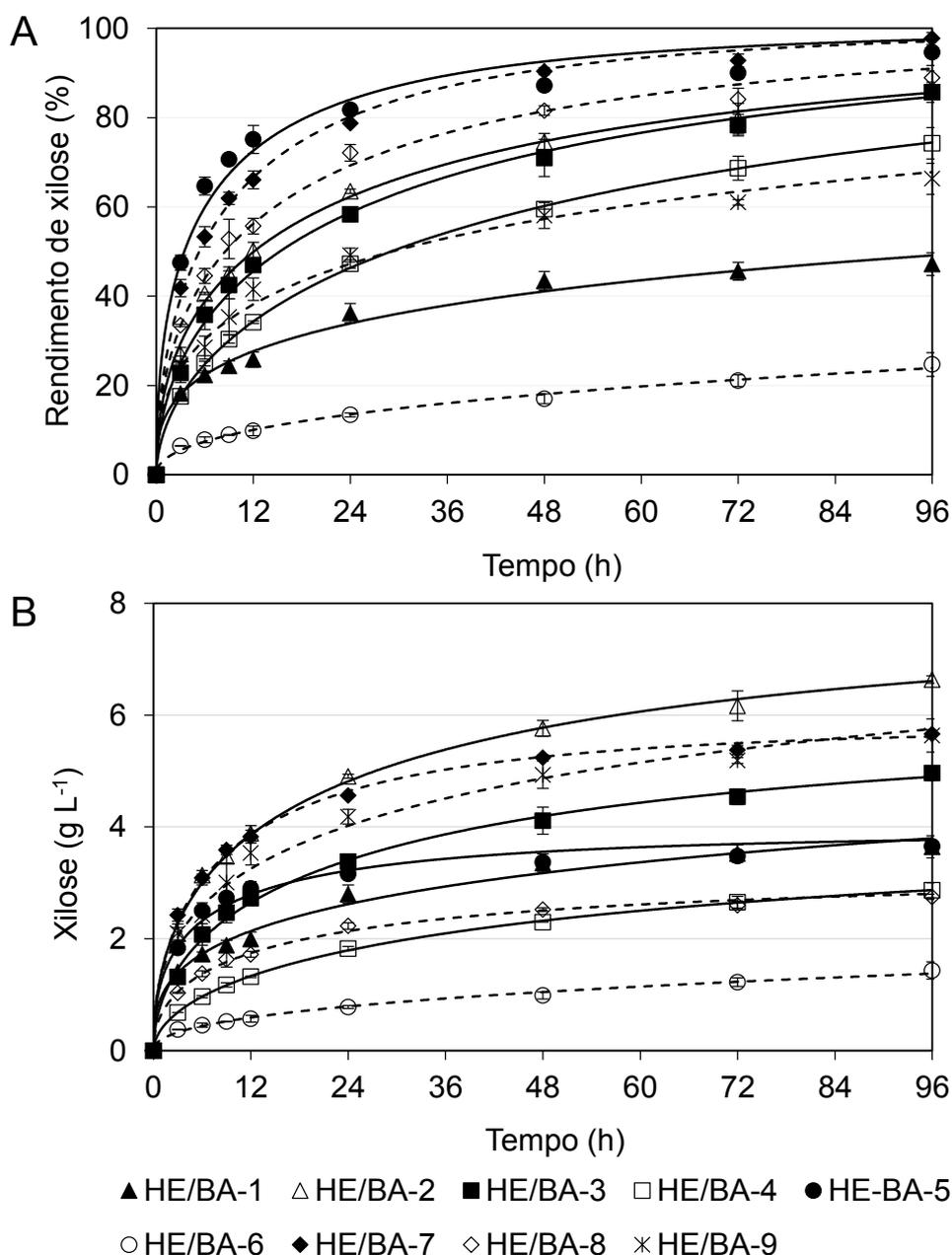
com as curvas ajustas pelo modelo fractal. Os maiores rendimentos de EqGlc após 96 h de hidrólise foram obtidas para os experimentos HE/BA-5, HE/BA-7 e HE/BA-8, que corresponderam a aproximadamente 58, 86 e 45 g L<sup>-1</sup> de EqGlc. Estas diferenças estão relacionadas à carga inicial de sólidos totais utilizada para hidrólise (10% para HE/BA-5, 15% para HE/BA-7 e 8% para HE/BA-8). Com exceção dos experimentos HE/BA-1 e HE/BA-6, que resultaram nos menores rendimentos devido ao uso de baixa carga enzimática e alto teor de sólidos totais, todas as outras condições alcançaram rendimentos acima de 65% em 48 h de reação. O experimento realizado em 20% de sólidos totais com 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (HE/BA-2) resultou na maior liberação de EqGlc após 96 h de hidrólise, que foi de 110 g L<sup>-1</sup>. Entretanto, é importante notar que perto de 52 g L<sup>-1</sup> de EqGlc já foram alcançados em 12 h de reação para essa e outras condições reacionais.

Se considerarmos os dois principais processos para a produção de etanol celulósico, a fermentação e hidrólise em separado (do inglês, *separate hydrolysis and fermentation* - SHF) e a fermentação e hidrólise simultâneas (do inglês, *simultaneous saccharification and fermentation* - SSF), a concentração de 110 g L<sup>-1</sup> de açúcares poderia ser aplicada em estudos de SHF, enquanto que a de 52 g L<sup>-1</sup> seria ideal para processos SSF. A concentração de celobiose utilizada no cálculo de rendimento de EqGlc foi baixa, representando somente 1,7 ± 0,9% do total de EqGlc liberados durante a hidrólise enzimática para todas as condições reacionais, independentemente do teor de sólidos totais aplicado. Como já mencionado, apesar de não haver estudos de inibição com celobiose para complexo Cellic CTec3, as concentrações quantificadas ao longo de toda a reação enzimática foram consideradas baixas quando comparadas às concentrações de celobiose geralmente obtidas com as preparações enzimáticas comerciais que a antecederam, como a Cellic CTec2 e a Celluclast 1.5L.

Os perfis de hidrólise das xilanas foram similares aos obtidos para as glucanas, com altos rendimentos sendo alcançadas nos experimentos HE/BA-5, HE/BA-7 e HE/BA-8 (Figura 33). A maior concentração de xilose (6,6 g L<sup>-1</sup>) foi obtida no experimento HE/BA-2, que correspondeu a 85% de rendimento de xilose em 96 h de hidrólise. Em geral, xilanas são mais acessíveis à hidrólise enzimática que glucanas (como a celulose) devido possuir uma estrutura menos compacta. No entanto, muitas vezes, as cadeias de xilanas que ainda resistiram ao pré-tratamento estão localizadas no interior da estrutura celular e não são prontamente disponíveis à hidrólise. Assim, com a hidrólise da celulose, as cadeias de xilana dispostas mais internamente vão se tornando cada vez mais acessíveis às enzimas.



**Figura 32.** (A) Rendimento de EqGlc e (B) concentração de EqGlc durante as diferentes condições de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA – 195 °C e 7,5 min). Linhas pontilhadas referem-se aos pontos axiais. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 22% sólidos totais.



**Figura 33.** (A) Rendimento de xilose e (B) concentração de xilose durante as diferentes condições de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA). Linhas pontilhadas referem-se aos pontos axiais. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 22% sólidos totais.

Os parâmetros cinéticos fractais  $k$  e  $h$  da hidrólise de glucanas e xilanas encontram-se na Tabela 16, juntamente ao  $R^2$  dos ajustes das Figuras 32 e 33. Os altos valores de  $R^2$  para todos os experimentos de hidrólise revelaram, mais uma vez, a habilidade do modelo cinético fractal em descrever a liberação de EqGlc e xilose em função do tempo. Todos os experimentos mostraram maiores valores de  $k$  e  $h$  para o rendimento de xilose quando comparados ao rendimento de EqGlc. Esses maiores valores de  $k$  são devidos ao alto conteúdo de hemicelulases no complexo enzimático Cellic CTec3, que é capaz de hidrolisar a maior parte dos componentes das hemiceluloses. Por outro lado, os altos valores de  $h$  estão provavelmente expressando a baixa acessibilidade das hemiceluloses residuais que estão localizadas mais fortemente associadas à matriz lignocelulósica, sendo acessíveis somente após a remoção parcial de glucanas pela ação concertada das enzimas celulolíticas.

**Tabela 16.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática do planejamento fatorial do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA).

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$
HE/BA-1	0,102	0,536	0,995	0,134	0,648	0,968
HE/BA-2	0,108	0,330	0,999	0,194	0,496	0,991
HE/BA-3	0,095	0,272	0,998	0,166	0,471	0,995
HE/BA-4	0,083	0,295	0,999	0,105	0,443	1,000
HE/BA-5	0,299	0,387	0,999	0,386	0,525	0,965
HE/BA-6	0,014	0,352	0,997	0,036	0,555	0,992
HE/BA-7	0,150	0,246	0,998	0,276	0,445	0,993
HE/BA-8	0,178	0,305	0,999	0,238	0,499	0,993
HE/BA-9	0,126	0,475	0,995	0,175	0,591	0,981

Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 22% sólidos totais. Para o rendimento de EqGlc os desvios padrão para os parâmetros  $k$  e  $h$  da foram de 0,012  $h^{-1}$  e 0,040, respectivamente. Para o rendimento de xilose, os desvios padrão para os parâmetros  $k$  e  $h$  da foram de 0,019  $h^{-1}$  e 0,028, respectivamente.

Os parâmetros cinéticos fractais  $k$  e  $h$  foram então utilizados como variáveis resposta para modelagem matemática. O significado estatístico do modelo proposto foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Tabela

17. O erro puro, calculado a partir do erro experimental no ponto central do planejamento experimental, variou de 0,1 para 2,8% de acordo com o total da soma dos quadrados, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no teste F, os modelos são preditivos, uma vez que os valores do F calculado para as variáveis respostas são maiores do que os F tabelados correspondentes dentro de 95% de confiança. Além disso, os altos valores de  $R^2$  demonstram que a maioria da variância é explicada pelos modelos desenvolvidos.

**Tabela 17.** Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros cinéticos fractais derivados do planejamento experimental da hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA).

Resposta	Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>								
Parâmetro $k$ (h <sup>-1</sup> )	Regressão	0,038	4	0,009	21,864	5,192	0,939	0,946
	Resíduos	0,002	5	0,000				
	Falta de ajuste	0,002	3	0,000	4,551	19,164		
	Erro puro	0,000	2	0,000				
	Total	0,038	9					
Parâmetro $h$	Regressão	0,072	4	0,018	20,185	5,192	0,913	0,942
	Resíduos	0,004	5	0,000				
	Falta de ajuste	0,002	3	0,000	0,708	19,164		
	Erro puro	0,002	2	0,000				
	Total	0,076	9					
<i>Rendimento de xilose</i>								
Parâmetro $k$ (h <sup>-1</sup> )	Regressão	0,075	4	0,019	41,619	5,192	0,962	0,971
	Resíduos	0,002	5	0,000				
	Falta de ajuste	0,002	3	0,000	1,639	19,164		
	Erro puro	0,000	2	0,000				
	Total	0,077	9					
Parâmetro $h$	Regressão	0,041	5	0,008	29,696	5,192	0,973	0,974
	Resíduos	0,001	4	0,000				
	Falta de ajuste	0,001	3	0,000	16,758	19,164		
	Erro puro	0,000	2	0,000				
	Total	0,042	9					

<sup>1</sup> SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup> GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup> QM: quadrados médio;

<sup>4</sup> Var: máxima variância explicada pelo modelo.

As Equações 12 e 13 foram geradas para ajustar os parâmetros cinéticos fractais do rendimento de EqGlc ( $k_{Glc}$  e  $h_{Glc}$ ), enquanto que as Equações 14 e 15 foram utilizadas para os parâmetros fractais do rendimento de xilose ( $k_{Xyl}$  e  $h_{Xyl}$ ). Os modelos codificados nessas equações foram utilizados para construir os gráficos de contorno das Figuras 34 e 35, onde CE é a carga enzimática e ST é o teor de sólidos totais.

$$k_{Glc} = 0,098 + 0,047CE - 0,003CE^2 - 0,027ST + 0,031ST^2 - 0,044CE \times ST \quad \text{Equação 12}$$

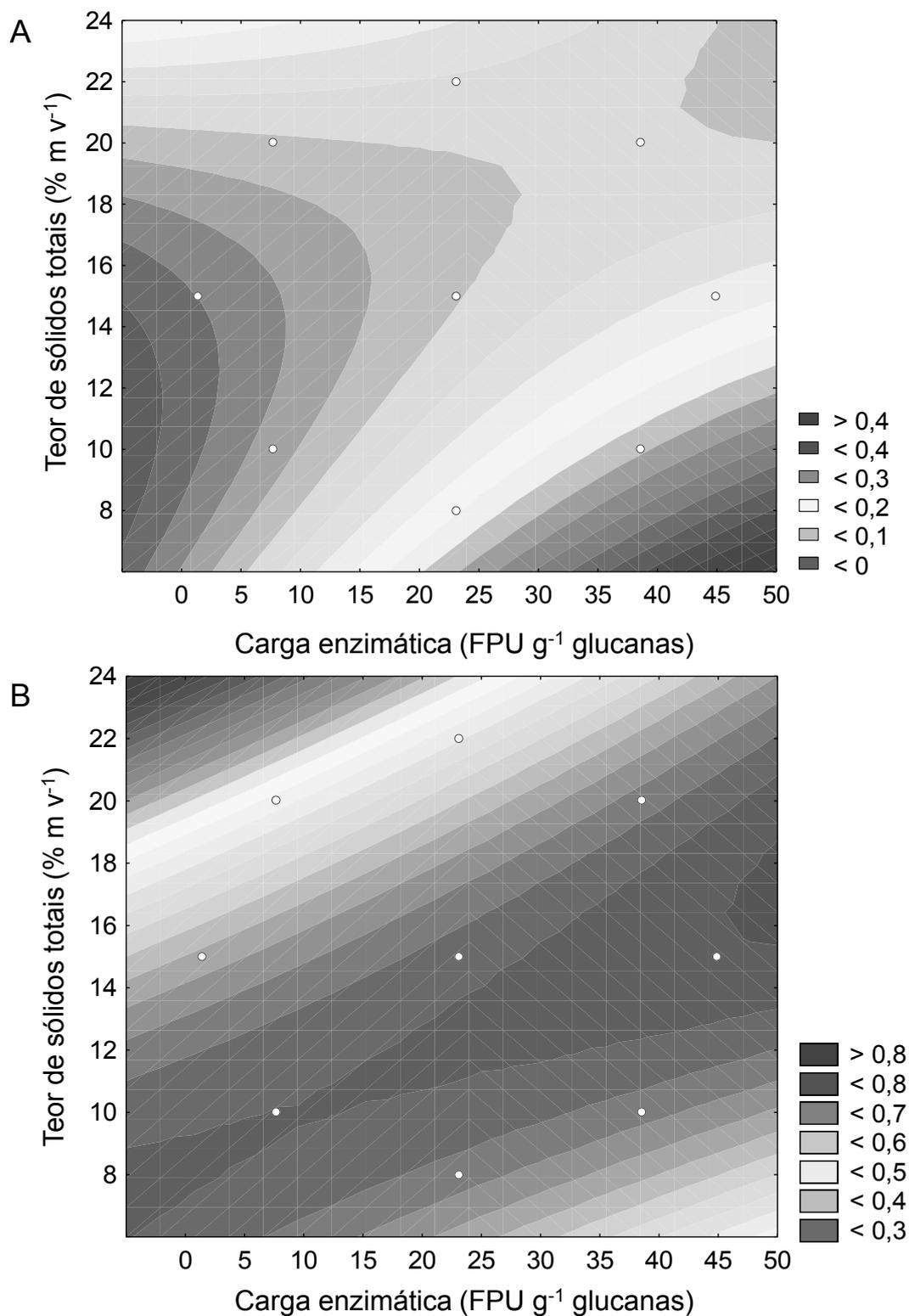
$$h_{Glc} = 0,287 - 0,040CE + 0,012CE^2 + 0,059ST + 0,054ST^2 - 0,060CE \times ST \quad \text{Equação 13}$$

$$k_{Xyl} = 0,172 + 0,083CE - 0,004CE^2 - 0,029ST + 0,020ST^2 - 0,052CE \times ST \quad \text{Equação 14}$$

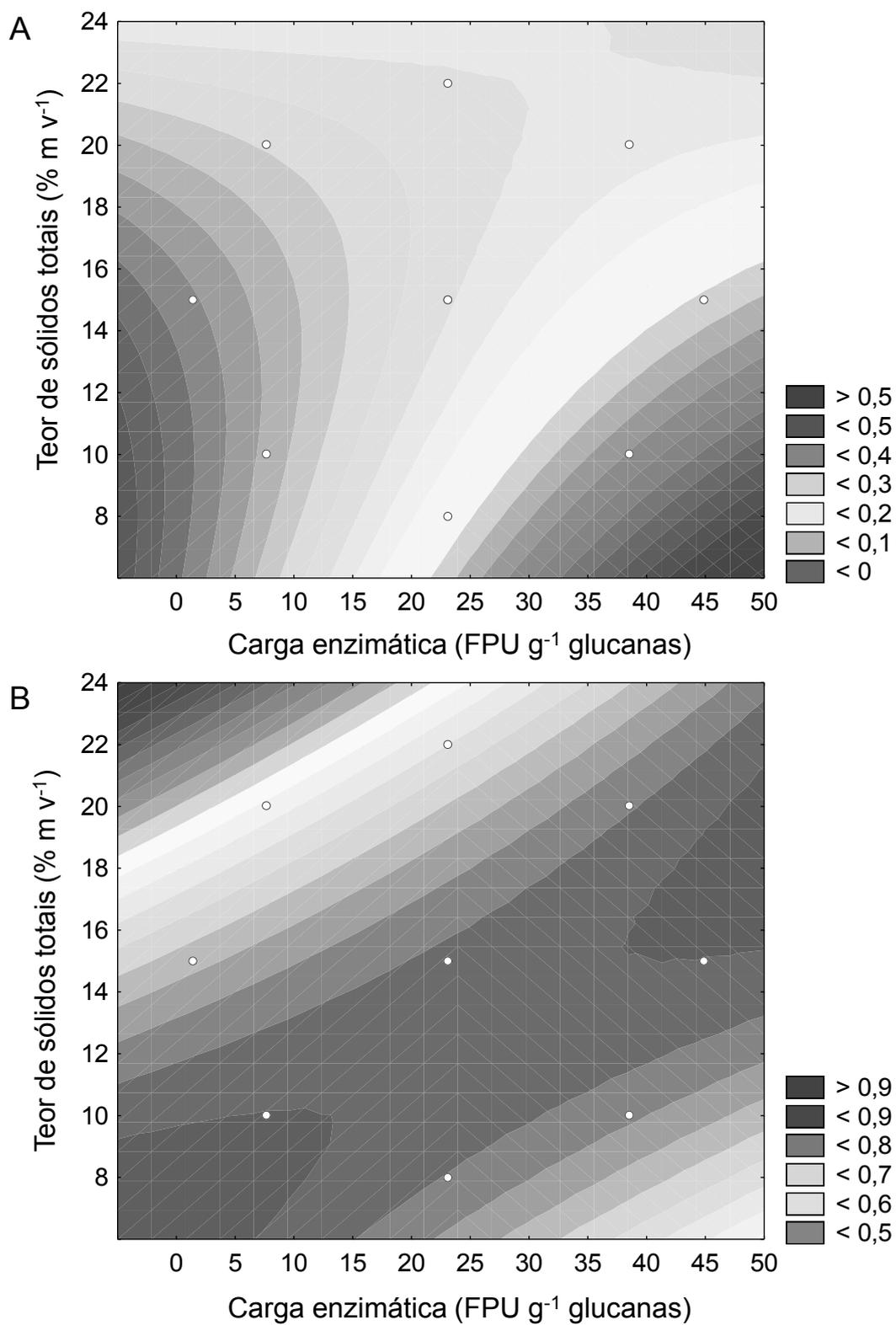
$$h_{Xyl} = 0,468 - 0,030CE + 0,012CE^2 + 0,044ST + 0,036ST^2 - 0,053CE \times ST \quad \text{Equação 15}$$

Como é possível observar nas Figuras 34A e 35A, o coeficiente  $k$  para os rendimentos de EqGlc e xilose foi amplamente afetado pelas mudanças na carga enzimática. No entanto, esse efeito foi mais pronunciado em reações realizadas em baixo teor de sólidos totais. Por exemplo, em 10% de sólidos totais (HE/BA-4 e HE/BA-5), o valor de  $k$  aumentou de 0,083 para 0,299  $h^{-1}$  para o rendimento de EqGlc e de 0,105 para 0,386  $h^{-1}$  para o rendimento de xilose quando a carga enzimática foi aumentada de 7,7 para 38,6 FPU  $g^{-1}$  de glucanas. Por outro lado, em 20% de sólidos totais, o aumento na carga enzimática (HE/BA-1 e HE/BA-2) resultou em valores de  $k$  similares para o rendimento de EqGlc (0,102 e 0,108  $h^{-1}$ , respectivamente) e um pouco maiores para o rendimento de xilose (0,134 e 0,194  $h^{-1}$ ). Este efeito pode ser explicado pela baixa disponibilidade de água livre em altos teores de sólidos totais, que prejudica a difusão das enzimas e sua ação catalítica. O valor de  $k$  diminuiu de 0,299 para 0,108  $h^{-1}$  para o rendimento de EqGlc e de 0,386 para 0,194  $h^{-1}$  para o rendimento de xilose quando o teor de sólidos totais aumentou de 10 para 20% na carga enzimática fixa de 38,6 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (HE/BA-5 e HE/BA-2, respectivamente). Em contrapartida, o efeito negativo do teor de sólidos totais no valor de  $k$  foi aparentemente superado com o emprego a carga enzimática de 7,7 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (HE/BA-8 e HE/BA-9). Esta observação pode estar relacionada com o aumento da disponibilidade de substrato no meio reacional que, por consequência, diminuiu a aglomeração das enzimas em pontos mais acessíveis do substrato.

Os gráficos de contorno para o expoente fractal  $h$  são mostrados nas Figuras 34B e 35B para os rendimentos de EqGlc e xilose, respectivamente.



**Figura 34.** Gráficos de contorno obtidos para os parâmetros cinéticos fractais (A)  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) e (B)  $h$  da hidrólise enzimática das glucanas presentes no bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA).



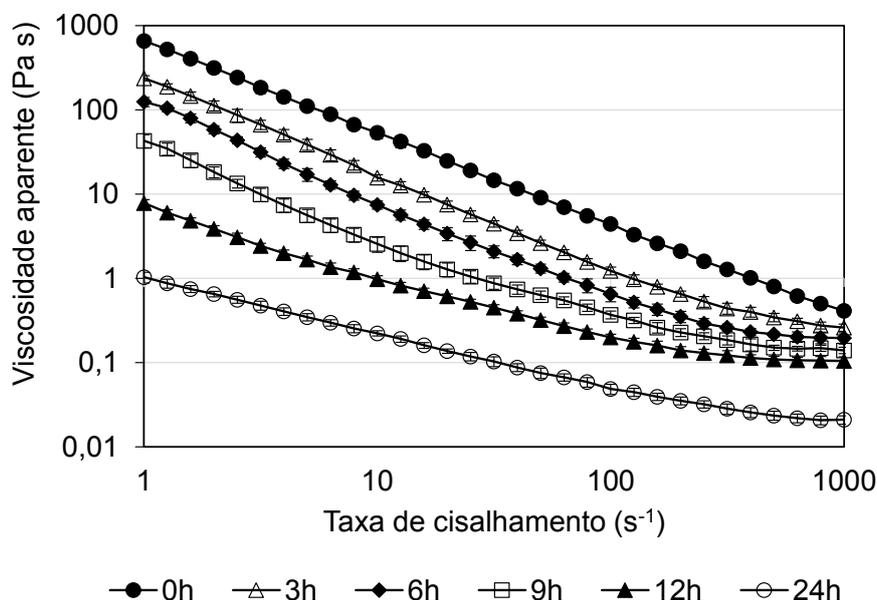
**Figura 35.** Gráficos de contorno obtidos para os parâmetros cinéticos fractais (A)  $k$  ( $\text{h}^{-1}$ ) e (B)  $h$  da hidrólise enzimática das xilanas presentes no bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA).

Altos teores de sólidos totais resultaram em altos valores de  $h$  para ambos os casos (Tabela 16). Por exemplo, nos experimentos HE/BA-1 e HE/BA-4, realizados em 20 e 10% de sólidos totais com 7,7 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas, os valores de  $h$  foram de 0,536 e 0,295, respectivamente. Já para a carga enzimática fixa em 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas, como nos experimentos HE/BA-8 e HE/BA-9, os valores de  $h$  foram de 0,305 e 0,475 para os teores de sólidos totais de 8 e 22%, respectivamente. Novamente, este efeito está relacionado com a inibição das enzimas pelos produtos da reação e também pela maior acumulação de lignina no meio reacional, que aumenta a adsorção não específica das enzimas por interações hidrofóbicas. Por outro lado, em altas cargas enzimáticas (HE/BA-2 e HE/BA-5), tal efeito não foi observado, pois a quantidade de enzimas que se liga na lignina ou a complexos lignina-carboidrato não é limitante para alcançar bons desempenhos de hidrólise.

Medidas reológicas também foram realizadas para todas as condições de hidrólise enzimática do planejamento experimental. Esses ensaios foram realizados em fluxo com cilindros concêntricos, de modo a visualizar o efeito do teor de sólidos totais e da carga enzimática sobre a viscosidade aparente durante a reação. Um exemplo deste comportamento pode ser observado na Figura 36 para o ponto central do estudo (23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% de sólidos totais). A viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento, indicando, mais uma vez, o comportamento pseudoplástico do material pré-tratado. Outro ponto a ser destacado é que a viscosidade aparente deixou de ser linear com o aumento da taxa de cisalhamento, principalmente em valores maiores que 100 s<sup>-1</sup>. Esta mudança é conhecida como regime turbulento, que ocorre quando o material é submetido a taxas elevadas de cisalhamento, causando a separação entre as frações sólida e líquida (ROSGAARD *et al.*, 2007). EBELING *et al.* (1999) relataram que a orientação dos microcristais de celulose de algodão é dependente da taxa de cisalhamento. Em altas taxas de cisalhamento, as mudanças na viscosidade aparente são menos pronunciadas porque os microcristais de celulose se alinham horizontalmente ao longo da direção do cisalhamento e a resistência ao fluxo se torna aproximadamente constante. No entanto, este fenômeno de orientação é completamente reversível.

A viscosidade aparente do material pré-tratado também sofreu mudanças consideráveis com o tempo devido à ação progressiva das enzimas. A Figura 36 mostra que a viscosidade aparente reduziu cerca de uma ordem de magnitude a cada 6 h de hidrólise enzimática. Essa mudança é devida aos efeitos combinados da desconstrução da parede celular e de uma diminuição gradual nos comprimentos médios das cadeias de celulose e hemicelulose (ROSGAARD *et al.*, 2007). Uma vez que as variações na viscosidade aparente em taxas de cisalhamento superiores a 100 s<sup>-1</sup> são devidas à

mudança gradual do regime laminar para o turbulento, os resultados das diferentes condições do planejamento fatorial foram comparados em  $10 \text{ s}^{-1}$  e esses estão apresentados na Tabela 18 para as primeiras 24 h de hidrólise. As viscosidades aparentes iniciais foram proporcionais ao teor utilizado de sólidos totais.



**Figura 36.** Viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA) no ponto central do planejamento fatorial (23,1 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% de sólidos totais) para diferentes tempos de hidrólise enzimática.

Os valores de viscosidade em 15, 20 e 22% de sólidos totais foram cerca de duas, quatro e cinco vezes maiores do que o valor de viscosidade observado em 10% de sólidos totais, respectivamente (Tabela 18). As altas viscosidades aparentes observadas para 15% de sólidos totais ou mais podem ser associadas à menor disponibilidade de água livre no meio reacional e ao maior grau de entrelaçamento entre as fibras. Além disso, à medida que o teor de sólidos totais aumenta, a distância média entre as partículas diminui, levando a um aumento nas interações entre as partículas (ROSGAARD *et al.*, 2007). Estes fenômenos resultam em mais fricção e resistência ao fluxo e, portanto, em maiores valores de viscosidades aparentes. DASARI *et al.* (2008) atribuíram maiores valores de viscosidade aparente às mudanças estruturais do material após o pré-tratamento, como o aumento da porosidade da fibra pela remoção parcial de hemiceluloses e/ou lignina. Essas alterações estruturais melhoram a acessibilidade das enzimas hidrolíticas aos polissacarídeos e promovem a absorção de água, reduzindo a quantidade de água livre presente na suspensão.

**Tabela 18.** Viscosidade aparente na taxa de cisalhamento de  $10 \text{ s}^{-1}$  durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana auto-hidrolisado padrão (BA) para as diferentes condições do planejamento fatorial.

Experimento	Viscosidade aparente (Pa s)					
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	24 h
HE/BA-1	90,8	39,3	30,5	21,8	17,6	9,7
HE/BA-2	97,0	18,1	9,4	4,0	1,8	0,4
HE/BA-3	53,5 ± 8,1	15,7 ± 1,4	7,5 ± 0,8	2,6 ± 0,5	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,1
HE/BA-4	26,0	16,8	7,9	2,5	1,1	0,3
HE/BA-5	20,0	0,7	0,3	0,1	<0,1	<0,1
HE/BA-6	60,8	44,2	34,6	27,7	23,4	15,2
HE/BA-7	54,8	6,0	0,8	0,5	0,3	0,1
HE/BA-8	15,3	4,4	0,5	0,2	0,1	<0,1
HE/BA-9	129,7	20,3	10,3	5,9	4,5	2,8

Legenda, HE/BA-1: 7,7 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-2: 38,6 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 20% sólidos totais; HE/BA-3: 23,0 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-4: 7,7 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-5: 38,6 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 10% sólidos totais; HE/BA-6: 1,4 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-7: 44,9 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/BA-8: 23,0 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 8% sólidos totais; HE/BA-9: 23,0 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 22% sólidos totais.

Em geral, os resultados da Tabela 18 revelam uma relação direta entre a viscosidade aparente e o rendimento de EqGlc, de modo que, quanto menor o rendimento, maior a viscosidade aparente. No entanto, este efeito é observado somente até cerca de 80% do substrato celulósico ter sido hidrolisado e, a partir de então, os valores de viscosidade aparente permanecem muito semelhantes, conforme visualizado nos experimentos HE/BA-5, HE/BA-7 e HE/BA-8 após 24 h de hidrólise. Além disso, todas as diferentes razões enzima/substrato aplicadas nos experimentos do planejamento experimental revelaram uma considerável redução nos valores de viscosidade aparente já nas primeiras 3 h de hidrólise, principalmente nos experimentos em que altas cargas enzimáticas foram utilizadas. Essas reduções foram de 81, 97 e 89% para os ensaios HE/BA-2, HE/BA-5 e HE/BA-7, respectivamente.

### 5.1.2 Pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$

O lote de bagaço de cana utilizado para os pré-tratamentos com o sistema  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  apresentou uma composição química ligeiramente diferente da obtida para o caso da explosão a vapor, conforme mostra a Tabela 19. Essas diferenças podem ser atribuídas à origem do material, ao grau de maturação da parede celular e ao processamento sofrido pelas fibras, uma vez que os métodos utilizados para a

caracterização foram idênticos. O teor total de polissacarídeos presentes nesse bagaço foi de aproximadamente 65%, sendo 38,5% referentes à glucanas. Por outro lado, quando comparado com o caso anterior, foram observados menores teores de lignina total, cinzas e compostos extraíveis. Cabe destacar que, nessa caracterização química, o percentual de lignina insolúvel em ácido foi corrigido pelo seu teor de cinzas e o teor de lignina solúvel em ácido foi quantificado no comprimento de onda de 320 nm, onde a influência dos compostos furânicos é menor. Assim, possivelmente, o valor de lignina total obtido é mais representativo daquilo que se encontra presente na composição do bagaço de cana não tratado.

**Tabela 19.** Composição química do bagaço de cana nativo utilizado nos pré-tratamentos com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

<b>Componente</b>	<b>Percentual (%)</b>
Anidroglicose <sup>1</sup>	38,5 ± 0,0
Anidroxilose <sup>2</sup>	23,7 ± 0,1
Anidroarabinose <sup>2</sup>	2,2 ± 0,0
Grupo acetila <sup>2</sup>	4,8 ± 0,1
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,4 ± 0,0
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	1,4 ± 0,0
Lignina total <sup>5</sup>	20,6 ± 0,2
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	0,4 ± 0,0
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	20,2 ± 0,2
Cinzas	3,7 ± 0,1
Extraíveis totais	4,2 ± 0,4
<i>Extraíveis em água</i>	2,7 ± 0,2
<i>Extraíveis em etanol</i>	1,5 ± 0,2
<b>Total</b>	<b>99,3</b>

<sup>1</sup>Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

Os pré-tratamentos do bagaço de cana com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O foram realizados para avaliar o efeito da temperatura e do tempo de reação, mantendo-se fixa a quantidade de CO<sub>2</sub> adicionada (50 bar). As condições inicialmente empregadas foram baseadas em estudos preliminares realizados e trabalhos de outros autores (MAGALHÃES DA SILVA *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2014; RELVAS *et al.*, 2015). Os

experimentos foram organizados na forma de um planejamento experimental Doehlert, que como os planejamentos compostos centrais, permite a visualização da região de maior ou menor resposta da variável avaliada. A principal vantagem da utilização desse tipo de planejamento é a necessidade de poucos pontos experimentais para sua aplicação com alta eficiência.

O FSC foi calculado para todas as condições reacionais utilizando o pH obtido na fração solúvel em água após o pré-tratamento. No entanto, o efeito do CO<sub>2</sub> dissolvido na fase líquida em alta pressão durante o pré-tratamento (ácido carbônico gerado *in situ*), não é considerado nesses valores de pH, uma vez que, após a despressurização do sistema, o equilíbrio de formação do ácido carbônico é deslocado no sentido da liberação de CO<sub>2</sub> na fase gasosa. Por isso, a equação empírica desenvolvida por VAN WALSUM (2001) foi utilizada para determinar o valor do pH no momento da reação, considerando a solubilidade e a pressão parcial do CO<sub>2</sub> na temperatura reacional. O fator de severidade que utiliza o valor do pH teórico da reação foi denominado de FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub>. Os resultados de ambos os fatores de severidade calculados são mostrados na Tabela 20 e para uma melhor visualização, tais condições reacionais foram organizadas em ordem crescente.

**Tabela 20.** Fatores de severidade após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço de cana.

Experimento	Condições		log R <sub>o</sub> <sup>1</sup>	pH medido <sup>2</sup>	FSC <sup>3</sup>	pH teórico <sup>4</sup>	FSC <sub>CO<sub>2</sub></sub> <sup>5</sup>
	T (°C)	t (min)					
BC-5	170	1,0	2,59	3,31	-0,72	3,61	-1,02
BC-3	160	7,5	2,75	3,00	-0,25	3,60	-0,85
BC-6	190	1,0	3,11	2,95	0,16	3,74	-0,64
BC-7	170	14,0	3,28	2,79	0,49	3,62	-0,34
BC-1	180	7,5	3,34	2,86	0,48	3,67	-0,33
BC-4	190	14,0	3,86	2,77	1,09	3,74	0,12
BC-2	200	7,5	3,93	2,70	1,23	3,79	0,14

<sup>1</sup> log R<sub>o</sub> é o fator de severidade desenvolvido por OVEREND *et al.* (1987);

<sup>2</sup> Média do pH obtido na fração solúvel em água após o pré-tratamento;

<sup>3</sup> FSC = log R<sub>o</sub> – pH medido,

<sup>4</sup> Média do pH calculado com a pressão parcial do CO<sub>2</sub> durante o pré-tratamento;

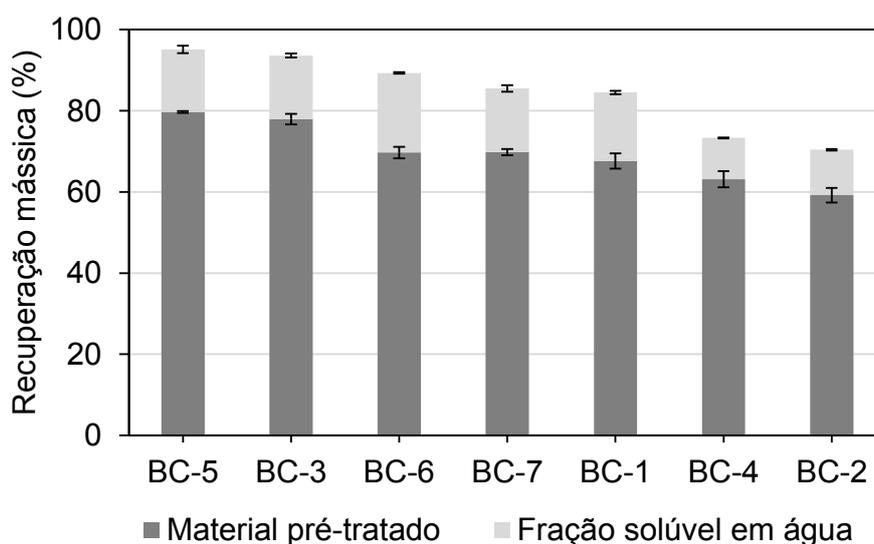
<sup>5</sup> FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub> = log R<sub>o</sub> – pH teórico.

Cabe destacar que nesses ensaios, diferentemente dos experimentos de explosão a vapor, o tempo de aquecimento e resfriamento do reator foram considerados no cálculo do log R<sub>o</sub>. Por exemplo, nos experimentos com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, foram

necessários cerca de 15 min para alcançar a menor temperatura reacional (160 °C), enquanto que nos pré-tratamentos por explosão a vapor, maiores temperaturas foram atingidas em torno de 40 s.

Os valores de pH da fração solúvel em água após os pré-tratamentos (pH medido) refletem a concentração de diferentes ácidos formados durante a reação, como o ácido acético (pKa = 4,75), o ácido fórmico (pKa = 3,77) e o ácido levulínico (pKa = 4,64), além de outros ácidos fenólicos mais fracos. Assim, os pré-tratamentos realizados nos maiores fatores de severidade (log R<sub>o</sub>) resultaram em menores valores de pH devido à formação desses ácidos em maiores concentrações. Por outro lado, o pH calculado no momento da reação (pH teórico) leva em consideração somente a presença do ácido carbônico (pKa = 6,10) formado pelo sistema de alta pressão. Nesse caso, o aumento da temperatura entre as diferentes condições reacionais diminuiu a solubilidade do CO<sub>2</sub> em água, resultando em valores de pH ligeiramente maiores. Portanto, os valores de FSC e FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub> estão diretamente relacionados com os valores de pH utilizados em cada caso (pH medido e teórico, respectivamente). Assim, pré-tratamentos mais severos são observados quando é utilizado o FSC, uma vez que esse engloba os diferentes ácidos formados durante o pré-tratamento, que são mais fortes do que o ácido carbônico.

A Figura 37 mostra que os rendimentos de recuperação mássica foram dependentes da severidade dos pré-tratamentos, onde os valores de FSC e de FSC<sub>CO<sub>2</sub></sub> estão organizados em ordem crescente.



**Figura 37.** Rendimentos de recuperação mássica nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço de cana. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

Em geral, as recuperações mássicas dos materiais pré-tratados diminuíram com o aumento da severidade. No entanto, a condição reacional BC-6 (FSC = 0,16) resultou em recuperações mássicas de fibras (69,7%) muito semelhante aos experimentos BC-7 e BC-1 de maior severidade (CSF = 0,49 e 0,48), cujas recuperações foram de 69,8 e 67,6%, respectivamente. A maior recuperação mássica da fração solúvel em água foi para a condição BC-6, enquanto que valores menores foram obtidos para os experimentos mais severos (BC-4 e BC-2). O rendimento de recuperação mássica total diminuiu de 95,1% para a condição de menor severidade (BC-5, FSC = -0,72) para 70,4% no experimento de maior severidade (BC-2, FSC = 1,23).

#### 5.1.2.1 Composição química dos materiais pré-tratados

A caracterização química das frações insolúveis em água derivadas das diferentes condições do planejamento experimental Doehlert estão apresentados na Tabela 21. Assim como observado nos experimentos de explosão a vapor, os teores de anidroglicose e de lignina aumentaram em relação aos percentuais observados no material nativo, enquanto que o conteúdo de hemiceluloses diminuiu consideravelmente. Por exemplo, com o aumento da severidade do pré-tratamento, o conteúdo de glucanas aumentou de 49,9% na condição de menor severidade (BC-5, FSC = -0,72) para 57,7% em FSC de 1,09 (BC-4). No entanto, o maior FSC de 1,23 (BC-2) resultou em uma diminuição do teor de anidroglicose para 52,9%. Embora pequena a diferença de FSC entre as duas condições reacionais mais severas (BC-4 e BC-2), a diminuição no teor de glucanas do bagaço pré-tratado foi de cerca de 8%. Isso pode estar associado ao fato da reação BC-2 ter sido realizada em 200 °C, enquanto que a temperatura em BC-4 foi de 190 °C. Essa pequena diferença de 10 °C pode ser muito significativa para a cinética da reação, como observado nos trabalhos de GARROTE *et al.* (2001) e AGUILAR *et al.* (2002). Esses os autores verificaram que a temperatura do pré-tratamento é o fator governante na extensão da reação de hidrólise dos polissacarídeos durante processos hidrotérmicos catalisados por ácido. Em relação à hidrólise das hemiceluloses para a fração solúvel em água, constatou-se que cerca de 83% das xilanas presentes no bagaço foram hidrolisadas durante o pré-tratamento nas condições mais severas BC-4 e BC-2. Por outro lado, apenas 29% das xilanas foram removidas no pré-tratamento de menor severidade BC-5.

**Tabela 21.** Composição química da fração insolúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço de cana.

Componente	Percentual (%)													
	BC-5	BC-3	BC-6	BC-7	BC-1	BC-4	BC-2	BC-5	BC-3	BC-6	BC-7	BC-1	BC-4	BC-2
Anidroglicose <sup>1</sup>	49,9 ± 0,4	50,3 ± 0,8	55,5 ± 0,4	56,6 ± 0,2	55,7 ± 0,2	57,7 ± 1,3	52,9 ± 0,5							
Anidroxilose <sup>2</sup>	16,9 ± 0,6	13,4 ± 0,1	9,0 ± 0,2	8,9 ± 0,7	8,1 ± 0,1	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,1							
Anidroarabinose <sup>2</sup>	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0							
Grupo acetila <sup>2</sup>	3,2 ± 0,1	2,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,1							
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0							
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0							
Lignina Total <sup>5</sup>	25,1 ± 0,8	27,9 ± 0,8	29,7 ± 0,5	29,1 ± 0,5	30,7 ± 0,1	34,7 ± 1,3	38,2 ± 1,1							
Lignina solúvel em ácido	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0							
Lignina insolúvel em ácido	24,7 ± 0,8	27,6 ± 0,7	29,3 ± 0,5	28,7 ± 0,5	30,2 ± 0,1	34,2 ± 1,3	37,6 ± 1,1							
Cinzas	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0							
Total	98,0	97,1	98,1	98,6	98,7	98,1	97,2							

Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

<sup>1</sup> Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup> Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

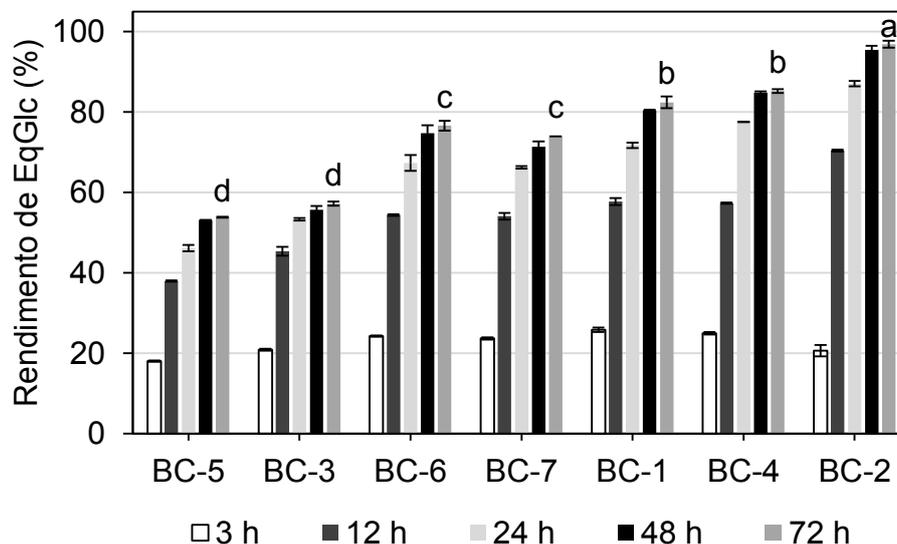
<sup>3</sup> Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup> Quantificado como furfural;

<sup>5</sup> Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído

### 5.1.2.2 Hidrólise enzimática do bagaço de cana nativo e dos materiais pré-tratados

A Figura 38 apresenta os resultados de hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados de acordo com o procedimento proposto pelo NREL. O rendimento de EqGlc em 72 h de hidrólise foi significativamente superior ( $p < 0,05$  no teste de Tukey) no experimento BC-2, que foi o de maior severidade (FSC = 1,23). Por outro lado, os pré-tratamentos mais brandos (BC-5 e BC-3) resultaram em rendimentos de EqGlc significativamente menores ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). Já a temperatura do pré-tratamento apresentou um grande efeito na acessibilidade enzimática. Por exemplo, os materiais BC-7 e BC-1 foram produzidos em FSC semelhantes (0,49 e 0,48, respectivamente), porém, um maior rendimento de EqGlc em 72 h de hidrólise foi observada no experimento realizado na maior temperatura reacional (180 °C para o BC-1 e 170 °C para o BC-7). A mesma observação também pode ser verificada nos experimentos BC-4 e BC-2, em que as temperaturas empregadas foram de 190 e 200 °C. Além disso, o material BC-6 (FSC = 0,16) apresentou um rendimento de EqGlc semelhante quando comparado ao experimento de maior severidade BC-7 (FSC = 0,49), fato que mais uma vez pode estar associado à temperatura utilizada no pré-tratamento (190 °C para o BC-6 e 170 °C para o BC-7).

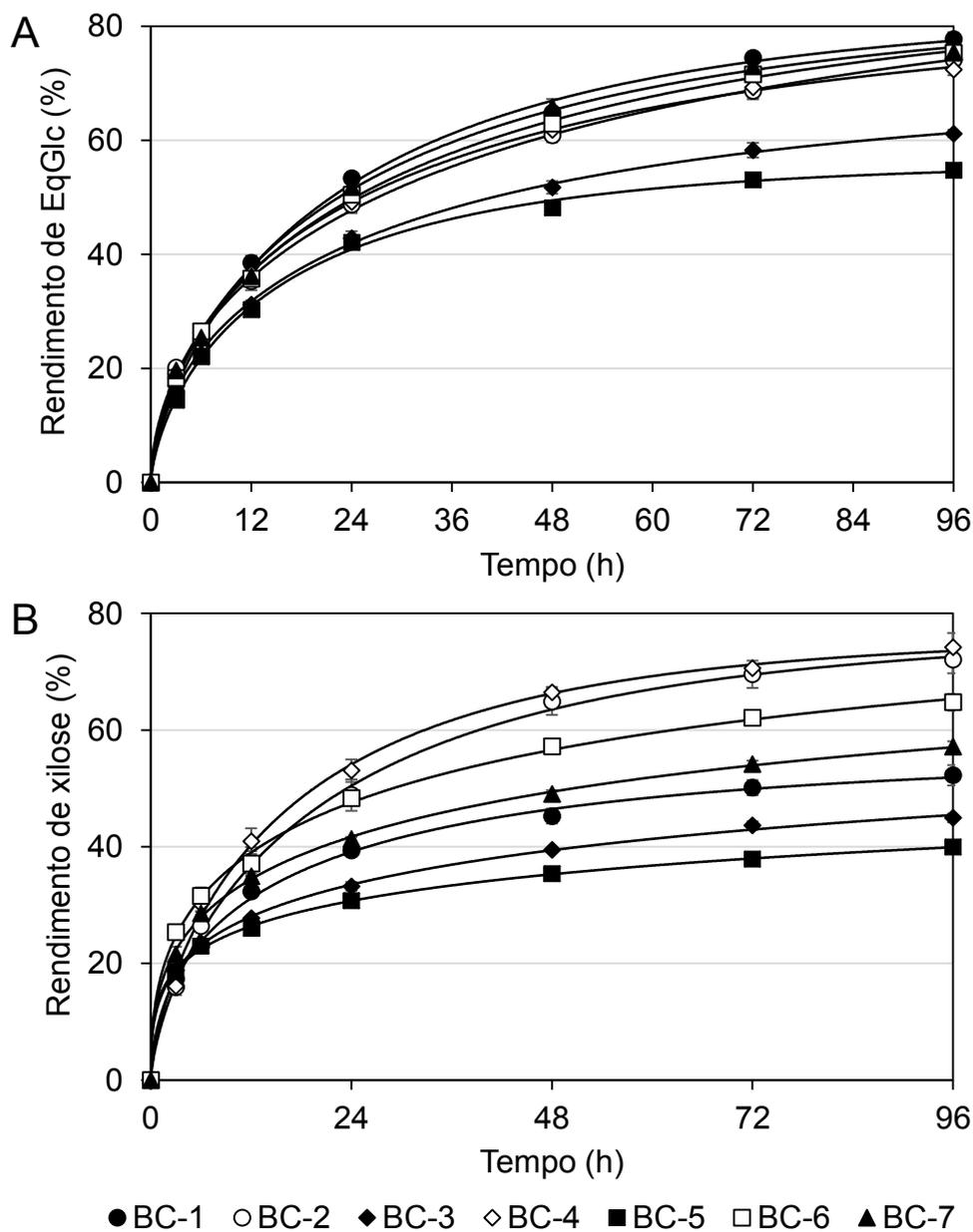


**Figura 38.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições do sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Condições da hidrólise enzimática: 2% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

Assim como para os materiais pré-tratados por explosão a vapor, ensaios de hidrólise enzimática dos substratos produzidos pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O foram também realizados na condição de 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas. No entanto, esses experimentos de hidrólise foram suplementados pela adição de um complexo hemicelulásico comercial (176,5 mg de Cellic Htec3 g<sup>-1</sup> de xilanas), uma vez que os materiais produzidos nas menores severidades apresentaram altos teores de hemiceluloses (Tabela 21). O perfil de hidrólise de glucanas e xilanas, ajustado pelo modelo cinético fractal, estão mostrados na Figura 39. Geralmente, os maiores rendimentos são obtidos para os materiais produzidos nas condições mais severas de pré-tratamento, visto que estes resultam em maiores modificações na estrutura e na composição química da parede celular. Porém, o maior rendimento de EqGlc (cerca de 78%) foi obtida para o material BC-1 (FSC = 0,48), enquanto que os materiais produzidos em condições mais severas revelaram rendimentos ligeiramente inferiores (72% para BC-4 e 74% para BC-2).

Uma hipótese para a diminuição dos rendimentos EqGlc em condições mais severas é a transformação e realocação da lignina sobre as fibras celulósicas durante o pré-tratamento, que conseqüentemente reduzem a eficiência da hidrólise por meio da adsorção não produtiva de enzimas celulolíticas (ALVIRA *et al.*, 2010). Além disso, alguns trabalhos relatam que a diminuição de eficiência da hidrólise enzimática também está associada com o aumento da concentração de compostos fenólicos derivados de lignina e à inibição pelos produtos da reação, como glucose e celobiose (TEJIRIAN e XU, 2011; XIMENES *et al.*, 2011). De fato, os materiais BC-4 e BC-2 apresentaram, após 96 h de hidrólise, 77 e 67 g L<sup>-1</sup> de EqGlc, contendo cerca de 3,5 g L<sup>-1</sup> de celobiose, respectivamente. Portanto, essas concentrações de celobiose podem representar um certo nível de inibição para as celobioidrolases, conforme observado pelos estudos de TEUGJAS e VÄLJAMÄE (2013), em que 0,9 g L<sup>-1</sup> de celobiose já provocou um pequeno grau de inibição das celobioidrolases de *T. reesei*.

A Figura 39A também revela que o bagaço de cana pré-tratado nas condições de menor severidade (BC-5 e BC-3) apresentou um desempenho enzimático consideravelmente menor, que pode ser atribuído à limitações na hidrólise das xilanas. De acordo com MENG e RAGAUSKAS (2014), as hemiceluloses são geralmente depositadas na superfície externa das fibras de celulose, mas também são difundidas nos poros e espaços inter-fibrilares. Portanto, o maior teor de hemiceluloses, presente nesses dois materiais pré-tratados (21,0 e 17,3%, respectivamente), pode ter prejudicado a hidrólise das glucanas, uma vez que melhores desempenhos foram observados para os materiais produzidos em condições de pré-tratamento mais severos, cujo teor de hemiceluloses era inferior a 11,7%.



**Figura 39.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado sob as diferentes condições do sistema  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

A Tabela 22 apresenta os parâmetros cinéticos fractais  $k$  e  $h$  da hidrólise de glucanas e xilanas, assim como os seus respectivos valores de  $R^2$ . Em geral, os valores do parâmetro  $k$  para glucanas e xilanas foram semelhantes entre as diversas condições

de pré-tratamento, indicando que, independentemente da severidade, a velocidade de reação nos estágios iniciais de hidrólise foram semelhantes. Por outro lado, os resultados obtidos para o parâmetro fractal  $h$  na hidrólise das glucanas foi dependente da severidade dos pré-tratamentos, ou seja, os valores de  $h$  diminuíram com o aumento da severidade, exceto para as duas condições mais severas. Os maiores valores de  $h$  obtidos para as condições de menor severidade (BC-5 e BC-3) são facilmente visualizados pelos piores desempenhos de rendimentos de EqGlc na Figura 39A. Já os ligeiros acréscimos nos valores de  $h$  para materiais produzidos em condições mais severas (BC-4 e BC-2) podem estar relacionados com os seus maiores teores de lignina (Tabela 21), assim como outras possíveis mudanças estruturais desse componente, que diminui a disponibilidade e a acessibilidade das glucanas. Em relação ao parâmetro  $h$  para a hidrólise das xilanas, os valores obtidos seguiram as mesmas tendências descritas anteriormente, com uma diminuição substancial dos valores de  $h$  para as condições BC-4 e BC-2 de maior severidade.

**Tabela 22.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática dos diferentes materiais produzidos pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

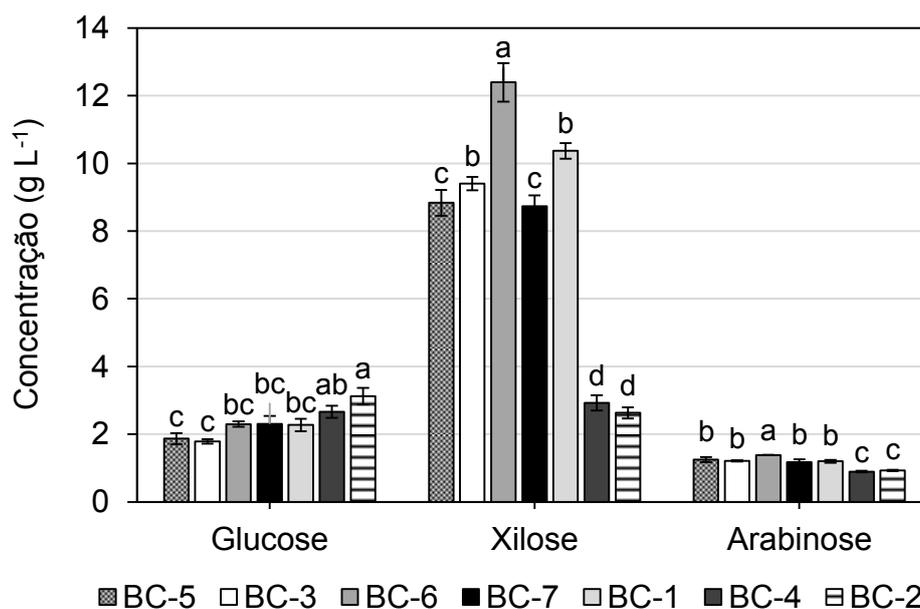
Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>
BC-5	0,121	0,571	0,983	0,161	0,746	0,999
BC-3	0,117	0,532	0,996	0,153	0,696	0,999
BC-6	0,113	0,440	0,999	0,192	0,622	0,998
BC-7	0,114	0,433	0,996	0,177	0,654	0,999
BC-1	0,105	0,402	0,995	0,144	0,632	0,991
BC-4	0,124	0,475	0,998	0,135	0,476	0,988
BC-2	0,116	0,460	0,999	0,114	0,451	0,993

Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

### 5.1.2.3 Composição química das frações solúveis em água

As frações solúveis em água derivadas dos pré-tratamentos do planejamento Doehlert foram caracterizadas quanto as suas composições em carboidratos, ácidos alifáticos e derivados furânicos. Os carboidratos foram quantificados após reação de pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído, uma vez que estavam presentes no meio reacional como oligossacarídeos, principalmente nas condições de menor severidade. Como é possível observar na Figura 40, as concentrações de xilose e arabinose foram maiores para a condição BC-6 ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), a qual apresentou um FSC

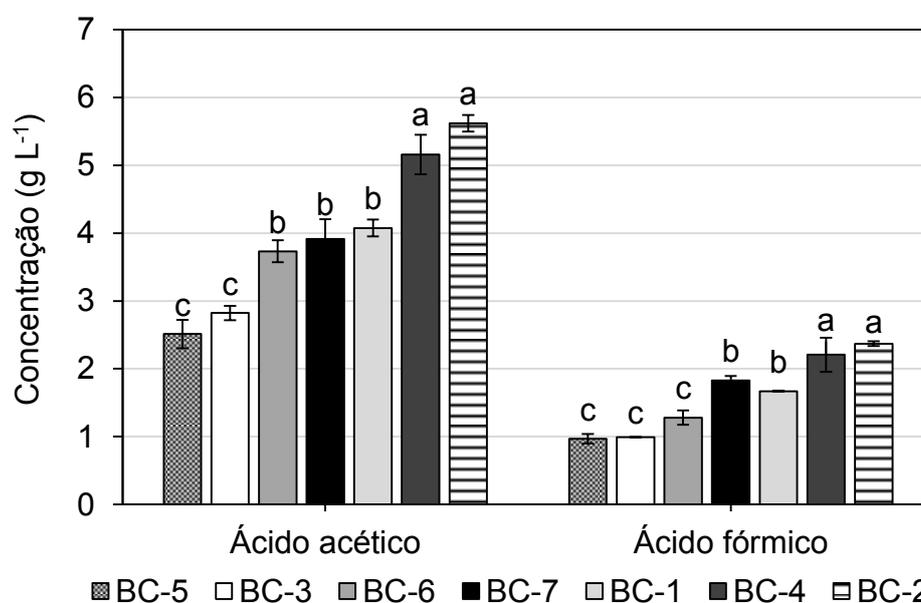
de 0,16. O aumento no FSC para valores acima de 1 (condições BC-4 e BC-2), causou uma diminuição da concentração dessas pentoses, provavelmente pela ocorrência de reações posteriores de desidratação e condensação. Por outro lado, as concentrações de glucose aumentaram com o aumento da severidade, alcançando  $2,9 \text{ g L}^{-1}$  ( $p < 0,05$  no teste de Tukey) nas condições de maior FSC. Esse comportamento revela que as glucanas sofreram hidrólise ácida em maior extensão nas condições reacionais de maior FSC.



**Figura 40.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de carboidratos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5:  $170 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 min; BC-3:  $160 \text{ }^\circ\text{C}$ , 7,5 min; BC-6:  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  e 1 min; BC-7:  $170 \text{ }^\circ\text{C}$  e 14 min; BC-1:  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  e 7,5 min; BC-4:  $190 \text{ }^\circ\text{C}$  e 14 min; BC-2:  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  e 7,5 min.

Os ácidos acético e fórmico foram os únicos ácidos alifáticos quantificados nas frações solúveis em água (Figura 41). O aumento da severidade dos pré-tratamentos causou um aumento progressivo da concentração desses componentes. No primeiro caso, a liberação de ácido acético revelou que as condições reacionais mais severas (BC-4 e BC-2) proporcionaram maior desacetilação das hemiceluloses ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), fato que também pode ser verificado com a diminuição dos grupos acetila presentes nos materiais pré-tratados (Tabela 21). A liberação de ácido acético na fração solúvel em água é um dos fatores mais importantes em pré-tratamentos hidrotérmicos, pois acelera as reações de hidrólise das hemiceluloses. Esse efeito é especialmente visível em biomassas altamente acetiladas como a madeira do álamo, onde o efeito

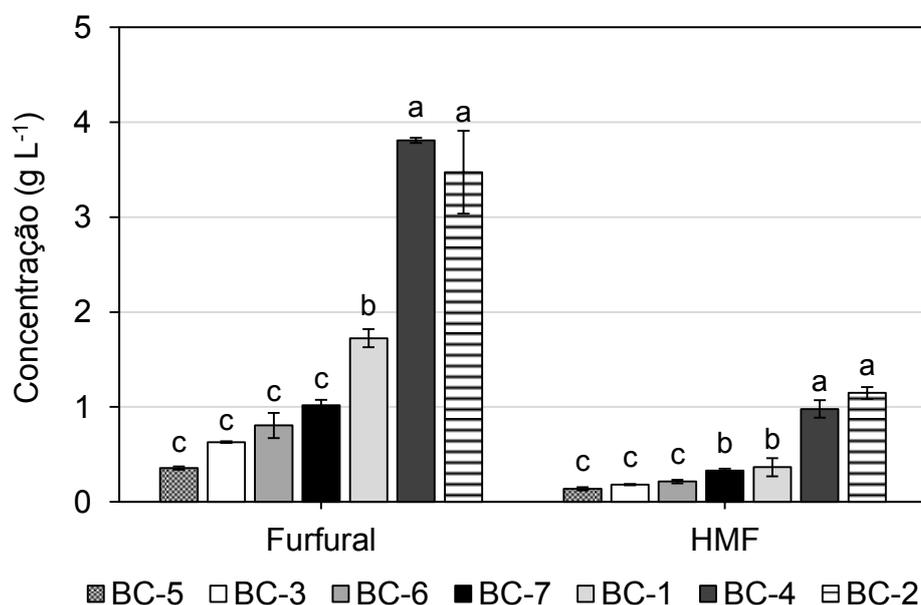
catalítico adicional do CO<sub>2</sub> na hidrólise das hemiceluloses não foi observado em temperaturas de 180 a 220 °C (MCWILLIAMS e VAN WALSUM, 2002). A formação do ácido fórmico tem origem na reidratação de compostos furânicos, como o HMF e furfural. Assim, o aumento da severidade dos pré-tratamentos causou um aumento na concentração desse componente, alcançando nas condições BC-4 e BC-2 valores maiores que 2 g L<sup>-1</sup> ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). A ausência de ácido levulínico, que estava abaixo do limite de detecção para todas as condições reacionais, sugeriu que o HMF não sofreu reação de reidratação após ser formado, uma vez que não foram observadas quantidade equimolares dos ácidos fórmico e levulínico. No entanto, cabe destacar que o ácido levulínico pode ter participado de reações paralelas de condensação, o que explicaria a sua ausência na composição das frações solúveis em água.



**Figura 41.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de ácidos alifáticos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

Assim como para os ácidos acima relacionados, a concentração de compostos furânicos aumentou com a severidade dos pré-tratamentos realizados (Figura 42). As condições BC-4 e BC-2 revelaram as maiores concentrações de furfural e HMF ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), com valores médios de 3,7 e 1,1 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim,

houve um aumento de 10 vezes para o furfural e de 8 vezes para o HMF em comparação à concentração desses componentes no experimento de menor severidade (BC-5).



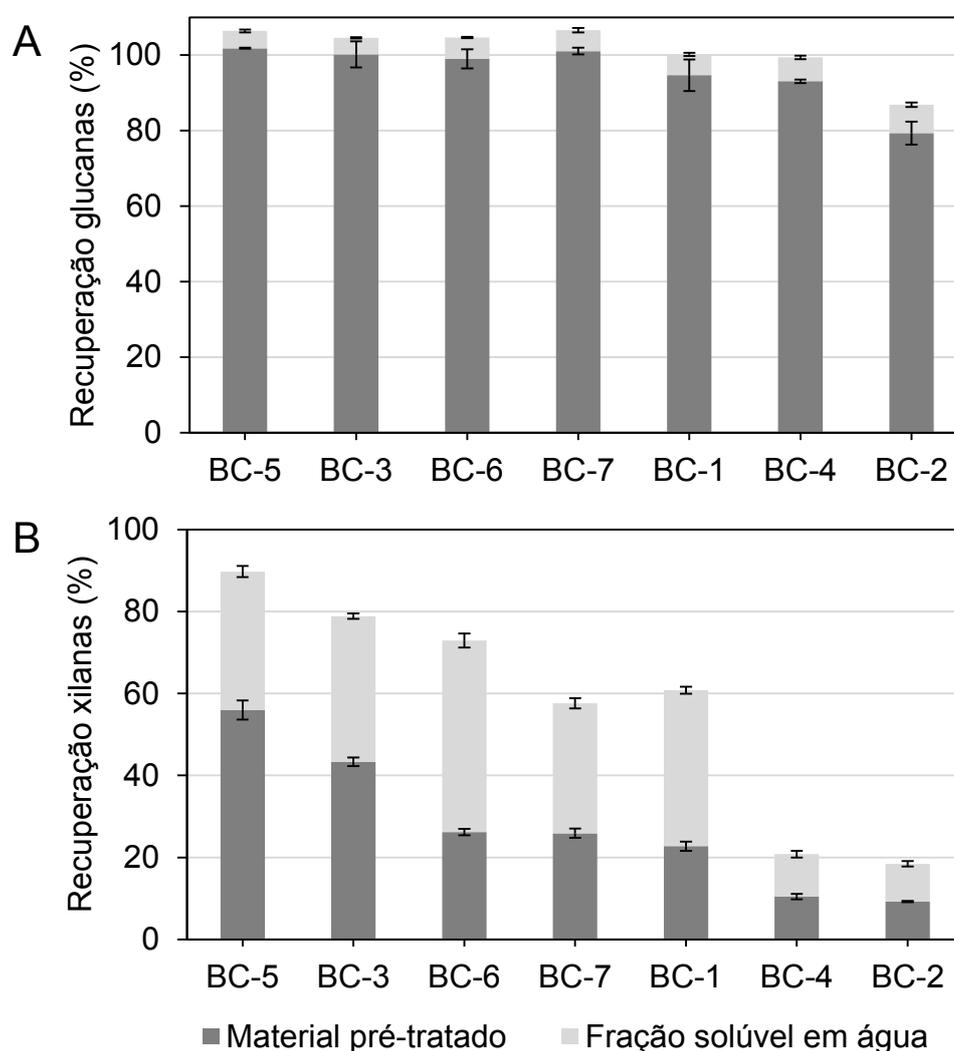
**Figura 42.** Composição química da fração solúvel em água em relação ao conteúdo de derivados furânicos. As mesmas letras acima das barras para cada composto não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

#### 5.1.2.4 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos

As recuperações de todos os constituintes do bagaço de cana após os pré-tratamentos com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, estão representados na Tabela A2.1 (página 210), enquanto que a Figura 43 mostra a recuperação dos principais polissacarídeos (glucanas e xilanas) nas frações insolúvel e solúvel em água. Com exceção do experimento de maior severidade BC-2 (FSC = 1,23), a recuperação das glucanas nos materiais pré-tratados foi sempre superior a 90%, com menos de 6% de glucanas recuperadas na fração solúvel em água (Figura 43A).

Por sua vez, a recuperação de xilanas diminuiu consideravelmente com o aumento da severidade, sendo de apenas 20% nas frações solúveis em água dos experimentos BC-4 e BC-2 (Figura 43B). Esses menores rendimentos estão associados a reações de degradação e de condensação para formação de huminas. A estrutura química das huminas, assim como o mecanismo da sua formação, não são completamente elucidados. Postula-se, no entanto, que diversas reações químicas estão envolvidas na sua formação, como condensação aldólica, formação de

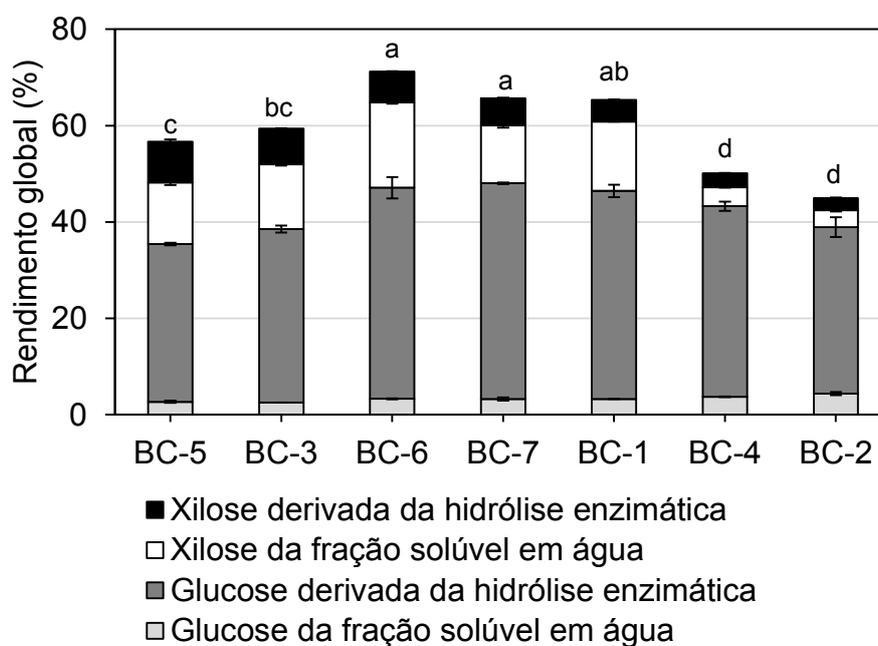
hemiacetais e cetais, e substituição eletrofílica aromática no anel furânico. Vários compostos, como carboidratos, ácidos alifáticos e compostos furânicos podem contribuir à formação desses sólidos escuros e insolúveis em meio aquoso (PATIL e LUND, 2011). Por exemplo, DEE e BELL (2011) mostraram que em temperaturas superiores a 180 °C, a formação das huminas ocorre predominantemente com derivados furânicos e ácido levulínico devido à grande ocorrência de reações de desidratação de carboidratos nessa temperatura. Por outro lado, em temperaturas inferiores a 180 °C, a reação de desidratação não é favorecida, gerando sólidos insolúveis em água (considerados como huminas) com maiores proporções de carboidratos em sua estrutura.



**Figura 43.** Recuperação de (A) glucanas e (B) xilanas nos materiais pré-tratados e frações solúveis em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço da cana. Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

### 5.1.2.5 Rendimento global de açúcares

O desenvolvimento de processos para a conversão da biomassa em produtos de valor agregado está diretamente relacionado com o gasto energético na etapa de pré-tratamento e na redução da carga enzimática na hidrólise enzimática. Embora, ambas as etapas sejam cruciais à obtenção de um processo economicamente viável, muitos estudos avaliam os rendimentos alcançados em cada etapa separadamente. Por isso, é necessário fornecer esses resultados em conjunto. O balanço de massas global para todas as condições de pré-tratamento do planejamento Doehlert estão mostrados na Figura 44, em que são considerados os açúcares presentes na fração solúvel em água após o pré-tratamento e aqueles liberados por hidrólise enzimática do material pré-tratado na condição de 15% de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> glucanas na presença de hemicelulases exógenas.



**Figura 44.** Rendimento global de açúcares obtidos nas frações solúveis em água do pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e após 96 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3. As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05). Legenda, BC-5: 170 °C e 1 min; BC-3: 160 °C, 7,5 min; BC-6: 190 °C e 1 min; BC-7: 170 °C e 14 min; BC-1: 180 °C e 7,5 min; BC-4: 190 °C e 14 min; BC-2: 200 °C e 7,5 min.

A Figura 44 demonstra que os pré-tratamentos de severidade moderada (BC-6, BC-7 e BC-1) resultaram nos maiores rendimentos globais de açúcares ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). O desempenho inferior dos experimentos realizados sob FSC menor que 0,16 (BC-5 e BC-3) está relacionado com o menor efeito do pré-tratamento sobre a estrutura da parede celular. Por outro lado, os FSC maiores que 0,48 (BC-4 e BC-2) causaram a diminuição nos rendimentos devido a posterior degradação dos açúcares liberados no meio reacional durante o pré-tratamento.

#### 5.1.2.6 Análise estatística

O rendimento global de açúcares obtido após o pré-tratamento e hidrólise enzimática para todas as condições reacionais foram ajustados por um modelo matemático de segunda ordem, cujo significado estatístico foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 23. O erro puro, calculado a partir do erro experimental da duplicata de cada ponto do planejamento experimental, foi de 2,8% de acordo com o total da soma dos quadrados, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no teste F, o modelo é preditivo, uma vez que o F calculado é maior que o F tabelado dentro de 95% de confiança. Apesar da falta de ajuste ser ligeiramente significativa (F calculado maior que o F tabelado), o modelo proposto apresentou um alto valor de  $R^2$  explicado (0,87), que representa uma significativa parte do valor da máxima variância explicável (0,91). Isto expressa que 87% da variância foi explicada pelo modelo proposto e, portanto, foi utilizado para prever a condição ótima de pré-tratamento.

**Tabela 23.** Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento pelo sistema  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  e hidrólise enzimática do bagaço de cana.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
Regressão	1070,21	3	356,74	30,39	3,86	0,87	0,91
Resíduos	105,63	9	11,74				
Falta de ajuste	75,53	2	37,77	8,78	4,74		
Erro puro	30,10	7	4,30				
Total	1175,84	12					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

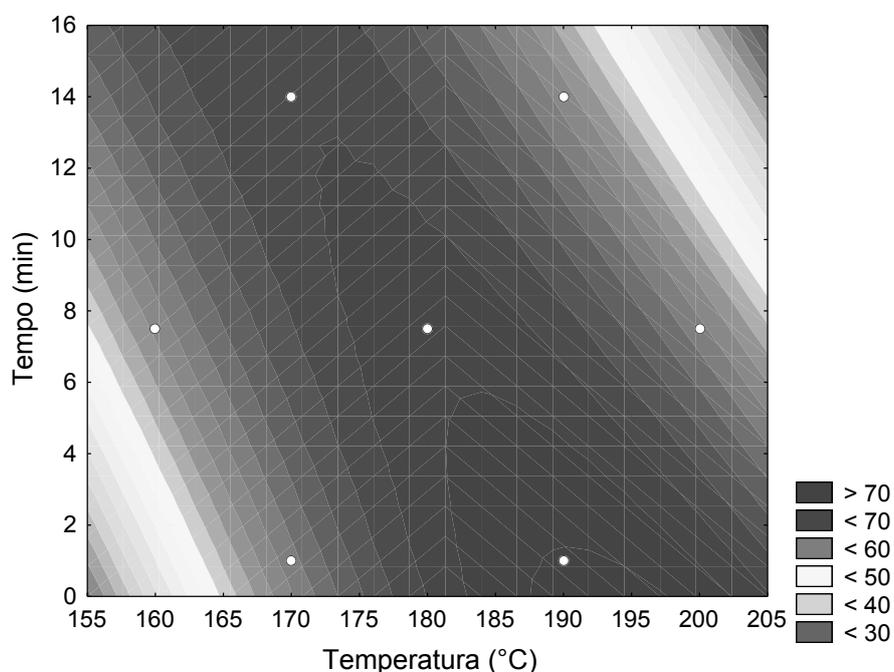
<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

O modelo codificado foi expresso pela Equação 16 e utilizado para construir o gráfico de contorno da Figura 45, em que T é a temperatura (°C) e t é o tempo (min).

$$\text{Rendimento global (\%)} = 66,95 - 4,90T - 4,10t - 13,37T^2 - 1,07t^2 - 18,45Tt \quad \text{Equação 16}$$

A análise da Figura 45 revela a existência de uma ampla faixa de condições ótimas, localizadas em altas temperaturas e curtos tempos de reação. A resolução da Equação 16 para a obtenção do máximo rendimento global de açúcar forneceu a condição de 190 °C durante 0 min para resultar em 73,4%. O tempo reacional de 0 min significa que após alcançar a temperatura de 190 °C, a reação é submetida ao resfriamento. Assim, essa condição reacional foi testada experimentalmente em duplicata e resultou em um FSC de -0,10. Os rendimentos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática foram coerentes aos esperados para este FSC. Por exemplo, a recuperação mássica foi de 86,7%, sendo 66,6% para o material pré-tratado e 20,1% para a fração solúvel em água. Além disso, não foram observadas perdas de glucanas após o pré-tratamento e aproximadamente 80% dessas foram convertidas em 72 h de hidrólise enzimática pelo procedimento padrão do NREL. Assim, o rendimento global de açúcar foi de 73,9%, revelando que o modelo proposto foi capaz de prever o resultado experimental com precisão.



**Figura 45.** Gráfico de contorno obtido para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e hidrólise enzimática do bagaço de cana.

O rendimento global de açúcar da condição experimental otimizada está na faixa dos encontrados na literatura. Por exemplo, MORAIS *et al.* (2014), em estudos com palha de trigo, obtiveram o melhor desempenho de pré-tratamento em 215 °C, 0 min e 54 bar de CO<sub>2</sub>, com um rendimento total de açúcares de 84,4%. Embora esse valor seja 10% superior ao obtido para o bagaço de cana, deve-se notar que as condições experimentais de hidrólise enzimática foram muito mais favoráveis, como 2% de sólidos totais e 60 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas.

#### 5.1.2.7 Comparação do sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O com outros processos hidrotérmicos

Como já mencionado anteriormente, o pré-tratamento com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O fornece dois efeitos na desconstrução da parede celular. O primeiro deles é relacionado com a formação do ácido carbônico *in situ*, que atua como catalisador na hidrólise das hemiceluloses. O segundo é o efeito físico do CO<sub>2</sub> sob condições supercríticas, que pode promover uma desorganização estrutural da biomassa com aumento em sua área superficial e porosidade. Portanto, para confirmar os efeitos supracitados, o pré-tratamento com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O na condição otimizada (190 °C e 0 min) foi comparado com um sistema reacional idêntico sem a presença do CO<sub>2</sub> (condição de auto-hidrólise) e com a substituição do CO<sub>2</sub> pelo N<sub>2</sub> (sistema N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O). A condição de auto-hidrólise foi utilizada para verificar o efeito causado pelo CO<sub>2</sub> na hidrólise das hemiceluloses. Em contrapartida, o uso de um gás inerte como o N<sub>2</sub> foi útil para verificar o efeito físico do CO<sub>2</sub> sobre a composição química e acessibilidade da biomassa à ação enzimática.

A comparação da composição química das frações solúveis em água derivadas dos pré-tratamentos com os sistemas CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e auto-hidrólise é mostrada na Tabela 24. O pré-tratamento catalisado pelo ácido carbônico revelou uma extração muito maior das hemiceluloses para a fração solúvel em água, produzindo uma concentração de xilose cerca de duas vezes maior quando comparado com o ensaio de auto-hidrólise ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). Apesar disso, outros componentes também foram liberados em maiores concentrações no sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, como os produtos de desidratação dos carboidratos, HMF, furfural e ácido fórmico ( $p < 0,05$  no teste de Tukey). Resultados semelhantes foram relatados por MAGALHÃES DA SILVA *et al.* (2014) para o pré-tratamento da palha de trigo, em que o rendimento de pentoses na fração solúvel em água duplicou com o uso de CO<sub>2</sub> em comparação com um experimento realizado em condições equivalentes de auto-hidrólise.

**Tabela 24.** Composição da fração solúvel em água ( $\text{g L}^{-1}$ ) obtida após o pré-tratamento com os sistemas  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  e auto-hidrólise na condição de  $190\text{ }^\circ\text{C}$  por 0 min.

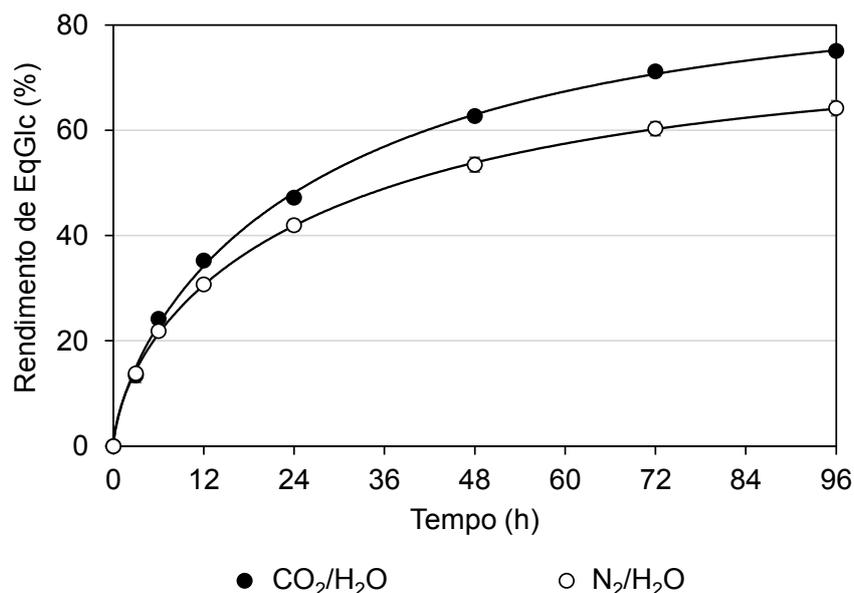
Componente	Concentração ( $\text{g L}^{-1}$ )	
	$\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$	Auto-hidrólise
Glucose	$2,4 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,0^b$
Xilose	$13,3 \pm 0,6^a$	$5,3 \pm 0,1^b$
Arabinose	$1,5 \pm 0,0^a$	$0,9 \pm 0,0^b$
Ácido acético	$2,1 \pm 0,1^a$	$0,4 \pm 0,0^b$
Ácido fórmico	$1,3 \pm 0,1^a$	$0,5 \pm 0,0^b$
HMF	$0,3 \pm 0,0$	ald
Furfural	$1,1 \pm 0,1$	ald

Legenda: ald, abaixo do limite de detecção.

Valores médios com as mesmas letras na mesma linha não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

O efeito físico do  $\text{CO}_2$  sobre a acessibilidade do material pré-tratado foi avaliado pelo mesmo procedimento de hidrólise enzimática anteriormente descrito, onde o modelo cinético fractal foi mais uma vez empregado para ajustar os dados experimentais. O perfil da hidrólise das glucanas presentes nos materiais pré-tratados pelos sistemas  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2/\text{H}_2\text{O}$  são mostrados na Figura 46, onde observa-se claramente um maior desempenho para o sistema baseado na injeção de  $\text{CO}_2$ . Além disso, o parâmetro fractal  $h$  confirma essa observação, com valores de 0,391 para o sistema  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  e 0,474 para o sistema  $\text{N}_2/\text{H}_2\text{O}$ .

Finalmente, na tentativa de visualizar os efeitos causados pelo pré-tratamento com  $\text{CO}_2$ , os três materiais produzidos em condições hidrotérmicas foram comparados em relação à composição química, índice de cristalinidade (CrI) e o rendimento de EqGlc em 96 h de hidrólise enzimática. Os resultados da Tabela 25 demonstraram que houve aumento do ICr com a diminuição do teor de hemiceluloses nos materiais pré-tratados. Além disso, os maiores rendimentos de EqGlc foram obtidos para os substratos de maior ICr (sistemas  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2/\text{H}_2\text{O}$ ). No entanto, é importante notar que os ICr relatados são referentes ao material como um todo e não refletem, necessariamente, a cristalinidade da celulose. Assim, a obtenção de maiores rendimentos de hidrólise está provavelmente relacionada a fatores que não estão sendo avaliados diretamente por DRX.



**Figura 46.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado pelos sistemas com CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.

**Tabela 25.** Composição química dos materiais pré-tratados pelos diferentes sistemas reacionais com seus respectivos valores de ICr e rendimentos de EqGlc após 96 h de hidrólise enzimática.

Condição	Composição química (%)			ICr (%) <sup>3</sup>	Rendimento de EqGlc (%) <sup>4</sup>
	Glucanas	Hemiceluloses <sup>1</sup>	Lignina <sup>2</sup>		
CO <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	61,0 ± 1,0 <sup>a</sup>	10,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	28,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	76,4 ± 2,0 <sup>a</sup>	75,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Auto-hidrólise	50,3 ± 0,5 <sup>b</sup>	27,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	24,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	66,1 ± 2,1 <sup>b</sup>	40,1 ± 0,7 <sup>c</sup>
N <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	62,7 ± 0,6 <sup>a</sup>	12,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	27,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	75,8 ± 2,0 <sup>a</sup>	64,2 ± 1,4 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Soma de anidroxilose, anidroarabinose e grupos acetila;

<sup>2</sup>Soma da lignina solúvel e insolúvel em ácido;

<sup>3</sup>Índice de cristalinidade;

<sup>4</sup>Rendimento obtido em 96 h de hidrólise enzimática na condição de 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3) suplementada com Cellic Htec3.

Valores médios com as mesmas letras na mesma coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey (p > 0,05).

Os materiais produzidos com a utilização de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> apresentaram as mesmas composições químicas e valores de ICr (p > 0,05 no teste de Tukey), mas foram observadas diferenças significativas nos valores de rendimento de EqGlc em 96 h de hidrólise (p < 0,05 no teste de Tukey). Portanto, a análise da composição química e do ICr dos materiais pré-tratados não foi suficiente para explicar o aumento do rendimento de EqGlc em experimentos realizados na presença de CO<sub>2</sub>. Provavelmente, imagens de

microscopia eletrônica de varredura (MEV) poderiam revelar diferenças estruturais entre os materiais pré-tratados por esses dois sistemas. Por exemplo, MORAIS *et al.* (2014) observaram por imagens de MEV que a palha de trigo pré-tratada com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (225 °C e 54 bar de CO<sub>2</sub>) levou a uma maior desorganização estrutural e aumentou a porosidade das fibras quando comparado com imagens do material pré-tratado na ausência do CO<sub>2</sub> (auto-hidrólise) na mesma temperatura reacional. No entanto, esses autores não avaliaram a morfologia de um material pré-tratado pelo sistema N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O para efeito de comparação. Além disso, não foram encontrados estudos comparando imagens de MEV de materiais pré-tratados pelos sistemas CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

## 5.2 PRÉ-TRATAMENTOS ALCALINOS DOS RESÍDUOS DO PROCESSAMENTO DO ALGODÃO

A grande maioria dos estudos de pré-tratamento realizados com resíduos derivados do algodão utilizam os materiais gerados durante a colheita, como os caules da planta (do inglês, *cotton stalk*). Esse tipo de material lignocelulósico apresenta em sua composição química menor teor de carboidratos e maior quantidade de lignina quando comparado com os resíduos gerados na indústria têxtil durante o beneficiamento das fibras de algodão. Isto significa que os métodos de pré-tratamento já desenvolvidos para os caules das plantas de algodão podem não ser efetivos para os resíduos de seu processamento. Por esse motivo, essa etapa do trabalho foi focada no desenvolvimento de metodologias de pré-tratamento para pó de filtro e piolho sujo, de modo a aumentar a acessibilidade desses durante a etapa de hidrólise enzimática. A primeira abordagem testada foi o pré-tratamento por explosão a vapor na condição de auto-hidrólise, nas condições de 180 e 210 °C por 10 min de reação. Embora os rendimentos de recuperação mássica após os pré-tratamentos foram satisfatórios (em torno de 82% para o pó de filtro e de 75% para o piolho sujo), o desempenho de hidrólise enzimática de ambos os substratos pré-tratados foi muito baixo, com menos de 10% de rendimento de EqGlc para a condição de hidrólise que utilizou 5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec2. Por esta razão, novos ensaios de pré-tratamento a vapor foram realizados com a adição de catalisadores para auxiliar o processo de desconstrução da estrutura supramolecular das fibras de algodão. Nesse sentido, foram aplicadas condições ácidas baseadas na impregnação com o ácido sulfúrico e condições alcalinas baseadas na impregnação com hidróxido de sódio. Uma vez mais, foram obtidos níveis de hidrólise inferiores a 20%, demonstrando que a opção pela explosão a vapor não é adequada para esses tipos de materiais. No entanto,

os substratos produzidos com o emprego do hidróxido de sódio resultaram em rendimentos de açúcares fermentescíveis ligeiramente superiores. Assim, novos experimentos de pré-tratamento baseados em reagentes alcalinos foram desenvolvidos de modo a superar a extrema recalcitrância da estrutura macromolecular das fibras de algodão.

Geralmente, métodos de pré-tratamento com catalisadores alcalinos englobam a utilização de amônia e dos hidróxidos de sódio e de cálcio (KAAR e HOLTZAPPLE, 2000; YOO *et al.*, 2011; DU *et al.*, 2013). As principais reações que ocorrem durante os pré-tratamentos alcalinos são a clivagem das ligações que unem a lignina e as hemiceluloses (complexos lignina-carboidrato, CLC) e a quebra de ligações aril-éter que unem as subestruturas da lignina, liberando ácidos fenólicos no meio reacional. A dissolução da lignina acarreta em mudanças na estrutura do material pré-tratado, como o aumento de sua área superficial e porosidade, que irão impactar diretamente o desempenho da etapa posterior de hidrólise enzimática.

A escolha do hidróxido de sódio para o pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão foi devida à capacidade desse em diminuir o grau de cristalinidade da celulose, propiciar alta remoção da lignina e altos rendimentos de açúcares para diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (WANG *et al.*, 2010b; JANU *et al.*, 2011; JAISAMUT *et al.*, 2013; BALI *et al.*, 2015; TREVORAH e OTHMAN, 2015). Por outro lado, o imidazol é um reagente recentemente relatado no estudo do pré-tratamento da palha de trigo e do capim elefante (MORAIS *et al.*, 2016; TOSCAN *et al.*, 2017b). Portanto, o número reduzido de trabalhos empregando o imidazol como agente de deslignificação instigou a avaliação de sua eficácia para a produção de açúcares fermentescíveis a partir dos resíduos do processamento do algodão.

#### 5.2.1 Pré-tratamento dos resíduos do algodão com hidróxido de sódio

A caracterização química dos resíduos do processamento do algodão que foram utilizados nos pré-tratamentos com hidróxido de sódio está mostrada na Tabela 26. Diferentemente de outros materiais lignocelulósicos, esses resíduos apresentaram altos teores de glucanas (medidas como anidroglicose), de 75,7% para o pó de filtro e de 56,8% para o piolho sujo. Além disso, o pó de filtro revelou percentuais menores de hemiceluloses (1,9%), lignina (10,5%) e extraíveis (6,5%) quando comparado ao piolho sujo, que apresentou 5,9% de hemiceluloses, 17,8% de lignina e 11,2% de extraíveis. Outros trabalhos da literatura relataram composições químicas distintas, porém, cabe destacar que nesses estudos não foi revelada a exata origem dos resíduos no processo industrial de processamento do algodão. Por exemplo, AGBLEVOR *et al.* (2003), relataram que o teor de celulose variou de 20 a 38% para resíduos de algodão oriundos

de cinco indústrias têxteis, enquanto que MCINTOSH *et al.* (2014) encontraram baixos teores de celulose (24 a 36%) e altos percentuais de extraíveis (26 a 28%) para três tipos de resíduos industriais do algodão. Tais variações no teor de glucanas podem ser atribuídas aos métodos de processamento, que resultaram em resíduos com quantidades variáveis de sementes, cascas e folhas.

**Tabela 26.** Composição química dos resíduos do processamento do algodão nativos utilizados nos pré-tratamentos com hidróxido de sódio.

Componente	Percentual (%)	
	Pó de filtro	Piolho sujo
Anidroglicose <sup>1</sup>	75,7 ± 0,1	56,8 ± 0,2
Anidroxilose <sup>2</sup>	1,6 ± 0,0	3,7 ± 0,0
Anidroarabinose <sup>2</sup>	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0
Grupo acetila <sup>2</sup>	ald	1,6 ± 0,1
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	1,2 ± 0,0	2,0 ± 0,0
Lignina total <sup>5</sup>	10,5 ± 0,1	17,8 ± 0,2
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	9,7 ± 0,1	16,9 ± 0,2
Cinzas	4,8 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Extraíveis totais	6,5 ± 0,5	11,2 ± 0,6
<i>Extraíveis em água</i>	5,4 ± 0,4	10,2 ± 0,5
<i>Extraíveis e etanol</i>	1,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Total	100,9	100,8

Legenda: ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup>Presente como componente das  $\beta$ -(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

Os pré-tratamentos dos dois resíduos do algodão (pó de filtro e piolho sujo) com hidróxido de sódio foram organizados na forma de planejamentos fatoriais do tipo 2<sup>2</sup>. Os fatores escolhidos para esse estudo foram a concentração do catalisador alcalino (2 e 4%) e a temperatura de reação (100 e 120 °C), sendo que o tempo foi mantido em 1 h. Esses experimentos serviram para avaliar o efeito das condições de pré-tratamento sobre a susceptibilidade dos materiais pré-tratados à hidrólise enzimática. As recuperações mássicas obtidas nos diferentes pré-tratamentos são mostradas na Tabela 27. Para o pré-tratamento do pó de filtro (nomeados PT/PF), os rendimentos

mássicos não alteraram com as mudanças de temperatura e concentração de hidróxido de sódio, considerando o desvio padrão obtido no ponto central (PT/PF-5). Por outro lado, os pré-tratamentos do piolho sujo (nomeados PT/PS) levaram a mudanças mais evidentes nos rendimentos mássicos. Em geral, os pré-tratamentos que empregaram as menores concentrações de álcali, denominados PT/PS-7 e PT/PS-9, revelaram valores de recuperação mássica ligeiramente maiores.

**Tabela 27.** Rendimentos de recuperação mássica dos resíduos de algodão após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Experimento	Condições experimentais		Recuperação mássica (%)
	[NaOH] (%)	Temperatura (°C)	
PT/PF-1	4	120	71,2
PT/PF-2	2	120	74,5
PT/PF-3	4	100	71,9
PT/PF-4	2	100	73,2
PT/PF-5	3	110	72,1 ± 1,7
PT/PS-1	4	120	53,1
PT/PS-2	2	120	61,3
PT/PS-3	4	100	49,4
PT/PS-4	2	100	67,0
PT/PS-5	3	110	57,5 ± 2,5

Legenda: PT/PF, pré-tratamento do pó de filtro; PT/PS, pré-tratamento do piolho sujo.

#### 5.2.1.1 Composição química dos materiais pré-tratados

As composições químicas dos substratos pré-tratados com hidróxido de sódio estão ilustradas nas Tabelas 28 e 29. Para todos os materiais pré-tratados, o conteúdo de glucanas foi maior quando comparado aos materiais nativos correspondentes, independentemente das condições reacionais de pré-tratamento. O teor de glucanas nos materiais pré-tratados derivados do pó de filtro aumentou de 75,7% para 89% em média (Tabela 28), enquanto que, para os materiais pré-tratados derivados do piolho sujo, esse aumento foi de 56,8% para 80% em média (Tabela 29). Tais resultados podem ser atribuídos aos rendimentos de extração da lignina, uma vez que o meio alcalino promove a quebra de ligações éster que unem a lignina a fragmentos de carboidratos e diminui a massa molar dessa pelo rompimento de ligações aril-éter do tipo  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4, facilitando assim a migração de fragmentos ionizados de lignina (fenolatos) para a fase aquosa (SINGH *et al.*, 2015).

**Tabela 28.** Composição química dos substratos produzidos a partir do pó de filtro após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Componente	Percentual (%)				
	PT/PF-1	PT/PF-2	PT/PF-3	PT/PF-4	PT/PF-5
Anidroglicose <sup>1</sup>	88,5 ± 0,1	87,7 ± 0,1	89,4 ± 0,6	88,7 ± 0,8	86,8 ± 1,0
Anidroxilose <sup>2</sup>	3,1 ± 0,2	3,8 ± 0,4	3,0 ± 0,1	3,7 ± 0,5	3,6 ± 0,2
Anidroarabinose <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Grupo acetila <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	0,6 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Lignina Total <sup>5</sup>	3,4 ± 0,1	4,1 ± 0,4	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,2	4,4 ± 0,6
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	1,3 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,7 ± 0,2
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	2,1 ± 0,0	2,5 ± 0,3	3,4 ± 0,0	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,4
Cinzas	0,8 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Total	97,0	97,9	99,2	99,9	96,9

Legenda, PT/PF-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5: 3% NaOH e 110 °C; ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup>Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

**Tabela 29.** Composição química dos substratos produzidos a partir do piolho sujo após as diferentes condições de pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Componente	Percentual (%)				
	PT/PS-1	PT/PS-2	PT/PS-3	PT/PS-5	PT/PS-5
Anidroglicose <sup>1</sup>	81,5 ± 0,2	80,5 ± 0,3	77,3 ± 0,2	77,4 ± 0,3	81,4 ± 0,5
Anidroxilose <sup>2</sup>	7,3 ± 0,1	7,9 ± 0,3	7,6 ± 0,6	7,4 ± 0,3	7,1 ± 0,3
Anidroarabinose <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Grupo acetila <sup>2</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,1
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	0,8 ± 0,0	0,95 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,5	1,0 ± 0,1
Lignina Total <sup>5</sup>	5,0 ± 0,5	6,2 ± 0,5	9,7 ± 0,7	9,8 ± 0,3	6,1 ± 0,9
Lignina solúvel em ácido	2,1 ± 0,0	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,0	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,2
Lignina insolúvel em ácido	2,9 ± 0,5	3,9 ± 0,2	7,4 ± 0,7	7,1 ± 0,1	3,6 ± 0,7
Cinzas	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2
Total	96,7	97,1	98,3	98,4	98,4

Legenda, PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C; ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup>Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

### 5.2.1.2 Hidrólise enzimática dos resíduos do algodão nativos e pré-tratados

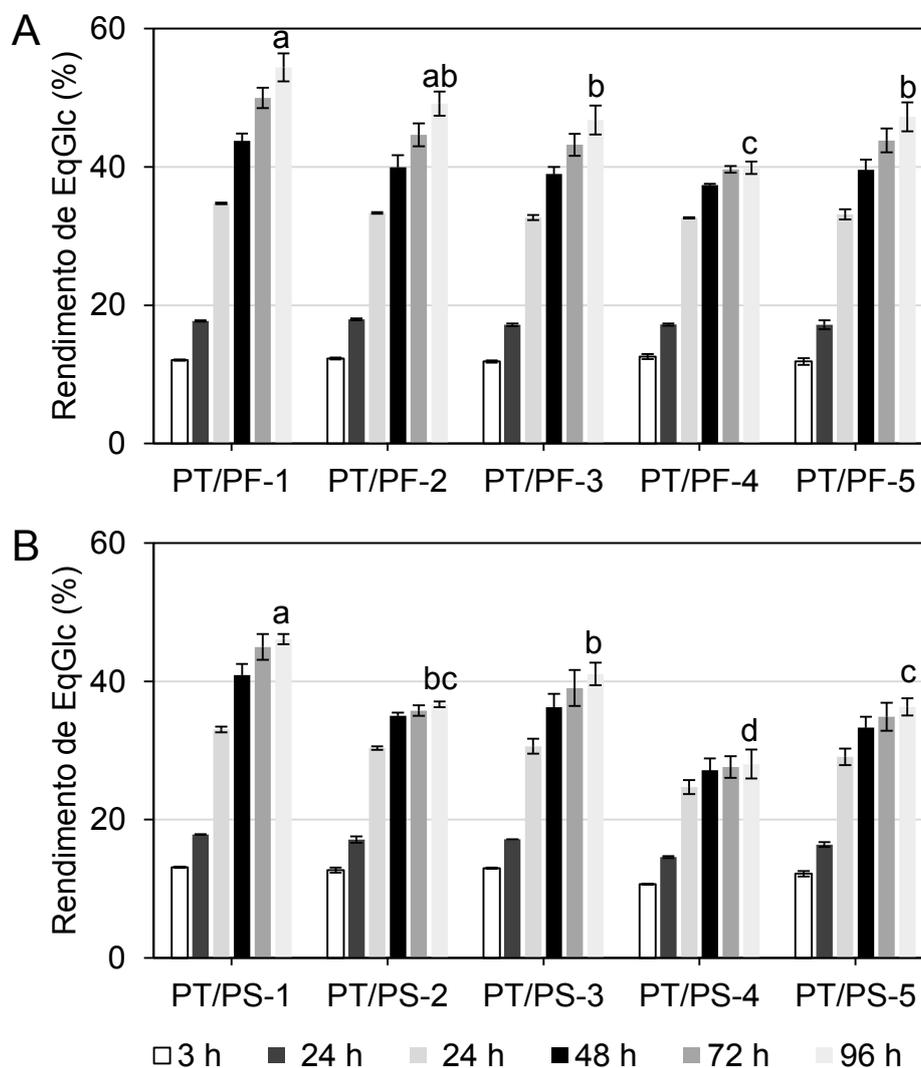
A avaliação da eficiência dos pré-tratamentos foi realizada por hidrólise enzimática dos materiais produzidos, empregando 5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas da preparação enzimática Cellic CTec2. Diferentemente do procedimento de hidrólise enzimática proposto pelo NREL, essa condição não maximizou a hidrólise das glucanas, mas foi útil para examinar os efeitos causados pelas diferentes condições reacionais sobre a suscetibilidade à hidrólise dos materiais pré-tratados. Os resultados estão representados na Figura 47, em que o teste de Tukey no intervalo de confiança de 95% foi utilizado para avaliar as diferenças observadas após 96 h de hidrólise.

Os materiais pré-tratados derivados do pó de filtro (Figura 47A) apresentaram resultados similares de rendimento de EqGlc até 24 h de hidrólise. Contudo, em 96 h, o experimento PT/PF-1 (120 °C e 4% NaOH) revelou o maior rendimento de EqGlc, alcançando 54,4% em relação à composição química do material de origem. No entanto, este valor não diferiu significativamente ( $p > 0,05$  no teste de Tukey) do pré-tratamento PT/PF-2 (120 °C e 2% NaOH), no qual foi obtido um rendimento de EqGlc de 49,2%. O aumento no rendimento de EqGlc para o PT/PF-1 foi de 386% em relação ao pó de filtro nativo utilizado como controle, que apresentou somente 11,2% de rendimento de EqGlc. Para o pré-tratamento alcalino do piolho sujo (Figura 47B), as diferenças nos rendimentos de EqGlc já aparecem nas primeiras 3 h de hidrólise. A condição mais severa, denominada PT/PS-1 (120 °C e 4% NaOH), diferiu significativamente ( $p < 0,05$  no teste de Tukey) em relação às demais condições, atingindo 46,1% de rendimento de EqGlc em 96 h de hidrólise. Assim, essa condição apresentou um aumento de 620% no rendimento de EqGlc em relação ao piolho sujo nativo, cujo resultado de hidrólise foi de apenas 6,4%.

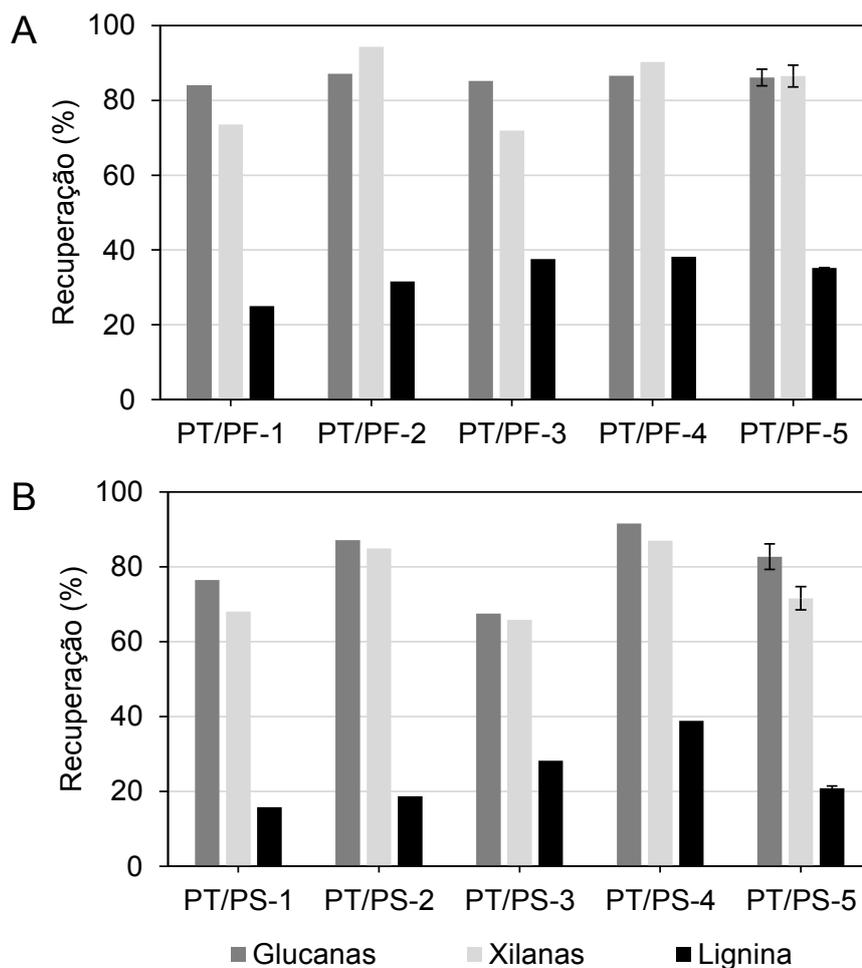
### 5.2.1.3 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos

A recuperação dos principais componentes dos resíduos do processamento do algodão, após a realização dos pré-tratamentos com hidróxido de sódio, estão representadas na Figura 48. Para o pó de filtro pré-tratado (Figura 48A), a mesma quantidade de glucanas foi recuperada como resultado das diferentes condições de pré-tratamento, considerando o desvio padrão de 1,6% que foi obtido no ponto central do planejamento. Por outro lado, a recuperação de xilanas foi dependente da concentração de NaOH utilizada, de modo que os pré-tratamentos com 4% de NaOH (PT/PF-1 e PT/PF-3) resultaram em menores percentuais de recuperação de xilanas nos materiais pré-tratados. A recuperação de lignina está relacionada com o grau de deslignificação que os materiais sofreram. As maiores deslignificações foram observadas para os pré-

tratamentos realizados nas temperaturas mais altas (PT/PF-1 e PT/PF-2), alcançando 75% de lignina removida na condição mais severa (120 °C e 4% NaOH).



**Figura 47.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática para o (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com hidróxido de sódio sob as diferentes condições descritas na Tabela 3. Condições da hidrólise enzimática: 5% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 8,8 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec2). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.



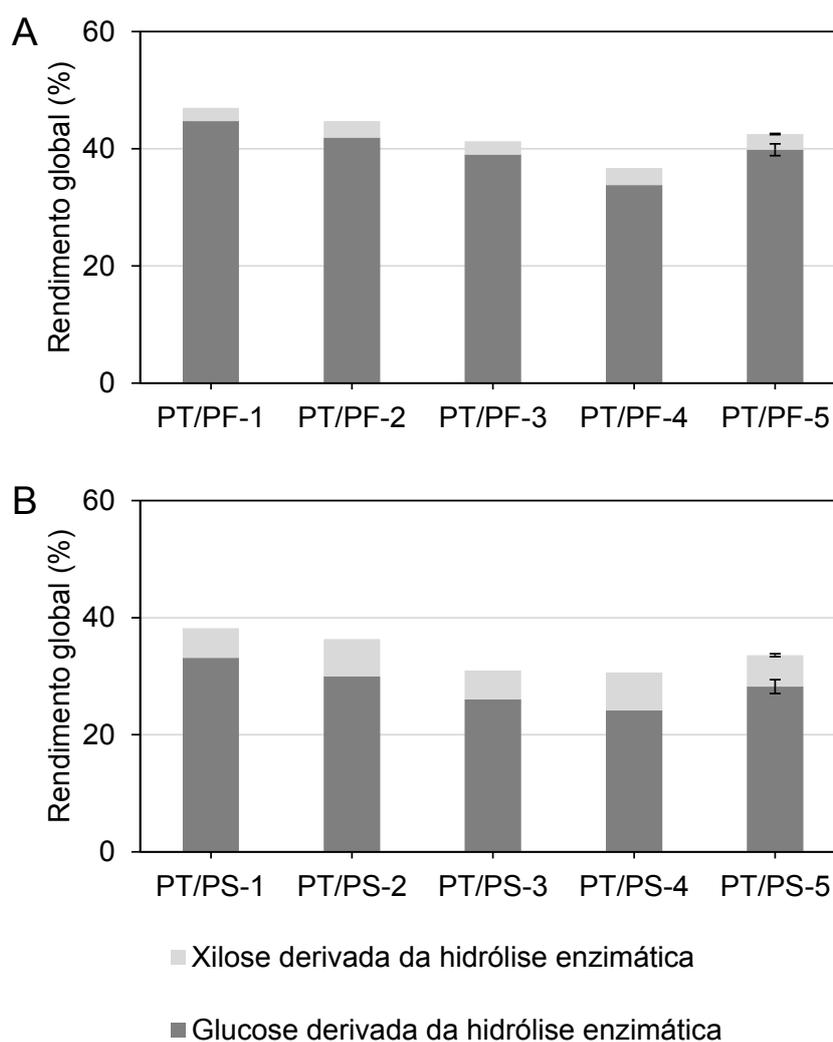
**Figura 48.** Recuperação dos principais componentes para os materiais derivados do (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com imidazol sob as diferentes condições reacionais descritas na Tabela 3. Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.

O pré-tratamento do piolho sujo levou a mudanças mais evidentes na recuperação de seus componentes macromoleculares (Figura 48B). As condições que empregaram as menores concentrações do catalisador alcalino, tais como PT/PS-2 e PT/PS-4, resultaram em materiais com maiores recuperações de glucanas e xilanas. Assim como para o pó de filtro, a extração da lignina também foi mais eficiente sob altas temperaturas mais altas (120 °C), resultando em 84% de deslignificação no material PT/PS-1 (120 °C e 4% NaOH). Resultados semelhantes foram obtidos por SILVERSTEIN *et al.* (2007), que obtiveram 65,6% de remoção de lignina após o pré-tratamento de resíduos derivados da colheita do algodão (caules) com 2% de NaOH, 90 min e 121 °C. Por outro lado, VARGA *et al.* (2002) relataram mais de 95% de deslignificação para o pré-tratamento da palha de milho com 10% de NaOH, 60 min e

120 °C. Nesse caso, a maior remoção de lignina foi provavelmente associada ao tipo de material lignocelulósico empregado e ao uso de maiores concentrações de NaOH durante o pré-tratamento.

#### 5.2.1.4 Rendimento global de açúcares

O rendimento global de açúcares para os pré-tratamentos com hidróxido de sódio de ambos os resíduos do algodão estão mostrados na Figura 49.



**Figura 49.** Rendimento global de açúcares solúveis após 96 h de hidrólise enzimática do (A) pó de filtro e (B) piolho sujeito pré-tratados com hidróxido de sódio. Condições de hidrólise: 5% ( $m\ v^{-1}$ ) de sólidos totais e 8,8 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec2). Legenda, PT/PF-1 e PT/PS-1: 4% NaOH e 120 °C; PT/PF-2 e PT/PS-2: 2% NaOH e 120 °C; PT/PF-3 e PT/PS-3: 4% NaOH e 100 °C; PT/PF-4 e PT/PS-4: 2% NaOH e 100 °C; PT/PF-5 e PT/PS-5: 3% NaOH e 110 °C.

Para o cálculo do rendimento global de açúcares da Figura 49 foram somente considerados os açúcares obtidos por hidrólise enzimática na condição de 5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec2), uma vez que a fração aquosa era composta majoritariamente por fragmentos de lignina. Em geral, os maiores rendimentos globais de açúcares para ambos os materiais pré-tratados foram obtidos nos níveis mais altos dos fatores estudados (120 °C e 4% de NaOH), ou seja, os materiais PT/PF-1 e PT/PS-1.

O rendimento global de açúcares foi a variável resposta escolhida para a análise estatística. Nesse caso, foi utilizado um modelo matemático de primeira ordem, uma vez que não foram realizados os pontos axiais do planejamento. Assim, os modelos propostos foram somente úteis para descrever o efeito linear das variáveis individuais e de sua interação. O significado estatístico dos modelos obtidos para os dois planejamentos (pó de filtro e piolho sujo) foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Tabela 30.

**Tabela 30.** Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento com hidróxido de sódio do pó de filtro e do piolho sujo.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Pó de filtro</i>							
Regressão	62,19	2	31,09	38,02	9,55	0,92	0,96
Resíduos	2,45	3	0,82				
Falta de ajuste	0,01	1	0,01	0,01	18,51		
Erro puro	2,44	2	1,22				
Total	64,64	5					
<i>Piolho sujo</i>							
Regressão	43,91	2	21,96	20,08	19,03	0,88	0,95
Resíduos	2,19	2	1,09				
Falta de ajuste	2,09	1	2,09	21,00	161,41		
Erro puro	0,10	1	0,10				
Total	46,10	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

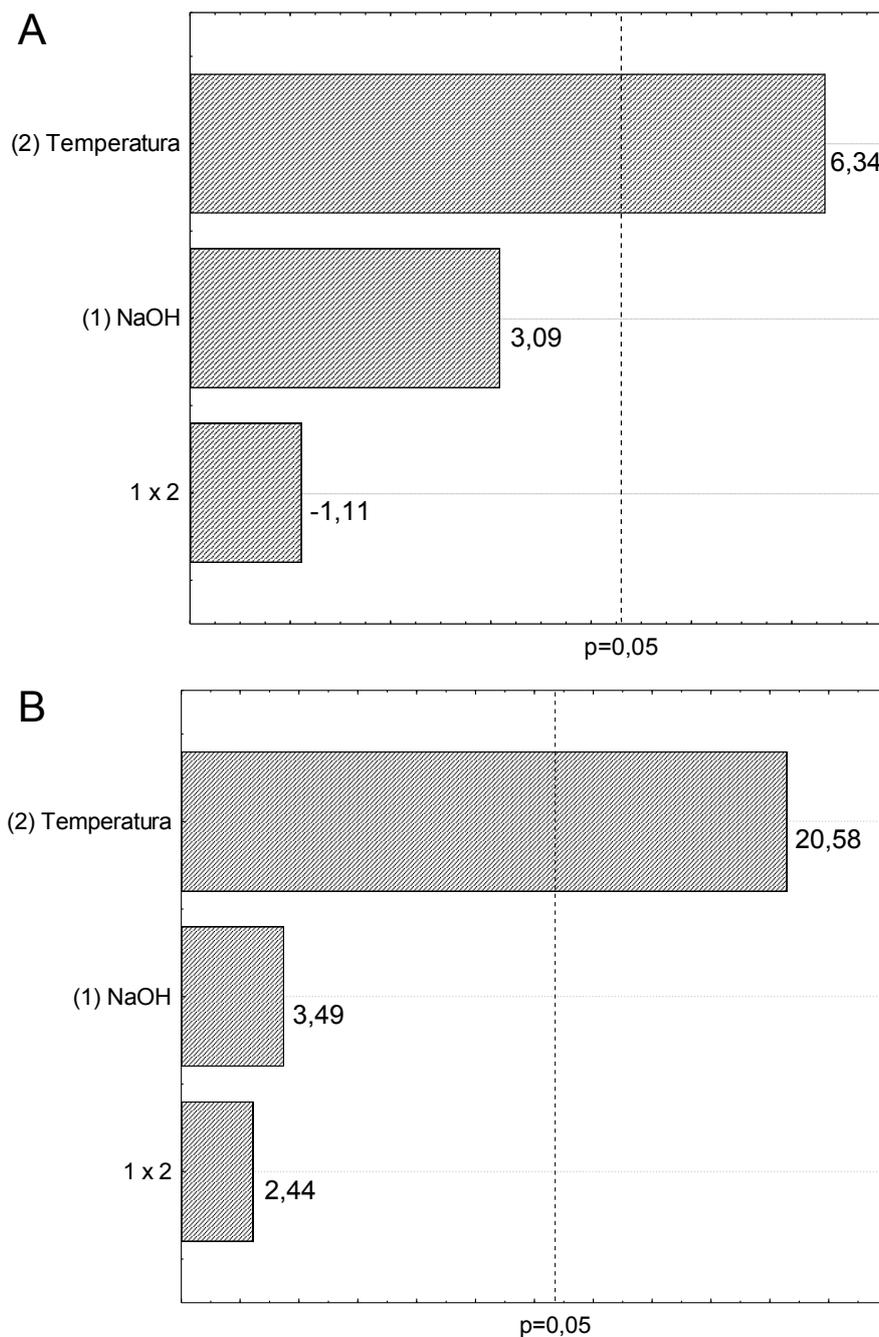
O erro puro, calculado a partir do erro experimental da duplicata do ponto central do planejamento, foi de 3,9% para o pó de filtro e 0,2% para o piolho sujo, de acordo

com o total da soma dos quadrados, indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no teste F, os modelos são significativos, uma vez que os valores de F calculado são maiores que os valores de F tabelado dentro do intervalo de 95% de confiança. Além disso, não foi observada falta de ajuste no modelo, já que os valores do F calculado foram menores que os valores do F tabelado. Os valores obtidos para os  $R^2$  indicaram que 92 e 88% da variância dos resultados são explicadas pelos modelos propostos para o pó de filtro e piolho sujo, respectivamente (Tabela 30).

A influência das variáveis e de sua interação foi então avaliada através dos gráficos de Pareto (Figura 50). Para ambos os planejamentos, a temperatura foi a única variável significativa, apresentando um efeito positivo no rendimento global de açúcares. Por exemplo, nas condições que utilizaram 2% de NaOH, o aumento na temperatura de 100 °C para 120 °C gerou um acréscimo no rendimento global de 8% para o pó de filtro e de 6% para o piolho sujo. Apesar da concentração de hidróxido de sódio não ser significativa, seu efeito foi positivo, o que indica que maiores concentrações levaram a maiores rendimentos. Portanto, os materiais produzidos com os fatores nos maiores níveis, 4% de NaOH e 120 °C (PT/PF-1 e PT/PS-1), foram escolhidos para um estudo mais detalhado de hidrólise enzimática no sentido de tentar aumentar o rendimento global de açúcares. Como já mencionado anteriormente, os baixos valores obtidos estão relacionados com o baixo desempenho na etapa de hidrólise enzimática que, em geral, resultou em menos de 50% de rendimento de EqGlc.

#### 5.2.1.5 Estudo detalhado da hidrólise enzimática dos resíduos do algodão pré-tratados com hidróxido de sódio

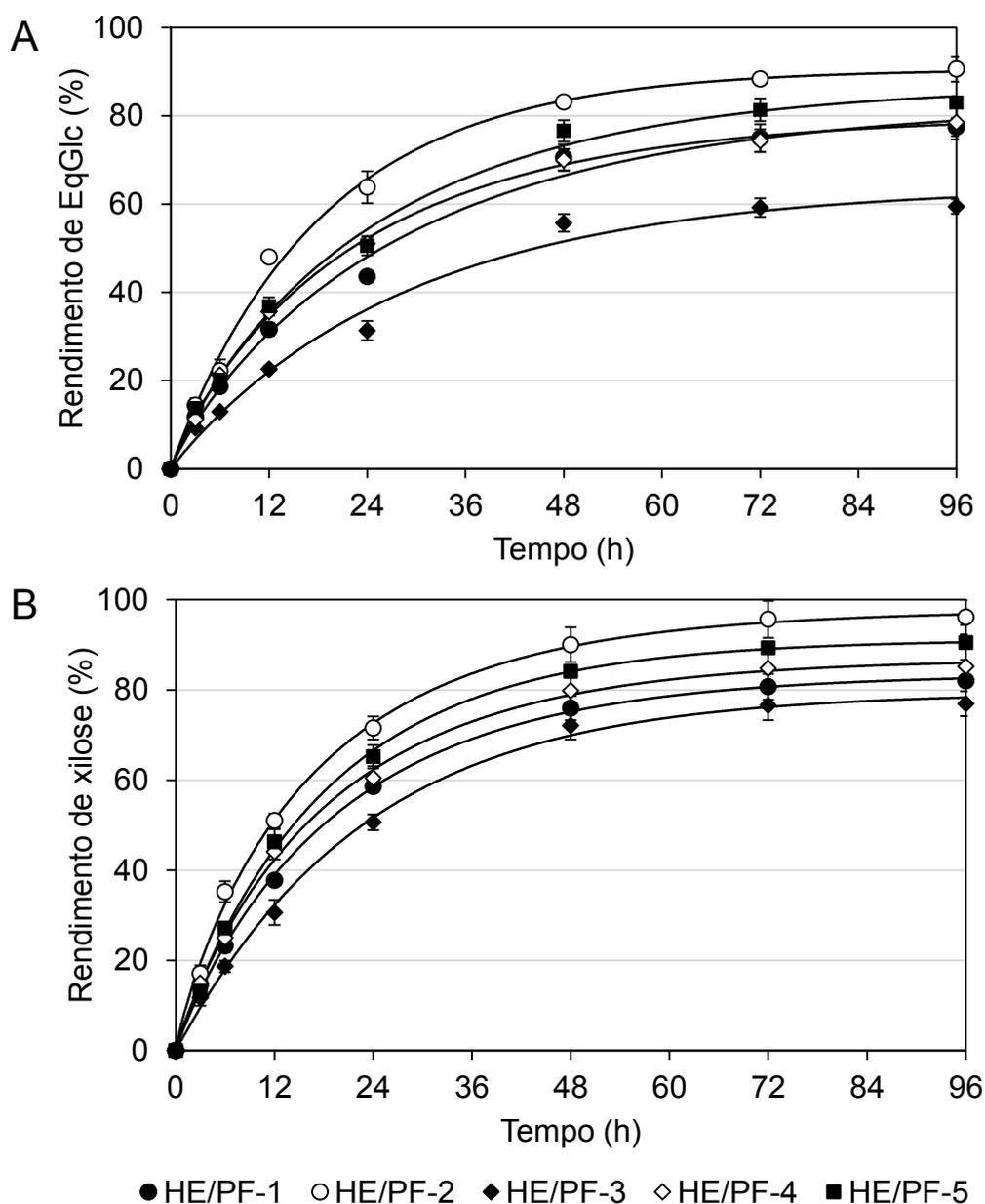
Na tentativa de aumentar o desempenho de hidrólise enzimática dos substratos produzidos na melhor condição de pré-tratamento (120 °C e 4% de NaOH), um novo conjunto de experimentos foi realizado por meio de um planejamento fatorial  $2^2$  para cada substrato pré-tratado (Tabela 6). Nesse estudo buscou-se aumentar o teor de sólidos totais, de modo a produzir maiores concentrações de açúcares fermentescíveis, e aumentar a carga enzimática, uma vez que os 8,8 FPU  $g^{-1}$  de glucanas utilizadas no tópico anterior não foram suficientes para resultar em rendimentos de EqGlc e xilose satisfatórios. Além disso, optou-se por empregar uma preparação enzimática mais avançada, a Cellic CTec3. A Figura 51 mostra o perfil de hidrólise associados às diferentes condições reacionais, com as curvas ajustadas pelo modelo fractal para o pó de filtro pré-tratado.



**Figura 50.** Gráficos de Pareto para o rendimento global de açúcares obtido após hidrólise enzimática do (A) pó de filtro e (B) piolho sujo pré-tratados com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH).

Como esperado, a maior rendimento de EqGlc (Figura 51A) após 96 h de hidrólise (90,6%) foi obtida no experimento HE/PF-2, que utilizou o menor teor de sólidos totais (5%) e a maior carga enzimática (25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas). Por outro lado, um aumento no teor de sólidos totais para 10% e uma redução na carga enzimática para 20

FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (HE/PF-5) resultou também em alto rendimento de EqGlc após 96 h (83,0%).



**Figura 51.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 6. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PF-1: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-4: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais.

Apesar do menor rendimento de EqGlc no experimento HE/PF-5, essa condição forneceu a maior concentração de EqGlc (Figura 51A). Por exemplo, o experimento HE/PF-2 resultou em 44,6 g L<sup>-1</sup> de EqGlc, enquanto que o HE/PF-5 apresentou 65,3 g L<sup>-1</sup> de EqGlc. A maior liberação de EqGlc após 96 h de hidrólise foi observada para o experimento realizado nos níveis mais altos dos fatores estudados (15% de sólidos totais e 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas, HE/PF-1), que alcançou 114 g L<sup>-1</sup>. Entretanto, essa condição liberou mais de 100 g L<sup>-1</sup> de EqGlc em 48 h de reação. Cabe destacar que a concentração de celobiose utilizada no cálculo de rendimento representou menos de 2% do total para todas as condições reacionais. Os perfis de hidrólise das xilanas foram similares aos obtidos para as glucanas (Figura 51B). No entanto, os rendimentos foram maiores, alcançando cerca de 96% no experimento HE/PF-2. Nos ensaios realizados em 15% de sólidos totais (HE/PF-1 e HE/PF-3), concentrações de xilose acima de 6 g L<sup>-1</sup> foram obtidas após 96 h de hidrólise.

Os parâmetros cinéticos  $k$  e  $h$  derivados do modelo fractal para a hidrólise de glucanas e xilanas do pó de filtro pré-tratado são mostrados na Tabela 31. Ambos os parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados nas Tabelas A3.1 e A3.2 (páginas 211 e 212). Para o parâmetro  $k$ , os modelos apresentaram valores de  $F$  aceitáveis em um nível de confiança de 95%, demonstrando a adequação dos modelos lineares propostos aos dados experimentais. Ademais, os altos valores obtidos de  $R^2$  indicam que 98 e 95% da variância são explicadas pelos modelos para os rendimentos de EqGlc e xilose, respectivamente. A influência das variáveis e de sua interação foi então avaliada por seus respectivos gráficos de Pareto (Figura A3.1, página 213). Para os dois casos, o teor de sólidos totais foi a única variável estatisticamente significativa, cujo efeito foi negativo sobre os valores de  $k$ . Desse modo, o aumento no teor de sólidos totais causou uma diminuição da velocidade da reação nos estágios iniciais de hidrólise. Por exemplo, os experimentos realizados em menores teores de sólidos totais (HE/PF-2 e HE/PF-4) resultaram em maiores valores de  $k$  para a hidrólise de glucanas e xilanas. Além disso, todos os experimentos mostraram maiores valores de  $k$  para o rendimento de xilose quando comparados com o rendimentos de EqGlc. Esses valores maiores de  $k$  são devidos ao alto conteúdo de hemicelulases no complexo enzimático Cellic CTec3, que é capaz de hidrolisar a maior parte das xilanas presentes no material pré-tratado.

A validade estatística do parâmetro  $h$ , obtida pela análise de variância (ANOVA) para os rendimentos de EqGlc e xilose, está apresentada na Tabela A3.2 (página 212). Nesse caso, a análise revelou uma falta de ajuste significativa, indicando que o modelo linear não descreve a tendência das respostas obtidas e isso também pode ser verificado nos diagramas de Pareto (Figura A3.2, página 214), que mostraram a

significância estatística do valor da curvatura para as respostas avaliadas. Portanto, para uma visualização mais realística dos efeitos, seria necessária a realização dos pontos axiais do planejamento. Apesar disso, é possível observar que a condição menos favorável para hidrólise (15% de sólidos totais e 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas), representada pelo ensaio PT/PF-3, resultou em altos valores do parâmetro  $h$  nos rendimentos de EqGlc e xilose, o que está de acordo com o seu pior desempenho na hidrólise.

**Tabela 31.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal obtidos dos dados de hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados derivados do pó de filtro com hidróxido de sódio.

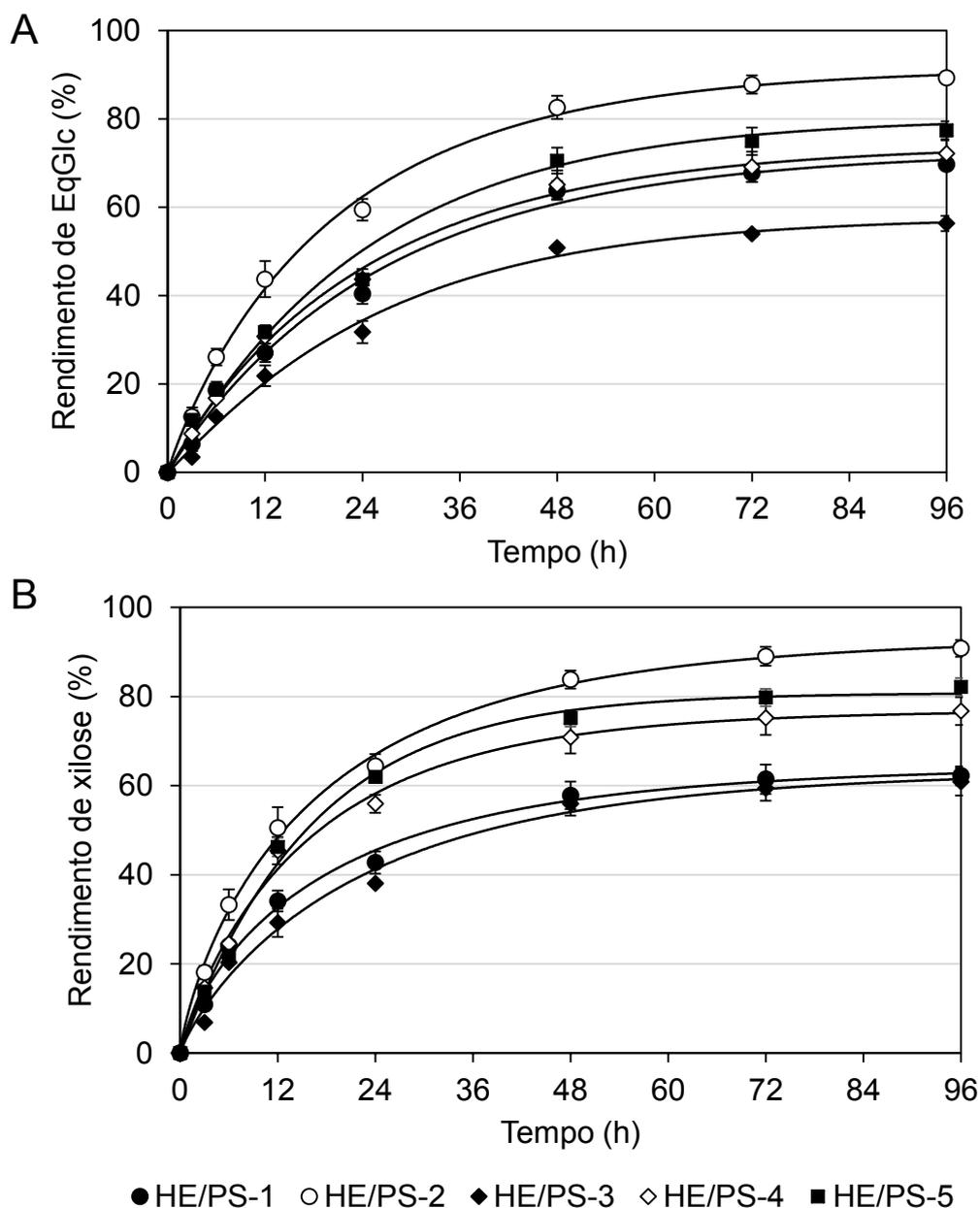
Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	R <sup>2</sup>
HE/PF-1	0,059	0,264	0,988	0,084	0,296	0,988
HE/PF-2	0,075	0,195	0,989	0,089	0,165	0,998
HE/PF-3	0,049	0,327	0,971	0,063	0,266	0,983
HE/PF-4	0,076	0,316	0,990	0,089	0,279	0,990
HE/PF-5	0,066	0,241	0,990	0,079	0,198	0,993

Legenda, HE/PF-1: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PF-4: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais.

O perfil hidrolítico das diferentes condições reacionais para o piolho sujo pré-tratado é mostrado na Figura 52. Em geral, o mesmo comportamento foi observado em relação à liberação de açúcares do pó de filtro pré-tratado, com valores ligeiramente menores nos rendimentos de EqGlc e xilose. Por exemplo, o ponto central do planejamento resultou em 83% de rendimento de EqGlc para o pó de filtro, enquanto que 79% foram obtidos para o piolho sujo. O piolho sujo pré-tratado apresentou um menor teor de glucanas na composição química, o que gerou uma menor concentração de açúcares fermentescíveis após 96 h de hidrólise enzimática. As maiores concentrações obtidas foram de 94,7 g L<sup>-1</sup> de EqGlc e 7,7 g L<sup>-1</sup> de xilose para a condição PT/PS-1.

Os parâmetros cinéticos  $k$  e  $h$  derivados do modelo fractal para a hidrólise das glucanas e xilanas do piolho sujo pré-tratado são mostrados na Tabela 32. Assim como no caso anterior, esses parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados nas Tabelas A3.3 e A3.4 (páginas 215-216). Os modelos lineares gerados para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de EqGlc e xilose apresentaram regressões significativas em um nível de confiança de 95% e os altos valores obtidos de R<sup>2</sup> indicam que 91 e 93% da variância são explicadas pelos modelos,

respectivamente. A influência das variáveis e de sua interação foi avaliada por meio de seus gráficos de Pareto (Figura A3.3, página 217).



**Figura 52.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio (120 °C e 4% de NaOH), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 6. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PS-1: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-4: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 10% sólidos totais.

Os gráficos de Pareto revelaram, uma vez mais, que o teor de sólidos totais foi a única variável estatisticamente significativa nos dois casos, cujo efeito foi negativo sobre os valores de  $k$ . Desse modo, o aumento no teor de sólidos totais de 5% para 15% causou uma diminuição na velocidade inicial de hidrólise. Por exemplo, os valores do parâmetro  $k$  no experimento PT/PS-4 (5% de sólidos totais) foram de  $0,061 \text{ h}^{-1}$  para o rendimento de EqGlc e  $0,116 \text{ h}^{-1}$  para o rendimento de xilose, enquanto que no ensaio PT/PS-3 (15% de sólidos totais) os valores de  $k$  diminuíram para  $0,044$  e  $0,075 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 32.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de piolho sujo pré-tratadas com hidróxido de sódio.

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$h$	$R^2$	$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$h$	$R^2$
HE-PS 1	0,055	0,293	0,980	0,106	0,487	0,976
HE-PS 2	0,074	0,209	0,993	0,113	0,297	0,995
HE-PS 3	0,044	0,331	0,971	0,075	0,421	0,973
HE-PS 4	0,061	0,304	0,984	0,116	0,411	0,976
HE-PS 5	0,055	0,232	0,983	0,098	0,329	0,974

Legenda, HE/PS-1: 25 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 15% sólidos totais; HE/PS-4: 15 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 5% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas e 10% sólidos totais.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) do parâmetro  $h$ , obtidos para os rendimentos de EqGlc e xilose em amostras de piolho sujo pré-tratadas com hidróxido de sódio, estão apresentados na Tabela A3.4 (página 216). Esse parâmetro revelou uma falta de ajuste significativa, o que demonstra que o modelo linear não descreve a tendência das respostas obtidas. Os diagramas de Pareto (Figura A3.4, página 218) também indicaram o significado estatístico do valor da curvatura para as respostas avaliadas. No entanto, é possível observar que as condições de pior desempenho de hidrólise (PT/PS-1 e PT/PS-3) resultaram em maiores valores do parâmetro  $h$  para os rendimentos de EqGlc e xilose.

Os estudos de hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão pré-tratados com hidróxido de sódio demonstrou que é possível obter melhores rendimentos dos polissacarídeos com o emprego de uma maior carga de enzima. Cerca de 90% de rendimento de EqGlc foi obtida para ambos os materiais pré-tratados na condição de hidrólise enzimática que empregou 5% de sólidos totais e 25 FPU  $\text{g}^{-1}$  de glucanas. Portanto, ao considerar esse valor de rendimento no cálculo do rendimento

global, a porcentagem de açúcares solúveis obtidos após pré-tratamento e hidrólise enzimática aumentou de 47 para 76% para o pó de filtro e de 38 para 70% para o piolho sujo.

### 5.2.2 Pré-tratamento dos resíduos do algodão com imidazol

A investigação do pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com imidazol foi conduzida com os mesmos materiais empregados no item 5.2.1 (hidróxido de sódio), cujas composições químicas estão mostradas na Tabela 26. Nesse estudo, o imidazol foi o próprio solvente da reação, ou seja, não foi utilizado um sistema aquoso como nos pré-tratamentos com o hidróxido de sódio. Portanto, devido à limitada disponibilidade de imidazol no laboratório, os pré-tratamentos foram realizados primeiramente com o piolho sujo por meio de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, cujas variáveis de processo foram a temperatura (120 e 160 °C) e o tempo de reação (1 e 3 h). Esses experimentos serviram para avaliar o efeito das condições de pré-tratamento sobre a suscetibilidade do piolho sujo à hidrólise enzimática e, também, para determinar a melhor condição para o seu pré-tratamento, que foi empregada posteriormente para o pó de filtro.

As recuperações mássicas obtidas nos diferentes pré-tratamentos do piolho sujo são mostradas na Tabela 33. Independentemente do tempo de reação, a maior temperatura do planejamento fatorial (160 °C) causou uma diminuição no rendimento mássico quando comparada com as outras condições experimentais. Por outro lado, a temperatura intermediária utilizada no ponto central (140 °C) resultou em um rendimento mássico similar aos experimentos realizados no nível inferior de temperatura (120 °C, 1 ou 3 h).

**Tabela 33.** Rendimentos de recuperação mássica de amostras de piolho sujo após as diferentes condições de pré-tratamento com imidazol.

Experimento	Condições experimentais		Recuperação mássica (%)
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	
PT/PS-1	120	1	78,2
PT/PS-2	160	1	66,6
PT/PS-3	120	3	79,9
PT/PS-4	160	3	65,6
PT/PS-5	140	2	77,0 ± 1,5

Legenda: PT/PS, pré-tratamento do piolho sujo.

### 5.2.2.1 Composição química dos materiais pré-tratados

As composições químicas das amostras de piolho sujo pré-tratadas com imidazol estão ilustradas na Tabela 34. Em geral, o conteúdo de glucanas de todos os materiais pré-tratados foi maior do que o do piolho sujo nativo, que apresentou 56,8% de glucanas. O incremento no tempo de reação de 1 para 3 h na mesma temperatura causou apenas pequenas alterações na composição de glucanas e lignina total dos materiais pré-tratados. Por exemplo, na condição reacional realizada em 120 °C, o teor de glucanas e lignina foi de 64,5 e 19,5% para 1 h de reação (PT/PS-1), enquanto que para o tempo reacional de 3 h foram observados 66,3 e 16,6% (PT/PS-3) desses dois componentes, respectivamente. Os experimentos conduzidos em temperaturas maiores levaram a mudanças mais evidentes na composição química dos materiais pré-tratados, produzindo na condição mais severa (160 °C e 3 h, PT/PS-4) um material com 74,0% de glucanas e 9,9% de lignina. No entanto, é importante notar que as condições intermediárias dos fatores estudados no planejamento (140 °C e 2 h, PT/PS-5) geraram um material com alto teor de glucanas de 69,9%.

### 5.2.2.2 Hidrólise enzimática do piolho sujo nativo e dos materiais pré-tratados

A avaliação da eficiência dos pré-tratamentos do piolho sujo foi complementada pela realização da hidrólise enzimática dos materiais produzidos, empregando 5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas da preparação enzimática Cellic CTec2. Os resultados estão representados na Figura 53, em que o teste de Tukey no intervalo de confiança de 95% foi utilizado para avaliar as diferenças observadas após 96 h de hidrólise. De maneira geral, os rendimentos em EqGlc foram dependentes da temperatura utilizada no pré-tratamento, de modo que temperaturas maiores resultaram em rendimentos igualmente maiores. Por exemplo, os materiais derivados dos pré-tratamentos realizados na temperatura de 160 °C resultaram em rendimentos significativamente maiores de EqGlc após 96 h de hidrólise ( $p < 0,05$  no teste de Tukey), com os valores de 31,7% para o PT/PS-2 e de 32,6% para o PT/PS-4. No entanto, o material produzido pelo ponto central do planejamento (PT/PS-5) apresentou um rendimento similar de EqGlc (30,0%). Aumentos expressivos no rendimento de EqGlc foram observados ao comparar os valores obtidos para os materiais pré-tratados com aqueles derivados do piolho sujo nativo, que apresentou somente 6,4% de rendimento em EqGlc nas mesmas condições de hidrólise enzimática.

**Tabela 34.** Composição química de amostras de piolho sujo produzidas após as diferentes condições de pré-tratamento com imidazol.

Componente	Percentual (%)				
	PT/PS-1	PT/PS-2	PT/PS-3	PT/PS-4	PT/PS-5
Anidroglicose <sup>1</sup>	64,5 ± 0,7	70,4 ± 0,6	66,3 ± 1,5	74,0 ± 0,9	69,9 ± 0,4
Anidroxilose <sup>2</sup>	9,4 ± 0,1	10,6 ± 0,4	9,8 ± 0,3	12,3 ± 0,1	11,1 ± 0,1
Anidroarabinose <sup>2</sup>	1,2 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,8 ± 0,0	1,3 ± 0,0
Grupo acetila <sup>2</sup>	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,0	1,0 ± 0,1
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	ald	ald	ald	ald	ald
Lignina Total <sup>5</sup>	19,5 ± 0,2	11,9 ± 0,6	16,6 ± 0,5	9,9 ± 0,4	12,3 ± 0,6
Lignina solúvel em ácido	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,8 ± 0,1
Lignina insolúvel em ácido	18,5 ± 0,1	11,2 ± 0,5	15,7 ± 0,4	9,2 ± 0,2	11,5 ± 0,4
Cinzas	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,4
Total	98,0	98,9	96,9	101,1	98,4

Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h; ald, abaixo do limite de detecção.

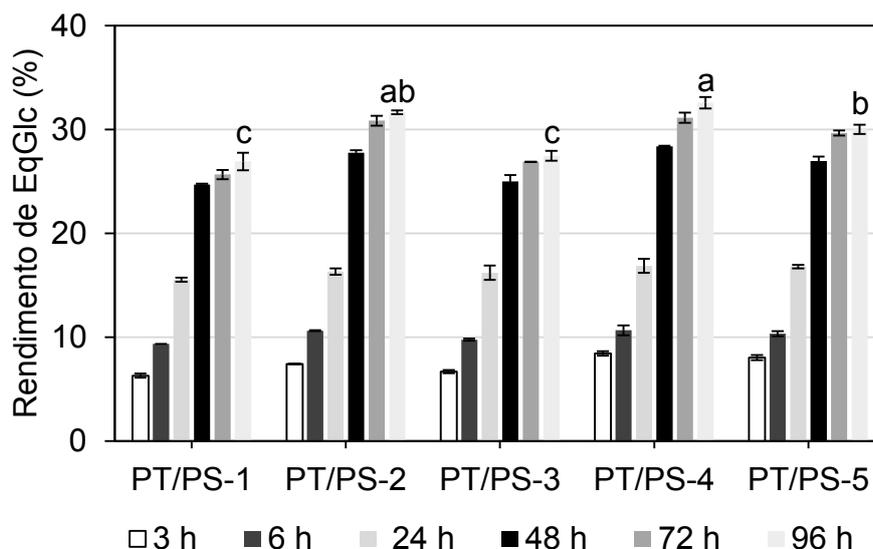
<sup>1</sup>Presente como componente das β-(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.



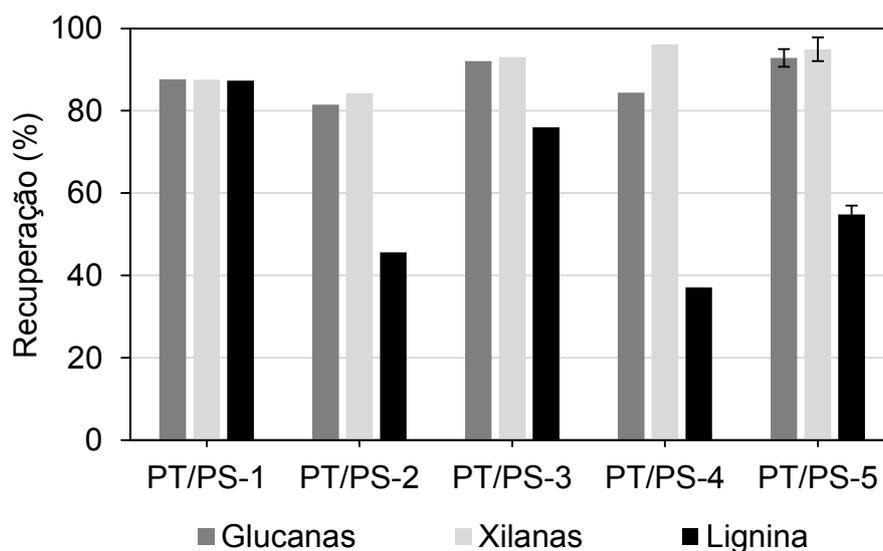
**Figura 53.** Rendimento de EqGlc durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol. Condições da hidrólise enzimática: 5% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 8,8 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec2). As mesmas letras acima das barras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h.

### 5.2.2.3 Recuperação dos principais componentes após os pré-tratamentos

A recuperação dos principais componentes do piolho sujo após a realização do pré-tratamento com o imidazol está representada na Figura 54. Independentemente do tempo reacional empregado, os experimentos realizados na maior temperatura (160 °C) causaram uma ligeira diminuição na recuperação de glucanas dos materiais pré-tratados (PT/PS-2 e PT/PS-4). No entanto, o material produzido pelo ponto central (140 °C e 2 h, PT/PS-5) resultou em recuperação similar de glucanas em comparação aos experimentos que empregaram a menor temperatura de reação (120 °C, 1 e 3 h), atingindo valores em torno de 90%. A recuperação de xilanas também foi alta para todos os materiais pré-tratados, cujos valores foram superiores a 85%. Por outro lado, a recuperação de lignina nos materiais foi amplamente afetada pelas diferentes condições reacionais.

Os materiais produzidos pelas condições que empregaram temperaturas menores (PT/PS-1 e PT/PS-3) resultaram nas maiores recuperações de lignina, ou seja, houve um menor efeito de deslignificação (12,7 e 24,1%, respectivamente), que aumentou nos maiores níveis das variáveis estudadas, alcançando 62,9% de lignina removida no experimento realizado a 160 °C por 3 h (PT/PS-4, Figura 544). Os trabalhos

anteriores que utilizaram imidazol como agente de deslignificação relataram maiores níveis de deslignificação. Por exemplo, MORAIS *et al.* (2016) obtiveram 91,4% de lignina removida da palha de trigo após um pré-tratamento a 170 °C por 2 h, enquanto que TOSCAN *et al.* (2017b) extraíram 82% da lignina do capim elefante após pré-tratamento a 135,6 °C por 5,1 h. Essas diferenças na deslignificação provavelmente estão associadas à composição e estrutura química dos materiais utilizados em cada caso.



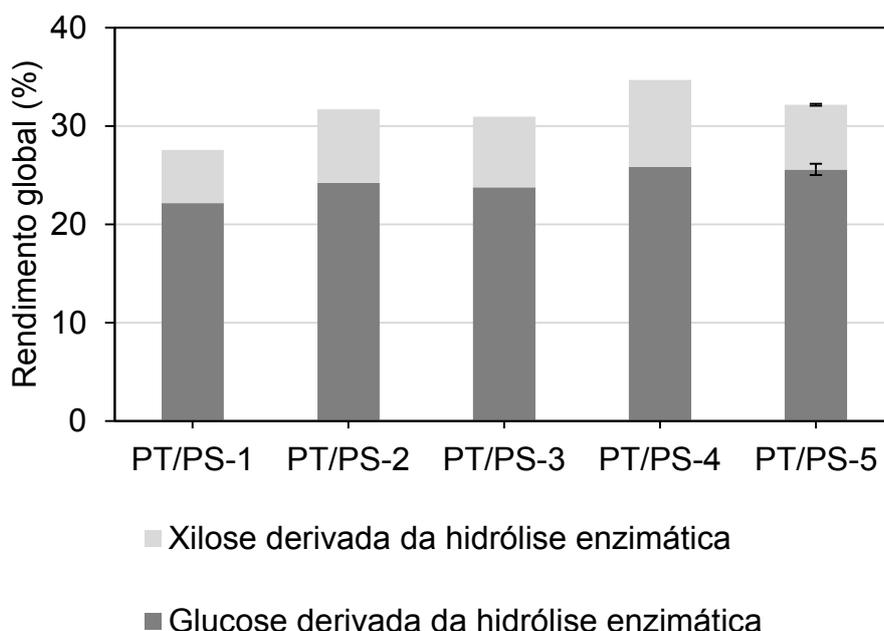
**Figura 54.** Recuperação dos principais componentes do piolho sujo pré-tratado com imidazol sob as diferentes condições reacionais descritas na Tabela 4. Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h.

#### 5.2.2.4 Rendimento global de açúcares

O rendimento global de açúcares solúveis foi obtido através da hidrólise enzimática (5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas empregando Cellic CTec2) de todos os materiais produzidos nas diferentes condições do planejamento fatorial. Os resultados são mostrados na Figura 55, em que é possível observar o maior rendimento global de açúcares (34,7%) para o material pré-tratado nos níveis mais altos das variáveis estudadas (160 °C e 3 h, PT/PS-4).

O rendimento global de açúcares foi escolhido como variável resposta para análise estatística, de modo a avaliar os efeitos associados às diferentes condições reacionais de pré-tratamento. O modelo matemático de primeira ordem foi avaliado por análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados na Tabela 35. O erro puro, calculado a partir do erro experimental da duplicata realizada no ponto central do planejamento, foi de apenas 2,0% de acordo com o total da soma dos quadrados,

indicando boa reprodutibilidade dos dados experimentais. Baseado no teste F, os modelos foram significativos, uma vez que os valores de F calculado são maiores que os valores de F tabelado dentro do intervalo de 95% de confiança. Além disso, não foi observada falta de ajuste no modelo, já que os valores do F calculado foram menores que os valores do F tabelado. O valor obtido para o  $R^2$  indicou que 85% da variância dos resultados foram explicadas pelo modelo proposto.



**Figura 55.** Rendimento global de açúcares solúveis após 96 h de hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol. Condições de hidrólise: 5% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> glucanas (Cellic CTec2). Legenda, PT/PS-1: 120 °C e 1 h, PT/PS-2: 160 °C e 1 h, PT/PS-3: 120 °C e 3 h; PT/PS-4: 160 °C e 3 h; PT/PS-5: 140 °C e 2 h.

**Tabela 35.** Análise de variância (ANOVA) para o rendimento global de açúcares após o pré-tratamento com imidazol do piolho sujo.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
Regressão	25,76	2	12,88	19,14	9,55	0,85	0,93
Resíduos	2,02	3	0,67				
Falta de ajuste	1,50	1	1,50	5,73	18,51		
Erro puro	0,52	2	0,26				
Total	27,78	5					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

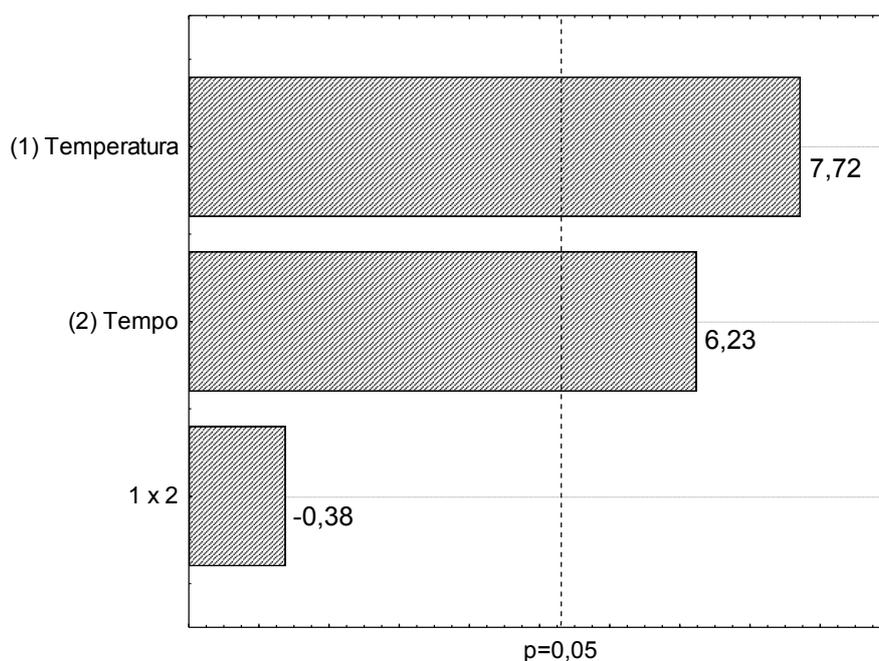
<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

A influência das variáveis e de sua interação no rendimento global de açúcares foi avaliado pelo gráfico de Pareto que se encontra na Figura 56. A temperatura e o tempo de reação foram significativos, apresentando efeitos positivos na liberação de açúcares solúveis no meio reacional. Isso significa que qualquer incremento dessas variáveis causou aumento nos rendimentos de açúcares. Por exemplo, ao comparar as condições realizadas em 1 h de reação (PT/PS-1 e PT/PS-2), o incremento na temperatura de 120 °C para 160 °C gerou rendimentos globais de 27,6 e 31,7%, respectivamente.

Em geral, as condições reacionais de pré-tratamento derivadas do planejamento fatorial não resultaram em pronunciadas diferenças nos rendimentos de açúcares solúveis. O maior valor obtido (34,7%) foi para a condição PT/PS-4, que utilizou 160 °C e 3 h, porém, uma diminuição dessas variáveis de processo, como no experimento PT/PS-5, onde foram empregados 140 °C e 2 h, já foi capaz de solubilizar 32,2% dos açúcares presentes no material pré-tratado. Assim, considerando o menor consumo de energia associado à utilização da temperatura de 140 °C, o material produzido no ponto central do planejamento (PT/PS-5) foi escolhido para um estudo mais detalhado de hidrólise enzimática, no sentido de tentar aumentar o rendimento global de açúcares. Além disso, essa condição reacional foi aplicada para avaliar o pré-tratamento com imidazol do pó de filtro.



**Figura 56.** Gráfico de Pareto para o rendimento global de açúcares obtido após hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h).

#### 5.2.2.5 Avaliação do pré-tratamento com imidazol para o pó de filtro

Como mencionado acima, a condição escolhida para avaliar o efeito do pré-tratamento com imidazol no pó de filtro foi 140 °C e 2 h. A recuperação mássica do material pré-tratado (76,6%) foi similar à obtida para o piolho sujo nessa mesma condição reacional. No entanto, o pó de filtro pré-tratado resultou em menor recuperação de glucanas e deslignificação, com valores de 77,3 e 16,0%, respectivamente. Esses efeitos podem estar relacionados com a composição química do material nativo, que continha alto teor de glucanas (75,7%) e baixa quantidade de lignina (10,5%). Desta maneira, a remoção de lignina parece estar diretamente relacionada à remoção de polissacarídeos sob a forma de complexos lignina-carboidrato (CLC), devido à alta associação desses componentes na parede celular das fibras de algodão (LIYAMA *et al.*, 1994).

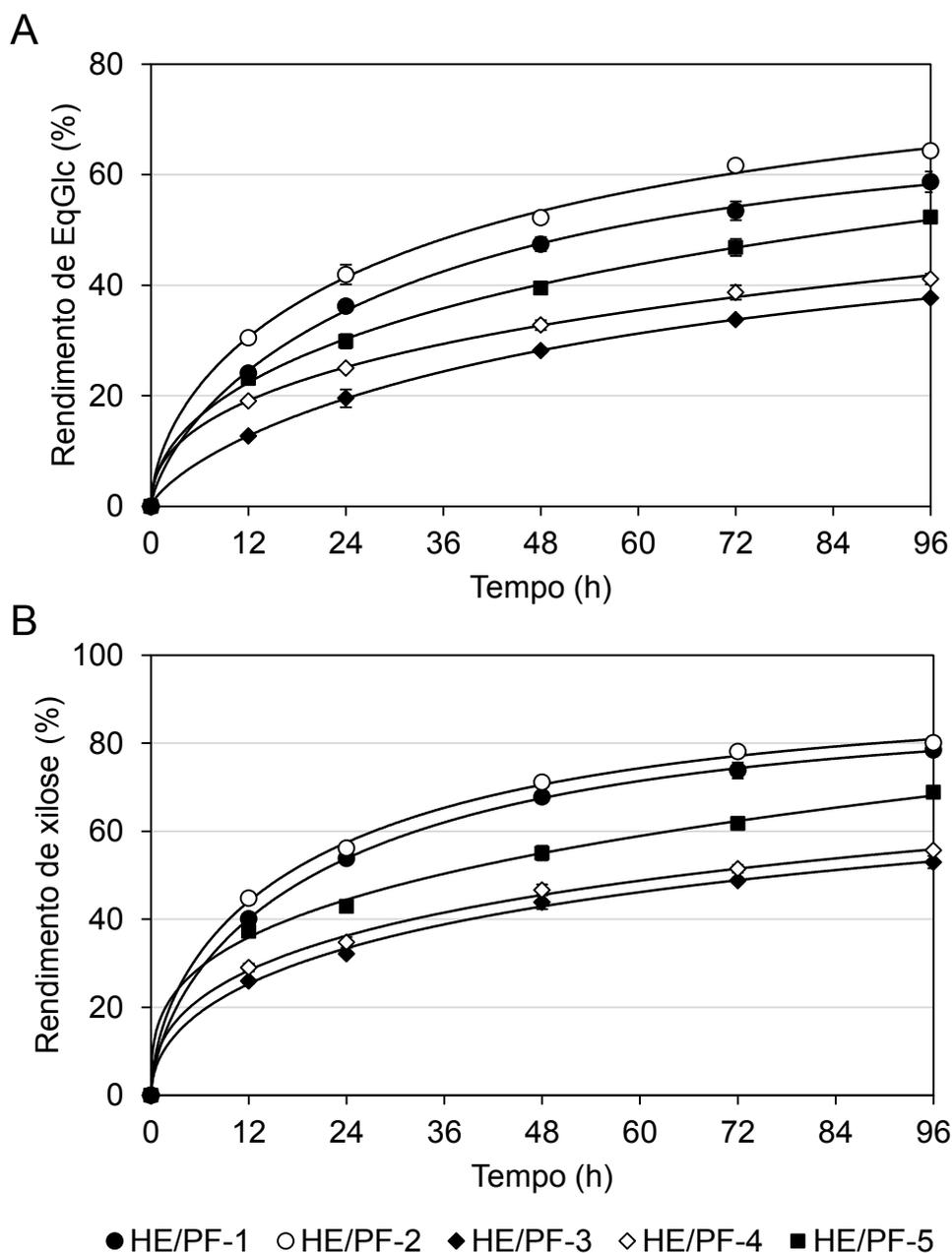
Apesar da baixa deslignificação do pó de filtro pré-tratado por imidazol, o rendimento de EqGlc após 96 h de reação foi de 42,4%, utilizando as condições de hidrólise enzimática em 5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas. Esse rendimento é superior quando comparado ao do piolho sujo pré-tratado na mesma condição, que apresentou somente 30,0% de rendimento de hidrólise. Portanto, o rendimento global de açúcares para o pó de filtro pré-tratado com imidazol na condição de 140 °C e 2 h foi de 34,2 ± 0,8%.

#### 5.2.2.6 Estudo detalhado da hidrólise enzimática dos resíduos do algodão pré-tratados com imidazol

Os substratos produzidos no pré-tratamento com imidazol a 140 °C por 2 h foram submetidos a um estudo posterior de hidrólise enzimática. O objetivo dessa investigação foi de aumentar os rendimentos globais de açúcares, uma vez que os valores obtidos na condição preliminar de hidrólise enzimática (5% de sólidos totais e 8,8 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas) estavam abaixo de 35% para ambos os materiais. Os experimentos foram organizados por meio de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para cada substrato pré-tratado (Tabela 7), onde buscou-se aumentar o teor de sólidos totais de modo a produzir maiores concentrações de açúcares fermentescíveis, e aumentar a carga enzimática para resultar em maiores rendimentos de EqGlc e xilose. Além disso, optou-se por empregar uma preparação enzimática mais avançada, a Cellic CTec3, para garantir um melhor desempenho de hidrólise.

A Figura 57 mostra os perfis de hidrólise das amostras de pó de filtro pré-tratadas pelas diferentes condições reacionais, com as curvas ajustadas pelo modelo cinético fractal. O emprego do menor teor de sólidos totais (4%) e da maior carga enzimática (25

FPU g<sup>-1</sup> de glucanas), utilizado no experimento HE/PF-2, resultou no maior rendimento de EqGlc após 96 h de hidrólise, de 64,3% (Figura 57A). Apesar desse maior rendimento, a concentração de EqGlc foi de apenas 22,5 g L<sup>-1</sup>.



**Figura 57.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do pó de filtro pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 7. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PF-1: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-4: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais.

A maior liberação de EqGlc após 96 h de hidrólise foi observada para o experimento realizado nos níveis mais altos dos fatores estudados (12% de sólidos totais e 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas, HE/PF-4), que alcançou 43,7 g L<sup>-1</sup> de EqGlc (Figura 57A). Cabe destacar que a concentração de celobiose utilizada no cálculo de rendimento representou menos de 2% do total para todas as condições reacionais. Os perfis de hidrólise das xilanas foram similares aos obtidos para as glucanas (Figura 57B), apresentando rendimentos de xilose ligeiramente superiores. Por exemplo, no experimento HE/PF-2, cerca de 80% das xilanas foram convertidas em xilose após 96 h de hidrólise. Por outro lado, as maiores concentrações de xilose foram obtidas nos ensaios realizados em 15% de sólidos totais (HE/PF-3 e HE/PF-4), resultando em valores superiores a 4,8 g L<sup>-1</sup>.

Os parâmetros cinéticos  $k$  e  $h$  derivados do modelo fractal para a hidrólise de glucanas e xilanas do pó de filtro pré-tratado são mostrados na

Tabela 36. Ambos os parâmetros foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os resultados são mostrados nas Tabelas A4.1 e A4.2 (páginas 219 e 220). Para o parâmetro  $k$ , os modelos apresentaram valores de  $F$  aceitáveis em um nível de confiança de 95%, demonstrando a adequação dos modelos lineares propostos aos dados experimentais. Os altos valores obtidos de  $R^2$  indicam que 99 e 87% da variância foram explicadas pelos modelos para o rendimento em EqGlc e xilose, respectivamente.

**Tabela 36.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de pó de filtro pré-tratadas com imidazol.

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	$R^2$	$k$ (h <sup>-1</sup> )	$h$	$R^2$
HE/PF-1	0,078	0,465	0,997	0,143	0,474	0,999
HE/PF-2	0,107	0,498	0,998	0,168	0,493	0,998
HE/PF-3	0,034	0,418	0,998	0,095	0,543	0,998
HE/PF-4	0,069	0,550	0,999	0,114	0,568	0,998
HE/PF-5	0,072	0,491	0,999	0,141	0,547	0,995

Legenda, HE/PF-1: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PF-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-4: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PF-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais.

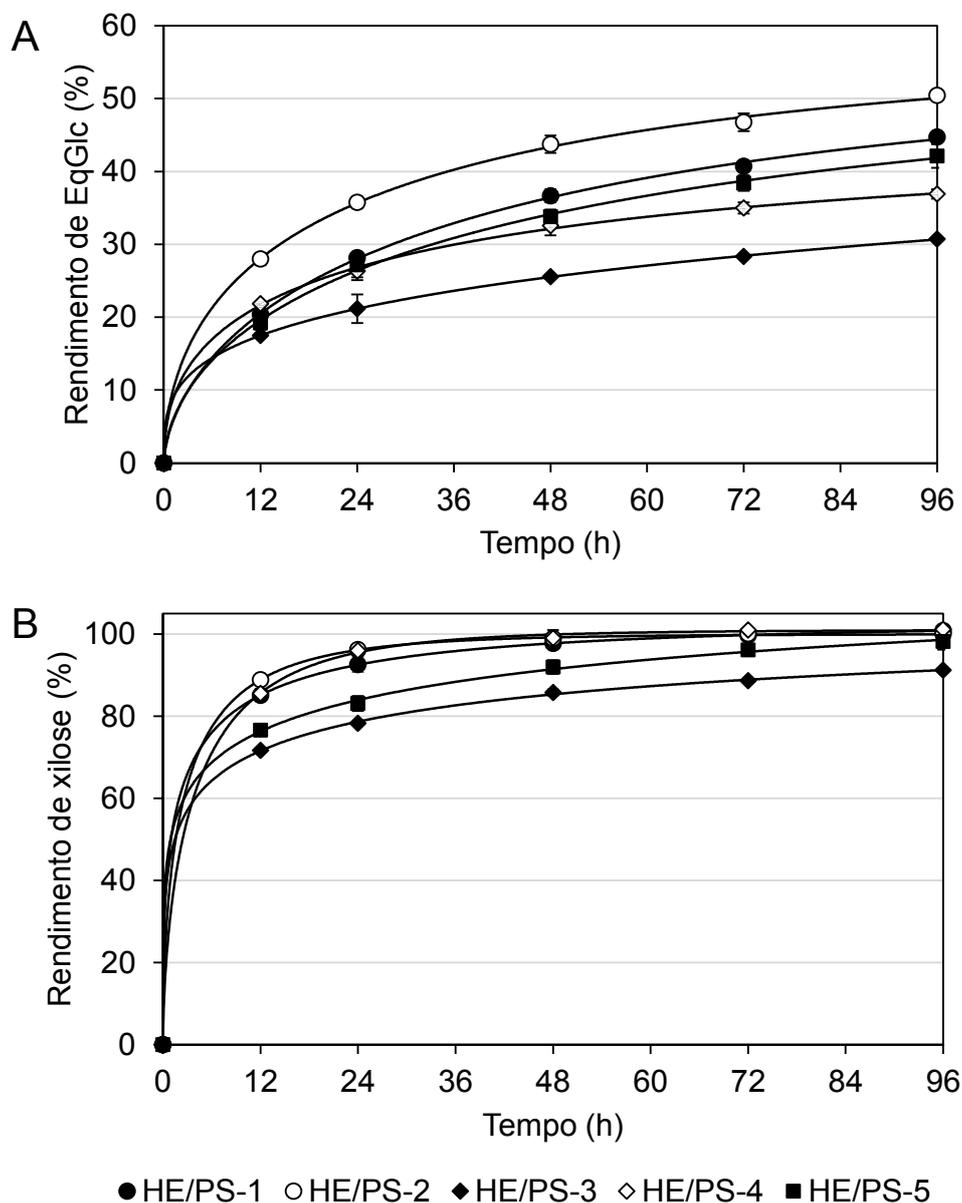
Os gráficos de Pareto da Figura A4.1 (página 221) foram utilizados para avaliar a influência das variáveis e de sua interação nas variáveis resposta. Para os dois casos,

o teor de sólidos totais foi a única variável estatisticamente significativa, cujo efeito foi negativo sobre os valores de  $k$ . Desse modo, o aumento no teor de sólidos totais causou uma diminuição da velocidade da reação nos estágios iniciais de hidrólise. Um exemplo dessa observação pode ser visualizado ao comparar os ensaios HE/PF-1 e HE/PF-3 ou os experimentos HE/PF-2 e HE/PF-4, em que foram empregadas a mesma carga enzimática e teores de sólidos totais de 4 e 12%, respectivamente. Os valores do parâmetro  $k$  para o rendimento de EqGlc diminuíram de  $0,107 \text{ h}^{-1}$  no experimento PT/PF-2 para  $0,069 \text{ h}^{-1}$  no experimento PT/PF-4, enquanto que no rendimento de xilose, a diminuição desse mesmo parâmetro foi de  $0,168 \text{ h}^{-1}$  no PT/PF-2 para  $0,114 \text{ h}^{-1}$  no PT/PF-4.

A análise de variância (ANOVA) do parâmetro  $h$  para os rendimentos de EqGlc e xilose estão apresentadas na Tabela A4.2 (página 220). Os modelos lineares propostos apresentaram valores de  $F$  aceitáveis em um nível de confiança de 95%, demonstrando pelos valores obtidos de  $R^2$  que 97 e 62% da variância dos dados foram explicadas pelos modelos para os rendimentos de EqGlc e xilose, respectivamente. A influência das variáveis e de suas interações também foi avaliada pelos seus respectivos gráficos de Pareto (Figura A4.2, página 222). Para o rendimento de EqGlc, a carga enzimática foi a variável mais significativa, mas sua interação com o tempo reacional também foi significativa em um nível de confiança de 95%. Em ambos os casos, o efeito foi positivo indicando que o aumento na carga enzimática e no teor de sólidos totais causou um aumento no valor de  $h$ , representando assim um pior desempenho na hidrólise enzimática das glucanas. Por exemplo, o valor do parâmetro  $h$  no experimento HE/PF-1 (4% de sólidos totais e  $15 \text{ FPU g}^{-1}$  de glucanas) foi de 0,474, enquanto que o ensaio HE/PF-4 (12% sólidos totais e  $25 \text{ FPU g}^{-1}$  de glucanas) revelou um aumento de  $h$  para 0,568. O gráfico de Pareto para o parâmetro  $h$  do rendimento de xilose mostrou que somente o teor de sólidos totais foi significativo. Assim, qualquer aumento na quantidade de sólidos totais no meio reacional, independentemente da carga enzimática empregada, causou um aumento no valor de  $h$ .

O perfil hidrolítico das diferentes condições reacionais do planejamento fatorial para o piolho sujo pré-tratado é mostrado na Figura 58. Menores rendimentos de EqGlc foram observados quando comparado à liberação de EqGlc do pó de filtro pré-tratado. Por exemplo, o rendimento em EqGlc no ponto central do planejamento foi de 52,3% para o pó de filtro, enquanto que 42,1% foram obtidos para o piolho sujo (Figura 58A). Por outro lado, o rendimento de xilose revelou um comportamento atípico, com mais de 70% de rendimento de xilose já nas primeiras 12 h de reação (Figura 58B). Isso indicou que a remoção da lignina do piolho sujo por meio do pré-tratamento com imidazol foi capaz de expor as cadeias de xilanas na estrutura macromolecular, de modo que essas

foram hidrolisadas à xilose nos estágios iniciais de hidrólise enzimática. Como esperado, maiores concentrações de açúcares após 96 h de hidrólise foram obtidas para a condição HE/PS-4 (12% sólidos totais e 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas), que liberou 35,9 g L<sup>-1</sup> de EqGlc e 16,3 g L<sup>-1</sup> de xilose nessas condições.



**Figura 58.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática do piolho sujo pré-tratado com imidazol (140 °C e 2 h), obtido sob as diferentes condições de hidrólise descritas na Tabela 7. Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal. Legenda, HE/PS-1: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-4: 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas e 8% sólidos totais.

Os parâmetros cinéticos fractais para os rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado são mostrados na Tabela 37. Assim como no caso anterior, esses parâmetros foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e os resultados são apresentados nas Tabelas A4.3 e A4.4 (páginas 223-224). Os modelos lineares gerados para o parâmetro  $k$  apresentaram regressões significativas em um nível de confiança de 95% e os altos valores obtidos de  $R^2$  indicam que 87 e 97% da variância foram explicadas pelos modelos para os rendimentos de EqGlc e xilose, respectivamente. A influência das variáveis e de sua interação sob o valor do parâmetro  $k$  foi avaliada por meio do gráfico de Pareto (Figura A4.3, página 225). Ambas as variáveis estudadas pelo planejamento foram estatisticamente significativas, inclusive a interação entre elas. A carga enzimática apresentou um efeito positivo nos rendimentos de EqGlc e xilose, de modo que o aumento dessa variável causou aumentos nos valores de  $k$ , ou seja, na velocidade inicial de hidrólise. Por exemplo, para 12% de sólidos totais, o aumento na carga enzimática de 15 para 25 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (experimentos HE/PS-3 e HE/PS-4) revelaram aumentos nos valores de  $k$  de 0,089 para 0,118  $h^{-1}$  no rendimento de EqGlc e de 0,391 para 0,523  $h^{-1}$  no rendimento de xilose, respectivamente.

**Tabela 37.** Parâmetros cinéticos do modelo fractal derivado dos dados de hidrólise enzimática de amostras de piolho sujo pré-tratadas com imidazol.

Experimento	Rendimento de EqGlc			Rendimento de xilose		
	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$	$k$ ( $h^{-1}$ )	$h$	$R^2$
HE/PS-1	0,103	0,556	0,998	0,501	0,483	1,000
HE/PS-2	0,177	0,420	0,998	0,537	0,433	1,000
HE/PS-3	0,089	0,690	1,000	0,391	0,686	1,000
HE/PS-4	0,118	0,697	0,998	0,523	0,368	1,000
HE/PS-5	0,108	0,569	0,998	0,477	0,565	0,999

Legenda, HE/PS-1: 15 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-2: 25 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 4% sólidos totais; HE/PS-3: 15 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-4: 25 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 12% sólidos totais; HE/PS-5: 20 FPU  $g^{-1}$  de glucanas e 8% sólidos totais.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) do parâmetro  $h$ , obtidos para os rendimentos de EqGlc e xilose nas amostras de piolho sujo pré-tratadas com imidazol, estão apresentados na Tabela A4.4 (página 224). Esse parâmetro revelou uma falta de ajuste significativa, o que demonstra que o modelo linear não descreve a tendência das respostas obtidas. Os diagramas de Pareto (Figura A4.4, página 226) também indicaram o significado estatístico do valor da curvatura para as respostas avaliadas. No entanto,

de uma maneira geral, é possível observar que a condição menos favorável para a hidrólise (PT/PS-3) resultou nos maiores valores do parâmetro  $h$  para a hidrólise de glucanas e xilanas.

Com esse estudo de hidrólise enzimática dos resíduos do processamento do algodão pré-tratados com imidazol, foi possível aumentar os rendimentos de EqGlc e xilose através do emprego de uma carga maior de enzima. A condição de hidrólise enzimática que empregou 4% de sólidos totais e 25 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas revelou cerca de 64 e 50% de rendimento em EqGlc para pó de filtro e piolho sujo, respectivamente. Por outro lado, nessa mesma condição, cerca de 80 e 100% das xilanas presentes no pó de filtro e no piolho sujo pré-tratados foram convertidas à xilose, respectivamente. Portanto, ao considerar esses valores no cálculo do rendimento global, a porcentagem de açúcares solúveis obtidos após pré-tratamento e hidrólise enzimática aumentou de 34,2 para 51,4% no pó de filtro e de 32,2 para 52,5% no piolho sujo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As diversas estratégias de pré-tratamento do bagaço de cana e dos resíduos do processamento do algodão aplicados nesse estudo revelaram resultados promissores para serem utilizados em um conceito de biorrefinaria. Ao considerar os carboidratos presentes originalmente no bagaço de cana, os rendimentos globais de açúcares após os pré-tratamentos ácidos e hidrólise enzimática dos materiais produzidos alcançou cerca de 90% quando empregada a tecnologia de explosão a vapor e 74% no sistema que utilizou  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$ . Para os resíduos do processamento do algodão, o emprego de pré-tratamentos alcalinos seguidos de hidrólise enzimática revelou rendimentos globais de açúcares solúveis superiores a 70% quando utilizado hidróxido de sódio e maiores que 50% no sistema com imidazol. Ademais, a aplicação do modelo cinético fractal nas reações enzimáticas dos materiais pré-tratados pelos diferentes métodos de pré-tratamento permitiram uma compreensão mais efetiva de aspectos que governaram a acessibilidade dos polissacarídeos.

A investigação do pré-tratamento de explosão a vapor do bagaço de cana demonstrou que é possível obter FSC equivalentes com ajustes do tempo de permanência do material no reator, da temperatura da reação ou da adição de catalisadores exógenos (ácidos fosfórico e sulfúrico). As principais modificações observadas após esses pré-tratamentos sob severidades equivalentes ( $\text{FSC} \approx 0,76$ ) foram a solubilização das hemiceluloses e o aumento da cristalinidade dos materiais pré-tratados quando comparado com o bagaço de cana nativo. A composição química dos diversos materiais produzidos apresentou pouca variação no percentual de glucanas, com um valor médio de 50%, enquanto que o teor de anidroxilose foi maior nos experimentos de catálise sulfúrica que empregaram as menores temperaturas de reação (BS-2 e BS-3). Os efeitos causados no bagaço de cana pelas diferentes condições reacionais foram também avaliados pela determinação da viscosidade complexa e por experimentos de hidrólise enzimática. Em geral, as propriedades reológicas nos teores de sólidos totais de 10 a 20% foram similares entre os materiais pré-tratados, exceto para os materiais BS-2 e BS-3, que apresentaram valores maiores para esse parâmetro, sugerindo um efeito menos pronunciado da explosão a vapor sobre a estrutura da parede celular e a morfologia das fibras. Essa observação foi confirmada pelo pior desempenho desses materiais na hidrólise enzimática, o que demonstrou que o emprego do ácido sulfúrico não foi capaz de compensar a utilização das menores temperaturas de pré-tratamento (170 °C para o BS-2 e 180 °C para o BS-3). A realização dos experimentos de explosão a vapor em escala piloto permitiram o aumento de escala da hidrólise enzimática para um biorreator, no qual foram utilizadas

condições mais realísticas de 15% de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas do complexo enzimático Cellic CTec3. Os rendimentos de açúcares foram semelhantes aos obtidos em agitador orbital, porém, os três materiais produzidos por auto-hidrólise necessitaram de um menor consumo de energia (cerca de 156 W) nos estágios iniciais de hidrólise, enquanto que o material catalisado pelo ácido fosfórico consumiu 364 W. Os maiores consumos de energia foram observados para os materiais oriundos da catálise sulfúrica, com valores superiores a 740 W. Por último, as frações solúveis em água derivadas das diversas condições de pré-tratamento foram caracterizadas quanto às suas respectivas composições em carboidratos, derivados furânicos, ácidos alifáticos e compostos fenólicos. As maiores concentrações dentro de cada classe foram observadas para xilose, furfural e os ácidos acético e *p*-cumárico. Além disso, a análise das frações solúveis em água por CG-EM revelou a presença de diversos compostos fenólicos, como ácidos cinâmicos e cetonas de Hibbert. Portanto, baseado em todas essas análises foi possível concluir que o FSC foi capaz de explicar os resultados de pré-tratamento de explosão a vapor por auto-hidrólise e por catálise ácida exógena, exceto para as situações em que houve a necessidade de um ajuste expressivo da temperatura para valores iguais ou inferiores a 180 °C.

O emprego do sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O no pré-tratamento do bagaço de cana também revelou a possibilidade de remoção seletiva das hemiceluloses, resultando em materiais pré-tratados constituídos por mais de 50% de glucanas. Os pré-tratamentos empregados nesse estudo, que foram organizados através de um planejamento experimental Doehlert, resultaram em diferentes FSC e permitiram a otimização de produção de açúcares solúveis obtidos nas frações solúveis em água e após a hidrólise enzimática dos materiais pré-tratados. Essa avaliação revelou o maior rendimento de EqGlc na hidrólise enzimática para a condição intermediária de temperatura e tempo de reação (FSC = 0,48), enquanto que a maior liberação de pentoses na fração solúvel em água ocorreu para uma condição de menor severidade (FSC = 0,16). Além disso, foi possível verificar que o aumento no FSC para valores acima de 1 causaram uma diminuição expressiva da concentração de açúcares nas frações solúveis em água que, conseqüentemente, aumentaram a concentração de compostos de degradação como furfural e ácido fórmico. A análise estatística dos dados experimentais indicou que os maiores rendimentos de açúcares solúveis foi obtido a 190 °C e 0 min (FSC = -0,10) que, ao ser testada experimentalmente, apresentou o resultado esperado de 74% no rendimento global de açúcares nos hidrolisados oriundos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática. A condição otimizada foi comparada com outros processos hidrotérmicos e isso forneceu informações para o entendimento dos efeitos causados pelo pré-tratamento com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O. Em comparação com um processo

análogo sem a utilização do CO<sub>2</sub> (auto-hidrólise), o pré-tratamento catalisado pelo ácido carbônico revelou uma extração muito maior das hemiceluloses para a fração solúvel em água, produzindo uma concentração de xilose cerca de duas vezes superior. Por outro lado, a substituição do CO<sub>2</sub> pelo N<sub>2</sub>, sistema denominado de N<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O, resultou em um menor desempenho de hidrólise das glucanas, o que demonstrou, mais uma vez, a efetividade do CO<sub>2</sub> para o pré-tratamento do bagaço de cana.

Embora os resíduos do processamento do algodão sejam produzidos em grandes quantidades nas indústrias têxteis no Brasil, estudos de pré-tratamento para produção de biocombustíveis ou outros produtos de valor agregado ainda são bastante escassos. Dessa forma, visando contribuir à utilização desses resíduos no conceito de biorrefinaria, foram testadas diferentes abordagens de pré-tratamento. A explosão a vapor se mostrou ineficiente para o pré-tratamento de resíduos do processamento do algodão, fato provavelmente associado à alta cristalinidade e baixo teor de hemiceluloses desses materiais. Portanto, condições de pré-tratamentos baseados em reagentes alcalinos foram desenvolvidos para superar a recalcitrância de suas respectivas estruturas macromoleculares.

Os pré-tratamentos com hidróxido de sódio dos resíduos do algodão resultaram em materiais com altos teores de glucanas, maiores que 87% para o pó de filtro e 77% para o piolho sujo. Esses resultados são atribuídos principalmente à remoção da lignina, que foi maior nos níveis mais altos das variáveis estudadas (4% de NaOH em 120 °C), atingindo 75 e 85% de deslignificação para o pó de filtro e piolho sujo, respectivamente. Como resultado da deslignificação, houve um aumento da acessibilidade do substrato à hidrólise enzimática e a análise estatística aplicada aos dados experimentais sugeriu que a condição ideal foi obtida nos maiores níveis do planejamento fatorial. No sentido de aumentar os rendimentos de hidrólise enzimática desses materiais pré-tratados, que foram de 54% para o pó de filtro e 46% para o piolho sujo, um novo planejamento fatorial de hidrólise enzimática foi realizado, com variações no teor de sólidos totais e na carga enzimática. Assim, com o emprego de uma maior carga enzimática foi possível aumentar o rendimento global de açúcares de 47 para 76% no pó de filtro e de 38 para 70% no piolho sujo.

A estratégia de pré-tratamento dos resíduos do algodão com o imidazol revelou resultados favoráveis, porém, os rendimentos globais de açúcares solúveis foram menores quando comparado ao pré-tratamento com hidróxido de sódio. Esse fato está provavelmente associado com os menores níveis de deslignificação nos materiais pré-tratados, que impactou diretamente nos rendimentos de açúcares após a hidrólise enzimática. Portanto, da mesma forma que no pré-tratamento com hidróxido de sódio, um planejamento fatorial foi realizado com variações no teor de sólidos totais e na carga

enzimática empregada na hidrólise. Ao considerar os rendimentos de açúcares obtidos nas melhores condições, os valores do rendimento global de açúcares aumentou de 34,2 para 51,4% no pó de filtro e de 32,2 para 52,5% no piolho sujo

## 7 CONCLUSÃO

O fracionamento da biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis ou compostos de valor agregado está em evidente expansão nos dias de hoje. Nesse trabalho, diferentes estratégias de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram empregadas para o aproveitamento do bagaço de cana e de dois resíduos do processamento do algodão. Pré-tratamentos ácidos se mostraram bastante eficientes para o bagaço de cana, enquanto que pré-tratamentos alcalinos foram necessários para aumentar os rendimentos de hidrólise de materiais celulósicos de alta cristalinidade. Além disso, as concentrações de carboidratos hidrossolúveis obtidas nos hidrolisados se apresentaram compatíveis com os níveis exigidos à etapa de fermentação para a produção de etanol celulósico ou mesmo de outros compostos associados ao conceito de biorrefinarias. Dos pré-tratamentos realizados com bagaço de cana, a auto-hidrólise foi superior nas condições estudadas por produzir materiais celulósicos que exigiram menor consumo de energia na etapa de hidrólise enzimática em alto teor de sólidos totais. Por outro lado, os resíduos do processamento do algodão exigiram o emprego de pré-tratamentos em meio básico, sendo que, dos testados, a extração com hidróxido de sódio diluído foi superior ao uso do imidazol. Mesmo assim, os melhores rendimentos de pré-tratamento e hidrólise enzimática foram obtidos de substratos derivados de bagaço de cana, cujas acessibilidades foram altas apesar de seus altos teores de lignina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGBLEVOR, F. A.; BATZ, S.; TRUMBO, J. Composition and ethanol production potential of cotton gin residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 219-230, 2003.
- AGUIAR, R. S.; SILVEIRA, M. H. L.; PITARELO, A. P.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Kinetics of enzyme-catalyzed hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 416-423, 2013.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALINIA, R.; ZABIHI, S.; ESMAEILZADEH, F.; KALAJAHI, J. F. Pretreatment of wheat straw by supercritical CO<sub>2</sub> and its enzymatic hydrolysis for sugar production. **Biosystems Engineering**, v. 107, p. 61-66, 2010.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANDREAUS, J.; FERREIRA FILHO, E. X.; BON, E. P. S. Biotechnology of holocellulose-degrading enzymes. **Biocatalysis and Bioenergy**, v. p. 197-229, 2008.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 3, 2011.
- ASCANIO, G.; CASTRO, B.; GALINDO, E. Measurement of power consumption in stirred vessels - a review. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 82, p. 1282-1290, 2004.
- AUXENFANS, T.; CRÔNIER, D.; CHABBERT, B.; PAËS, G. Understanding the structural and chemical changes of plant biomass following steam explosion pretreatment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, p. 36, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551-573, 2008.
- BALI, G.; MENG, X.; DENEFF, J. I.; SUN, Q.; RAGAUSKAS, A. J. The effect of alkaline pretreatment methods on cellulose structure and accessibility. **ChemSusChem**, v. 8, p. 275-279, 2015.
- BANSAL, P.; HALL, M.; REALFF, M. J.; LEE, J. H.; BOMMARIUS, A. S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 833-848, 2009.

- BATALHA, L. A. R.; HAN, Q.; JAMEEL, H.; CHANG, H.-m.; COLODETTE, J. L.; GOMES, F. J. B. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 97-105, 2015.
- BORJESSON, J.; PETERSON, R.; TJERNELD, F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly (ethylene glycol) addition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 754-762, 2007.
- BRASIL - **RenovaBio**. Ministério de Minas e Energia. Disponível em: <http://www.mme.gov.br>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2018.
- BRUNOW, G.; LUNDQUIST, K. Functional groups and bonding patterns in lignin (including the lignin-carbohydrate complexes). In: H. D. R. Dimmel e J. A. Schmidt. **Lignin and Lignans Advances in Chemistry**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. p. 267-299.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 642-647, 2009.
- CAMPBELL, A. M.; PENFIELD, M. P.; GRISWOLD, R. M. **The experimental study of food**. ed. Boston: Houghton Mifflin Company, 1979.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A.; SILVA, S.; SILVA, J.; FELIPE, M.; ROCHA, G.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, v. 44, p. 48-54, 2010.
- CAPOBIANGO, M.; OLIVEIRA, E. S.; CARDEAL, Z. L. Evaluation of methods used for the analysis of volatile organic compounds of sugarcane (Cachaça) and fruit spirits. **Food Analytical Methods**, v. 6, p. 978-988, 2013.
- CARA, C.; MOYA, M.; BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; GONZÁLEZ, A.; RUIZ, E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1003-1009, 2007.
- CARA, C.; RUIZ, E.; BALLESTEROS, M.; MANZANARES, P.; NEGRO, M. J.; CASTRO, E. Production of fuel ethanol from steam-explosion pretreated olive tree pruning. **Fuel**, v. 87, p. 692-700, 2008.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GIRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.
- CARVALHO, A. V.; DA COSTA LOPES, A. M.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Relevance of the acidic 1-butyl-3-methylimidazolium hydrogen sulphate ionic liquid in the selective catalysis of the biomass hemicellulose fraction. **RSC Advances**, v. 5, p. 47153-47164, 2015.

- CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D.; BONOMI, A. Environmental impacts of technology learning curve for cellulosic ethanol in Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 31-39, 2017.
- CHANDEL, A. K.; JUNQUEIRA, T. L.; MORAIS, E. R.; GOUVEIA, V. L. R.; CVALETT, O.; RIVERA, E. C.; GERALDO, V. C.; BONOMI, A.; DA SILVA, S. S. Techno-economic analysis of second-generation ethanol in Brazil: competitive, complementary aspects with first-generation ethanol. In: **Biofuels in Brazil**. Springer, 2014. p. 1-29.
- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: **Biofuels**. Springer, 2007. p. 67-93.
- CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 5-37, 2000.
- CHEN, H.; QIU, W. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 556-562, 2010.
- CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 85-89, 2007.
- CHEN, W.-H.; TSAI, C.-C.; LIN, C.-F.; TSAI, P.-Y.; HWANG, W.-S. Pilot-scale study on the acid-catalyzed steam explosion of rice straw using a continuous pretreatment system. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 297-304, 2013.
- CHEN, W.-H.; TU, Y.-J.; SHEEN, H.-K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. **Applied Energy**, v. 88, p. 2726-2734, 2011.
- CHEN, X.; ISHIDA, N.; TODAKA, N.; NAKAMURA, R.; MARUYAMA, J.-i.; TAKAHASHI, H.; KITAMOTO, K. Promotion of efficient saccharification of crystalline cellulose by *Aspergillus fumigatus* Swo1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2556-2561, 2010.
- CHUM, H. L.; JOHNSON, D. K.; BLACK, S. K.; OVEREND, R. P. Pretreatment-catalyst effects and the combined severity parameter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 1-14, 1990.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira - Cana-de-açúcar - 2017**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 10 de janeiro de 2018.
- CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, p. 285-294, 2016.
- COUSSOT, P. **Rheometry of pastes, suspensions, and granular materials: applications in industry and environment**. ed. John Wiley & Sons, 2005.
- CRESTINI, C.; MELONE, F.; SETTE, M.; SALADINO, R. Milled wood lignin: a linear oligomer. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 3928-3935, 2011.

- D'ALMEIDA, M. L. O. **Composição química de materiais lignocelulósicos: Celulose e Papel**. ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo, 1988.
- DA COSTA LOPES, A. M.; JOÃO, K. G.; RUBIK, D. F.; BOGEL-ŁUKASIK, E.; DUARTE, L. C.; ANDREAUS, J.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: wheat straw fractionation. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 198-208, 2013.
- DA SILVA, A. S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BON, E. P. S. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402-7409, 2010.
- DA SILVA, G. T.; CHIARELLO, L. M.; LIMA, E. M.; RAMOS, L. P. Sono-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for cellulosic ethanol production. **Catalysis Today**, v. 269, p. 21-28, 2016.
- DASARI, R. K.; BERSON, R. E. The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. p. 289-299, 2007.
- DASARI, R. K.; DUNAWAY, K.; BERSON, R. E. A scraped surface bioreactor for enzymatic saccharification of pretreated corn stover slurries. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 492-497, 2008.
- DEE, S. J.; BELL, A. T. A Study of the Acid-Catalyzed Hydrolysis of Cellulose Dissolved in Ionic Liquids and the Factors Influencing the Dehydration of Glucose and the Formation of Humins. **ChemSusChem**, v. 4, p. 1166-1173, 2011.
- DING, S.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 597-606, 2006.
- DU, B.; SHARMA, L. N.; BECKER, C.; CHEN, S. F.; MOWERY, R. A.; VAN WALSUM, G. P.; CHAMBLISS, C. K. Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, p. 430-440, 2010.
- DU, J.; ZHANG, F.; LI, Y.; ZHANG, H.; LIANG, J.; ZHENG, H.; HUANG, H. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 173-181, 2014.
- DU, S.-k.; ZHU, X.; WANG, H.; ZHOU, D.; YANG, W.; XU, H. High pressure assist-alkali pretreatment of cotton stalk and physicochemical characterization of biomass. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 494-500, 2013.
- DUAN, Z.; SUN, R.; ZHU, C.; CHOU, I.-M. An improved model for the calculation of CO<sub>2</sub> solubility in aqueous solutions containing Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. **Marine Chemistry**, v. 98, p. 131-139, 2006.
- DUAN, Z. H.; SUN, R. An improved model calculating CO<sub>2</sub> solubility in pure water and aqueous NaCl solutions from 273 to 533 K and from 0 to 2000 bar. **Chemical Geology**, v. 193, p. 257-271, 2003.

- EBELING, T.; PAILLET, M.; BORSALI, R.; DIAT, O.; DUFRESNE, A.; CAVAILLE, J.; CHANZY, H. Shear-induced orientation phenomena in suspensions of cellulose microcrystals, revealed by small angle X-ray scattering. **Langmuir**, v. 15, p. 6123-6126, 1999.
- EBRINGEROVA, A.; HROMADKOVA, Z.; HEINZE, T. Hemicellulose. **Polysaccharides 1: Structure, Characterization and Use**, v. 186, p. 1-67, 2005.
- EHRHARDT, M.; MONZ, T.; ROOT, T.; CONNELLY, R.; SCOTT, C.; KLINGENBERG, D. Rheology of dilute acid hydrolyzed corn stover at high solids concentration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 1102-1115, 2010.
- ELSHAFEI, A. M.; VEGA, J.; KLASSON, K.; CLAUSEN, E.; GADDY, J. The saccharification of corn stover by cellulase from *Penicillium funiculosum*. **Bioresource Technology**, v. 35, p. 73-80, 1991.
- ERIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERNELD, F. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (Cel7A) and endoglucanase I (Cel7B) of *Trichoderma reesei*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 101, p. 41-60, 2002.
- FAN, X.; CHENG, G.; ZHANG, H.; LI, M.; WANG, S.; YUAN, Q. Effects of acid impregnated steam explosion process on xylose recovery and enzymatic conversion of cellulose in corncob. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 21-26, 2014.
- FAO - **The state of food and agriculture**. Biofuels: prospects, risks and oportunities - Food and Agricultural Organisation of the United Nations, 2008. Disponível em: [www.fao.org](http://www.fao.org). Acesso em: 06 de janeiro de 2018.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. ed. New York, NY, USA: W. de Gruyter, 1989.
- FERREIRA-LEITAO, V.; PERRONE, C. C.; RODRIGUES, J.; FRANKE, A. P. M.; MACRELLI, S.; ZACCHI, G. An approach to the utilisation of CO<sub>2</sub> as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 2010.
- FISHER, H. E.; KULKA, M.; HIBBERT, H. Studies on Lignin and Related Compounds. Synthesis and Properties of 3-Hydroxy-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propanone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 66, p. 598-601, 1944.
- FONTANA, J. D.; RAMOS, L.; KRIEGER, N. Physical Methods Applied to Biotechnology. **Methods of Biotechnology**, v. p. 2004.
- GABAS, A.; MENEZES, R.; TELIS-ROMERO, J. **Reologia na Indústria de Biocombustíveis**. ed. Lavras: Indi Grafica e Editora, 2012.
- GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.
- GAO, M. A.; XU, F.; LI, S. R.; JI, X. C.; CHEN, S. F.; ZHANG, D. Q. Effect of SC-CO<sub>2</sub> pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, p. 470-475, 2010.

- GARCÍA-TORREIRO, M.; PALLÍN, M. Á.; LÓPEZ-ABELAIRAS, M.; LU-CHAU, T. A.; LEMA, J. M. Alkali treatment of fungal pretreated wheat straw for bioethanol production. **Bioethanol**, v. 2, p. 2016.
- GARROTE, G.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Kinetic modelling of corncob autohydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 571-578, 2001.
- GAUR, R.; SEMWAL, S.; RAJ, T.; LAMBA, B. Y.; RAMU, E.; GUPTA, R. P.; KUMAR, R.; PURI, S. K. Intensification of steam explosion and structural intricacies impacting sugar recovery. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 692-700, 2017.
- GEDDES, C.; PETERSON, J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M.; SHANMUGAM, K.; INGRAM, L. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1851-1857, 2010.
- GHOSE, T. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.
- GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.
- GRILC, M.; VERYASOV, G.; LIKOZAR, B.; JESIH, A.; LEVEC, J. Hydrodeoxygenation of solvolysed lignocellulosic biomass by unsupported MoS<sub>2</sub>, MoO<sub>2</sub>, Mo<sub>2</sub>C and WS<sub>2</sub> catalysts. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 163, p. 467-477, 2015.
- GU, T. Y.; HELD, M. A.; FALK, A. Supercritical CO<sub>2</sub> and ionic liquids for the pretreatment of lignocellulosic biomass in bioethanol production. **Environmental Technology**, v. 34, p. 1735-1749, 2013.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.
- HARRIS, P. J.; STONE, B. A. Chemistry and molecular organization of plant cell walls. In: M. E. Himmel. **Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 61-93.
- HARRISON, M. D.; ZHANG, Z.; SHAND, K.; O'HARA, I. M.; DOHERTY, W. O.; DALE, J. L. Effect of pretreatment on saccharification of sugarcane bagasse by complex and simple enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 105-113, 2013.
- HENDRIKS, A.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- HIDENO, A.; INOUE, H.; TSUKAHARA, K.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T.; INOUE, S.; ENDO, T.; SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2706-2711, 2009.
- HODGE, D. B.; KARIM, M. N.; SCHELL, D. J.; MCMILLAN, J. D. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 88-107, 2009.

- HOLLADAY, J. E.; BOZELL, J. J.; WHITE, J. F.; JOHNSON, D. **Top value-added chemicals from biomass**. Volume II - Results of Screening for Potential Candidates from Biorefinery Lignin. DOE Report PNNL-16983, 2007. Disponível em: [tp://chembioprocess.pnl.gov/staff/staff\\_info.asp](http://chembioprocess.pnl.gov/staff/staff_info.asp). Acesso em: 09 de dezembro de 2018.
- HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907-4913, 2010.
- HU, F.; JUNG, S.; RAGAUSKAS, A. Pseudo-lignin formation and its impact on enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 117, p. 7-12, 2012.
- HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCKER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C. Determination of acid soluble lignin concentration curve by UV-Vis spectroscopy. Laboratory Analytical Procedure: **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.
- ISCI, A.; DEMIRER, G. Biogas production potential from cotton wastes. **Renewable Energy**, v. 32, p. 750-757, 2007.
- JACQUET, N.; MANIET, G.; VANDERGHEM, C.; DELVIGNE, F.; RICHEL, A. Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, p. 2593-2598, 2015.
- JAISAMUT, K.; PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. Optimization of alkali pretreatment of wheat straw to be used as substrate for biofuels production. **Plant Soil Environ**, v. 59, p. 537-542, 2013.
- JANU, K. U.; SINDHU, R.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Studies on physicochemical changes during alkali pretreatment and optimization of hydrolysis conditions to improve sugar yield from bagasse. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 70, p. 952-958, 2011.
- JONKER, J.; VAN DER HILST, F.; JUNGINGER, H.; CAVALETT, O.; CHAGAS, M.; FAAIJ, A. Outlook for ethanol production costs in Brazil up to 2030, for different biomass crops and industrial technologies. **Applied Energy**, v. 147, p. 593-610, 2015.
- JORDAN, T.; SCHMIDT, S.; LIEBERT, T.; HEINZE, T. Molten imidazole - a starch solvent. **Green Chemistry**, v. 16, p. 1967-1973, 2014.
- JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.
- JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 1, p. 119-134, 2007.
- KAAR, W. E.; HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. **Biomass and Bioenergy**, v. 18, p. 189-199, 2000.

- KIM, J. S.; LEE, Y.; KIM, T. H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 42-48, 2016.
- KIM, K. H.; HONG, J. Supercritical CO<sub>2</sub> pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 139-144, 2001.
- KIM, S.; HOLTZAPPLE, M. T. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 583-591, 2006.
- KING, J. W.; SRINIVAS, K.; GUEVARA, O.; LU, Y. W.; ZHANG, D. F.; WANG, Y. J. Reactive high pressure carbonated water pretreatment prior to enzymatic saccharification of biomass substrates. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 221-231, 2012.
- KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da madeira**. Fupef, Curitiba, 2005.
- KNUTSEN, J. S.; LIBERATORE, M. W. Rheology of high-solids biomass slurries for biorefinery applications. **Journal of Rheology**, v. 53, p. 877-892, 2009.
- KOPELMAN, R. Fractal reaction kinetics. **Science**, v. 241, p. 1620-1626, 1988.
- KRISTENSEN, J.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 11, 2009.
- KRISTENSEN, J. B.; BÖRJESSON, J.; BRUUN, M. H.; TJERNELD, F.; JØRGENSEN, H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 888-895, 2007.
- KUHAD, R. C.; MEHTA, G.; GUPTA, R.; SHARMA, K. K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1189-1194, 2010.
- KULKA, M.; HIBBERT, H. Studies on lignin and related compounds. LXVII. Isolation and identification of 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propanone and 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone from maple wood ethanolysis products. Metabolic changes in lower and higher plants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 65, p. 1180-1185, 1943.
- KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 3713-3729, 2009.
- LAN, T.-Q.; GLEISNER, R.; ZHU, J.; DIEN, B. S.; HECTOR, R. E. High titer ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine by simultaneous enzymatic saccharification and combined fermentation. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 291-297, 2013.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. O. The generation of fermentation inhibitors

- during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 151-159, 1999.
- LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.-O.; JÖNSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 617-632, 2000.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, p. 1081-1099, 2005.
- LAURICHESSE, S.; AVEROUS, L. Chemical modification of lignins: Towards biobased polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 39, p. 1266-1290, 2014.
- LIN, S. Y.; DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. ed. Springer, 1992.
- LIU, Y. F.; LUO, P.; XU, Q. Q.; WANG, E. J.; YIN, J. Z. Investigation of the Effect of Supercritical Carbon Dioxide Pretreatment on Reducing Sugar Yield of Lignocellulose Hydrolysis. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 48, p. 89-95, 2014.
- LIYAMA, K.; LAM, T. B.-T.; STONE, B. A. Covalent cross-links in the cell wall. **Plant Physiology**, v. 104, p. 315, 1994.
- LOU, H.; WU, S.; LI, X.; LAN, T.; YANG, D.; PANG, Y.; QIU, X.; LI, X.; HUANG, J. Improving rheology and enzymatic hydrolysis of high-solid corncob slurries by adding lignosulfonate and long-chain fatty alcohols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 8430-8436, 2014.
- LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.
- MAGALHÃES DA SILVA, S. P.; MORAIS, A. R. C.; BOGEL-LUKASIK, R. The CO<sub>2</sub>-assisted autohydrolysis pre-treatment of wheat straw. **Green Chemistry**, v. 16, p. 238-246, 2014.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804-816, 1999.
- MCINTOSH, S.; VANCOV, T.; PALMER, J.; MORRIS, S. Ethanol production from cotton gin trash using optimised dilute acid pretreatment and whole slurry fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 42-51, 2014.
- MCINTOSH, S.; ZHANG, Z.; PALMER, J.; WONG, H. H.; DOHERTY, W. O.; VANCOV, T. Pilot-scale cellulosic ethanol production using eucalyptus biomass pre-treated by dilute acid and steam explosion. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, p. 346-358, 2016.

- MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: M. E. Himmel, J. O. Baker e R. P. Overend. **Enzymatic conversion of biomass for fuels production**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 292-324.
- MCWILLIAMS, R. C.; VAN WALSUM, G. P. Comparison of aspen wood hydrolysates produced by pretreatment with liquid hot water and carbonic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98, p. 109-121, 2002.
- MENG, X.; RAGAUSKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 150-158, 2014.
- MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 2<sup>3</sup> experimental design. **Applied Energy**, v. 87, p. 109-114, 2010.
- MILES-BARRETT, D. M.; NEAL, A. R.; HAND, C.; MONTGOMERY, J. R.; PANOVIC, I.; OJO, O. S.; LANCEFIELD, C. S.; CORDES, D. B.; SLAWIN, A. M.; LEBL, T. The synthesis and analysis of lignin-bound Hibbert ketone structures in technical lignins. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 14, p. 10023-10030, 2016.
- MITCHELL, V. D.; TAYLOR, C. M.; BAUER, S. Comprehensive analysis of monomeric phenolics in dilute acid plant hydrolysates. **BioEnergy Research**, v. 7, p. 654-669, 2014.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings – A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.
- MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M.; GROHMANN, K.; WYMAN, C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 33, p. 67-81, 1992.
- MOHARRERI, E.; JAFARI, T.; SUIB, S. L.; SRINIVASAN, N.; GHOBADI, A. F.; JU, L.-K.; ELLIOTT, J. R. Improved Understanding of CO<sub>2</sub>-Water Pretreatment of Guayule Biomass by High Solids Ratio Experiments, Rapid Physical Expansion, and Examination of Textural Properties. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 645-652, 2017.
- 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, p. 113-119, 1998.
- MORAES ROCHA, G. J.; NASCIMENTO, V. M.; GONCALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58, 2015.
- MORAIS, A. R. C.; DA COSTA LOPES, A. M.; BOGEL-LUKASIK, R. Carbon Dioxide in Biomass Processing: Contributions to the Green Biorefinery Concept. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 3-27, 2015.
- MORAIS, A. R. C.; MATA, A. C.; BOGEL-LUKASIK, R. Integrated conversion of agroindustrial residue with high pressure CO<sub>2</sub> within the biorefinery concept. **Green Chemistry**, v. 16, p. 4312-4322, 2014.

- MORAIS, A. R. C.; VAZ PINTO, J.; NUNES, D.; ROSEIRO, L. B.; OLIVEIRA, M. C.; FORTUNATO, E.; BOGEL-LUKASIK, R. Imidazole: Prospect Solvent for Lignocellulosic Biomass Fractionation and Delignification. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 1643-1652, 2016.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-86, 2005.
- NARAYANASWAMY, N.; FAIK, A.; GOETZ, D. J.; GU, T. Y. Supercritical carbon dioxide pretreatment of corn stover and switchgrass for lignocellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6995-7000, 2011.
- NEVES, P.; PITARELO, A.; RAMOS, L. Production of cellulosic ethanol from sugarcane bagasse by steam explosion: Effect of extractives content, acid catalysis and different fermentation technologies. **Bioresource Technology**, v. 208, p. 184-194, 2016.
- NGUYEN, T. A. D.; KIM, K. R.; HAN, S. J.; CHO, H. Y.; KIM, J. W.; PARK, S. M.; PARK, J. C.; SIM, S. J. Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7432-7438, 2010.
- NGUYEN, T. Y.; CAI, C. M.; KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Co-solvent Pretreatment Reduces Costly Enzyme Requirements for High Sugar and Ethanol Yields from Lignocellulosic Biomass. **ChemSusChem**, v. 8, p. 1716-1725, 2015.
- NOTENBOOM, V.; BORASTON, A. B.; CHIU, P.; FREELOVE, A. C.; KILBURN, D. G.; ROSE, D. R. Recognition of cello-oligosaccharides by a family 17 carbohydrate-binding module: an X-ray crystallographic, thermodynamic and mutagenic study. **Journal of Molecular Biology**, v. 314, p. 797-806, 2001.
- NUTT, W. E.; GRIGGS, B. E.; EACHUS, S. W.; PIKULIN, M. A. Developing an ozone bleaching process. **TAPPI Journal**, v. 76, p. 115-123, 1993.
- OLIVEIRA, F. M.; PINHEIRO, I. O.; SOUTO-MAIOR, A. M.; MARTIN, C.; GONCALVES, A. R.; ROCHA, G. J. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168-73, 2013.
- OSAWA, Z.; SCHUERCH, C. The action of gaseous reagents on cellulosic materials. I: Zonization and reduction of unbleached kraft pulp. **TAPPI Journal**, v. 46, p. 79-89, 1963.
- OVEREND, R. P.; CHORNET, E.; GASCOIGNE, J. Fractionation of lignocellulosics by steam-aqueous pretreatments [and discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 321, p. 523-536, 1987.
- PALMQVIST, B.; KADIĆ, A.; HÄGGLUND, K.; PETERSSON, A.; LIDÉN, G. Scale-up of high-solid enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood: the effects of reactor flow conditions. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. p. 1-8, 2015.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.
- PALONEN, H. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. ed. Aalto, Finland: VTT Technical Research Centre of Finland, 2004.
- PATIL, S. K.; LUND, C. R. Formation and growth of humins via aldol addition and condensation during acid-catalyzed conversion of 5-hydroxymethylfurfural. **Energy & Fuels**, v. 25, p. 4745-4755, 2011.
- PERSSON, P.; LARSSON, S.; JONSSON, L. J.; NILVEBRANT, N. O.; SIVIK, B.; MUNTEANU, F.; THORNEBY, L.; GORTON, L. Supercritical fluid extraction of a lignocellulosic hydrolysate of spruce for detoxification and to facilitate analysis of inhibitors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, p. 694-700, 2002.
- PHAN, D. T.; TAN, C.-S. Innovative pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical CO<sub>2</sub> followed by alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 192-197, 2014.
- PITARELO, A. P.; DA FONSECA, C. S.; CHIARELLO, L. M.; GÍRIO, F. M.; RAMOS, L. P. Ethanol production from sugarcane bagasse using phosphoric acid-catalyzed steam explosion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. p. 2016.
- POPESCU, C.-M.; POPESCU, M.-C.; VASILE, C. Structural changes in biodegraded lime wood. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 362-372, 2010.
- PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1219-1222, 1984.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
- 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, p. 37-48, 1992.
- RAMOS, L. P.; FONTANA, J. D. Enzymatic saccharification of cellulosic materials. In: **Methods in Biotechnology: Environmental Microbiology**. Humana Press, 2004. p. 219-233.
- RELVAS, F. M.; MORAIS, A. R. C.; BOGEL-LUKASIK, R. Selective hydrolysis of wheat straw hemicellulose using high-pressure CO<sub>2</sub> as catalyst. **RSC Advances**, v. 5, p. 73935-73944, 2015.
- RFA - **World Fuel Ethanol Production**. Renewable Fuels Association, 2016. Disponível em: [www.ethanolrfa.org](http://www.ethanolrfa.org). Acesso em: 01 de outubro de 2017.
- RIVERS, D. B.; EMERT, G. H. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal-solid-waste components. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, p. 278-281, 1988.

- ROCHA, G. J.; MARTÍN, C.; DA SILVA, V. F.; GÓMEZ, E. O.; GONÇALVES, A. R. Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 447-452, 2012.
- ROCHA, G. J. d. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; DE ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.
- ROCHE, C. M.; DIBBLE, C. J.; KNUTSEN, J. S.; STICKEL, J. J.; LIBERATORE, M. W. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, p. 290-300, 2009a.
- ROCHE, C. M.; DIBBLE, C. J.; STICKEL, J. J. Laboratory-scale method for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass at high-solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 28, 2009b.
- ROSGAARD, L.; ANDRIC, P.; DAM-JOHANSEN, K.; PEDERSEN, S.; MEYER, A. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, p. 27-40, 2007.
- SAAD, M. B. W.; OLIVEIRA, L. R. M.; CANDIDO, R. G.; QUINTANA, G.; ROCHA, G. J. M.; GONCALVES, A. R. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 220-225, 2008.
- SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693-3700, 2005.
- SANTOS, A. L. F.; KAWASE, K. Y. F.; COELHO, G. L. V. Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 277-282, 2011.
- SATTLER, W.; ESTERBAUER, H.; GLATTER, O.; STEINER, W. The effect of enzyme concentration on the rate of the hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 1221-1234, 1989.
- SCHACHT, C.; ZETZL, C.; BRUNNER, G. From plant materials to ethanol by means of supercritical fluid technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 299-321, 2008.
- SCHWALD, W.; CHAN, M.; BREUIL, C.; SADDLER, J. Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 398-403, 1988.
- SEGAL, L. G. J. M. A.; CREELY, J. J.; MARTIN, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p. 786-794, 1959.
- SELIG, M.; WEISS, N.; JI, Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008.

- SERNA, L. D.; ALZATE, C. O.; ALZATE, C. C. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 113-120, 2016.
- SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current opinion in microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.
- SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUIUS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: current status and future challenges. In: S. S. Da Silva e A. K. Chandel. **Biofuels in Brazil**. Springer International Publishing Switzerland, 2014. p. 151-172.
- SILVEIRA, M. H. L.; VANELLI, B. A.; CORAZZA, M. L.; RAMOS, L. P. Supercritical carbon dioxide combined with 1-butyl-3-methylimidazolium acetate and ethanol for the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 389-396, 2015.
- SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3000-3011, 2007.
- SINGH, J.; SUHAG, M.; DHAKA, A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 624-631, 2015.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008a.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008b.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008c.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2012.
- SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. Laboratory Analytical Procedure. **National Renewable Energy Laboratory**, 2008d.
- SLUITER, J. B.; CHUM, H.; GOMES, A. C.; TAVARES, R.; AZEVEDO, V.; PIMENTA, M. T.; RABELO, S. C.; MARABEZI, K.; CURVELO, A. A.; ALVES, A. R. Evaluation of Brazilian sugarcane bagasse characterization: an interlaboratory comparison study. **Journal of AOAC International**, v. 99, p. 579-585, 2016.

- SRINIVASAN, N.; JU, L. K. Statistical optimization of operating conditions for supercritical carbon dioxide-based pretreatment of guayule bagasse. **Biomass & Bioenergy**, v. 47, p. 451-458, 2012.
- STAMENIC, M.; ZIZOVIC, I.; EGGERS, R.; JAEGER, P.; HEINRICH, H.; ROJ, E.; IVANOVIC, J.; SKALA, D. Swelling of plant material in supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 52, p. 125-133, 2010.
- SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SWITZER, L. H.; KLINGENBERG, D. J. Flocculation in simulations of sheared fiber suspensions. **International Journal of Multiphase Flow**, v. 30, p. 67-87, 2004.
- SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; ZANDONÁ FILHO, A.; RAMOS, L. P. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95-101, 2014.
- TADESSE, H.; LUQUE, R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: an overview. **Energy & Environmental Science**, v. 4, p. 3913-3929, 2011.
- TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 160-167, 1997.
- TEJIRIAN, A.; XU, F. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 239-247, 2011.
- TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 835-844, 2001.
- TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with <sup>14</sup>C-labeled cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p. 104, 2013.
- TOSCAN, A.; MORAIS, A. R. C.; PAIXÃO, S. M.; ALVES, L.; ANDREAUS, J.; DILLON, A. J. P.; LUKASIK, R. M. High-pressure carbon dioxide/water pre-treatment of sugarcane bagasse and elephant grass: assessment of the effect of biomass composition on process efficiency. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 639-647, 2017a.
- TOSCAN, A.; MORAIS, A. R. C.; PAIXÃO, S. M.; ALVES, L. s.; ANDREAUS, J. r.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P.; LUKASIK, R. M. Effective extraction of lignin from elephant grass using imidazole and its effect on enzymatic saccharification to produce fermentable sugars. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, p. 5138-5145, 2017b.
- TREVORAH, R. M.; OTHMAN, M. Z. Alkali pretreatment and enzymatic hydrolysis of Australian timber mill sawdust for biofuel production. **Journal of Renewable Energy**, v. 2015, p. 2015.

- USDA. **United States Department of Agriculture, Cotton: World Markets and Trade.** Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis, 2017. Disponível em: [www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov). Acesso em 08 de janeiro de 2018.
- VÄLJAMÄE, P.; KIPPER, K.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G. Synergistic cellulose hydrolysis can be described in terms of fractal-like kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 254-257, 2003.
- VAN WALSUM, G. P. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 317-329, 2001.
- VARGA, E.; KLINKE, H. B.; RÉCZEY, K.; THOMSEN, A. B. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 567-574, 2004.
- VARGA, E.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. In: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Springer, 2002. p. 73-87.
- VIAMAJALA, S.; MCMILLAN, J. D.; SCHELL, D. J.; ELANDER, R. T. Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharification and particle size. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 925-934, 2009.
- WANG, K.; JIANG, J.-X.; XU, F.; SUN, R.-C. Influence of steaming explosion time on the physico-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks (Lespedeza cytobotrya)*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5288-5294, 2009.
- WANG, K.; JIANG, J.; XU, F.; SUN, R.; BAIRD, M. S. Influence of steam pressure on the physico-chemical properties of degraded hemicelluloses obtained from steam-exploded lespedeza stalks. **BioResources**, v. 5, p. 1717-1732, 2010a.
- WANG, L.-S.; LIU, J.; ZHANG, Y.-Z.; ZHAO, Y.; GAO, P.-J. Comparison of domains function between cellobiohydrolase I and endoglucanase I from *Trichoderma pseudokoningii* S-38 by limited proteolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 24, p. 27-38, 2003.
- WANG, W.; ZHUANG, X.; YUAN, Z.; YU, Q.; QI, W.; WANG, Q.; TAN, X. High consistency enzymatic saccharification of sweet sorghum bagasse pretreated with liquid hot water. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 252-257, 2012.
- WANG, Z.; FENG, H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7995-8000, 2010.
- WANG, Z.; KESHWANI, D. R.; REDDING, A. P.; CHENG, J. J. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3583-3585, 2010b.
- WILLFÖR, S.; SUNDBERG, A.; HEMMING, J.; HOLMBOM, B. Polysaccharides in some industrially important softwood species. **Wood Science and Technology**, v. 39, p. 245-257, 2005.
- WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, p. 259-263, 2011.

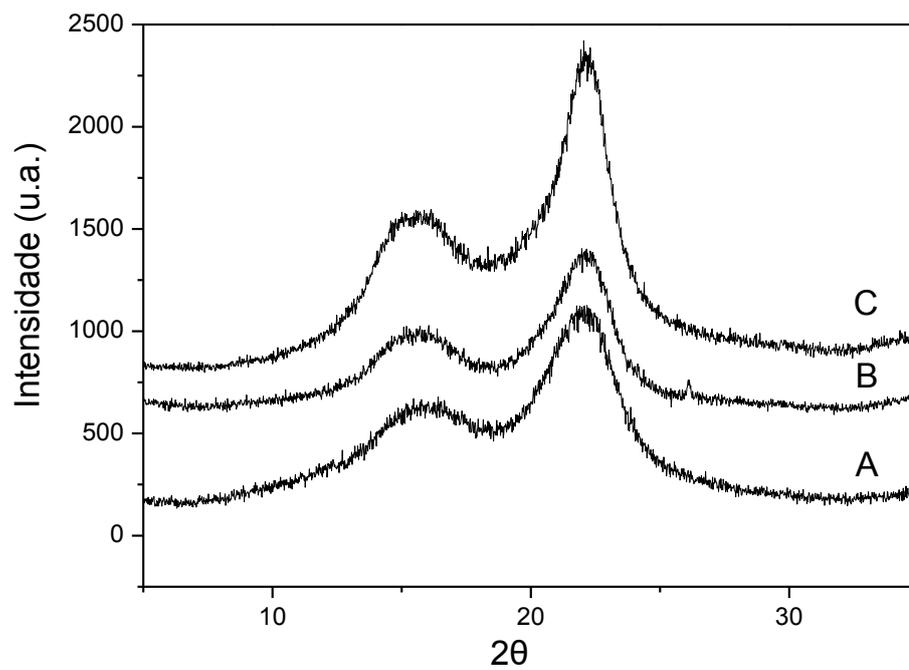
- WIMAN, M.; PALMQVIST, B.; TORNERG, E.; LIDÉN, G. Rheological characterization of dilute acid pretreated softwood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, p. 1031-1041, 2011.
- WOJTUSIK, M.; ZURITA, M.; VILLAR, J. C.; LADERO, M.; GARCIA-OCHOA, F. Enzymatic saccharification of acid pretreated corn stover: Empirical and fractal kinetic modelling. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 110-116, 2016.
- WOOD, I. P.; CAO, H.-G.; TRAN, L.; COOK, N.; RYDEN, P.; WILSON, D. R.; MOATES, G. K.; COLLINS, S. R.; ELLISTON, A.; WALDRON, K. W. Comparison of saccharification and fermentation of steam exploded rice straw and rice husk. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 193, 2016.
- WYMAN, C. **Handbook on bioethanol: production and utilization**. Applied Energy Technology Series, ed. CRC Press, 1996.
- XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, p. 1115-1126, 2004.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, p. 54-60, 2011.
- XU, F.; DING, H. A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: Contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects. **Applied Catalysis A: General**, v. 317, p. 70-81, 2007.
- YANG, J.; ZHANG, X.; YONG, Q.; YU, S. Three-stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4905-4908, 2011.
- YIN, J. Z.; HAO, L. D.; YU, W.; WANG, E. J.; ZHAO, M. J.; XU, Q. Q.; LIU, Y. F. Enzymatic hydrolysis enhancement of corn lignocellulose by supercritical CO<sub>2</sub> combined with ultrasound pretreatment. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, p. 763-769, 2014.
- YLITERVO, P.; FRANZÉN, C. J.; TAHERZADEH, M. J. Continuous ethanol production with a membrane bioreactor at high acetic acid concentrations. **Membranes**, v. 4, p. 372-387, 2014.
- YOO, C. G.; NGHIEM, N. P.; HICKS, K. B.; KIM, T. H. Pretreatment of corn stover using low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10028-10034, 2011.
- YOSHIDA, M.; LIU, Y.; UCHIDA, S.; KAWARADA, K.; UKAGAMI, Y.; ICHINOSE, H.; KANEKO, S.; FUKUDA, K. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 805-810, 2008.
- YU, J.; ZHANG, J.; HE, J.; LIU, Z.; YU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 903-908, 2009.

- YUN, S.-I.; JEONG, C.-S.; CHUNG, D.-K.; CHOI, H.-S. Purification and some properties of a  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 65, p. 2028-2032, 2001.
- ZACCAI, G. The effect of water on protein dynamics. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 359, p. 1269-1275, 2004.
- ZAKRZEWSKA, M. E.; BOGEL-ŁUKASIK, E.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Solubility of carbohydrates in ionic liquids. **Energy & Fuels**, v. 24, p. 737-745, 2010.
- ZHANG, H. D.; WU, S. B. Subcritical CO<sub>2</sub> pretreatment of sugarcane bagasse and its enzymatic hydrolysis for sugar production. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 546-550, 2013.
- ZHANG, J.; CHU, D.; HUANG, J.; YU, Z.; DAI, G.; BAO, J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, p. 718-728, 2010.
- ZHANG, X.; QIN, W.; PAICE, M. G.; SADDLER, J. N. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5890-5897, 2009.
- ZHANG, X.; YUAN, Q.; CHENG, G. Deconstruction of corncob by steam explosion pretreatment: Correlations between sugar conversion and recalcitrant structures. **Carbohydrate Polymers**, v. 156, p. 351-356, 2017.
- ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Formation kinetics of potential fermentation inhibitors in a steam explosion process of corn straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 359-367, 2013.
- ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 367-375, 2008.
- ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452-481, 2006.
- ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004a.
- ZHANG, Y. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, p. 797-824, 2004b.
- ZHAO, X.; DONG, L.; CHEN, L.; LIU, D. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 350-356, 2013.
- ZHENG, M.; LI, X.; LI, L.; YANG, X.; HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5140-5145, 2009.

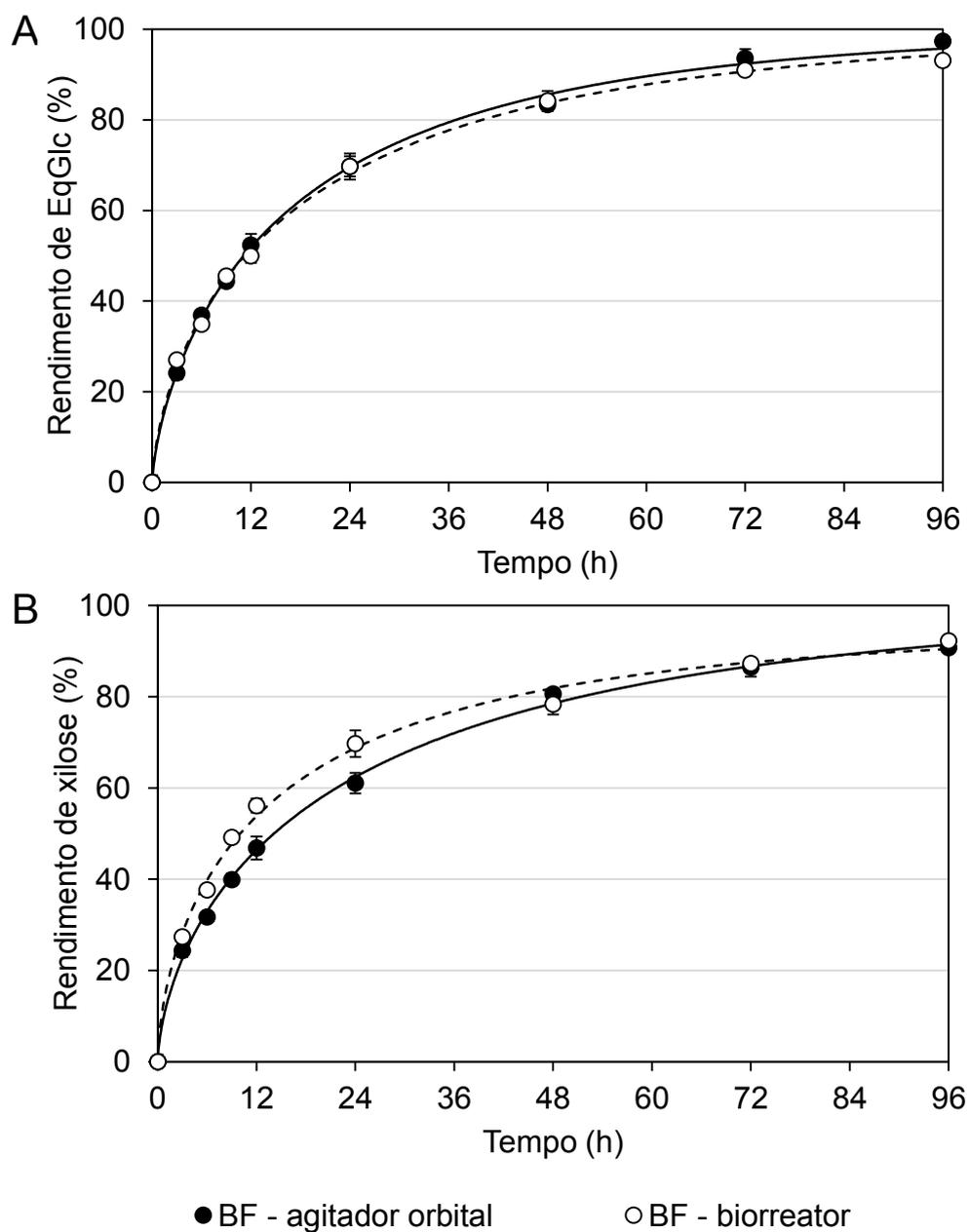
- ZHENG, Y.; LIN, H.; TSAO, G. T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 890-6, 1998.
- ZHU, J.; ZHUANG, X. Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 583-598, 2012.
- ZHU, L.; O'DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817-3828, 2008.
- ZHU, S.; WU, Y.; CHEN, Q.; YU, Z.; WANG, C.; JIN, S.; DING, Y.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chemistry**, v. 8, p. 325-327, 2006.

## APÊNDICE 1

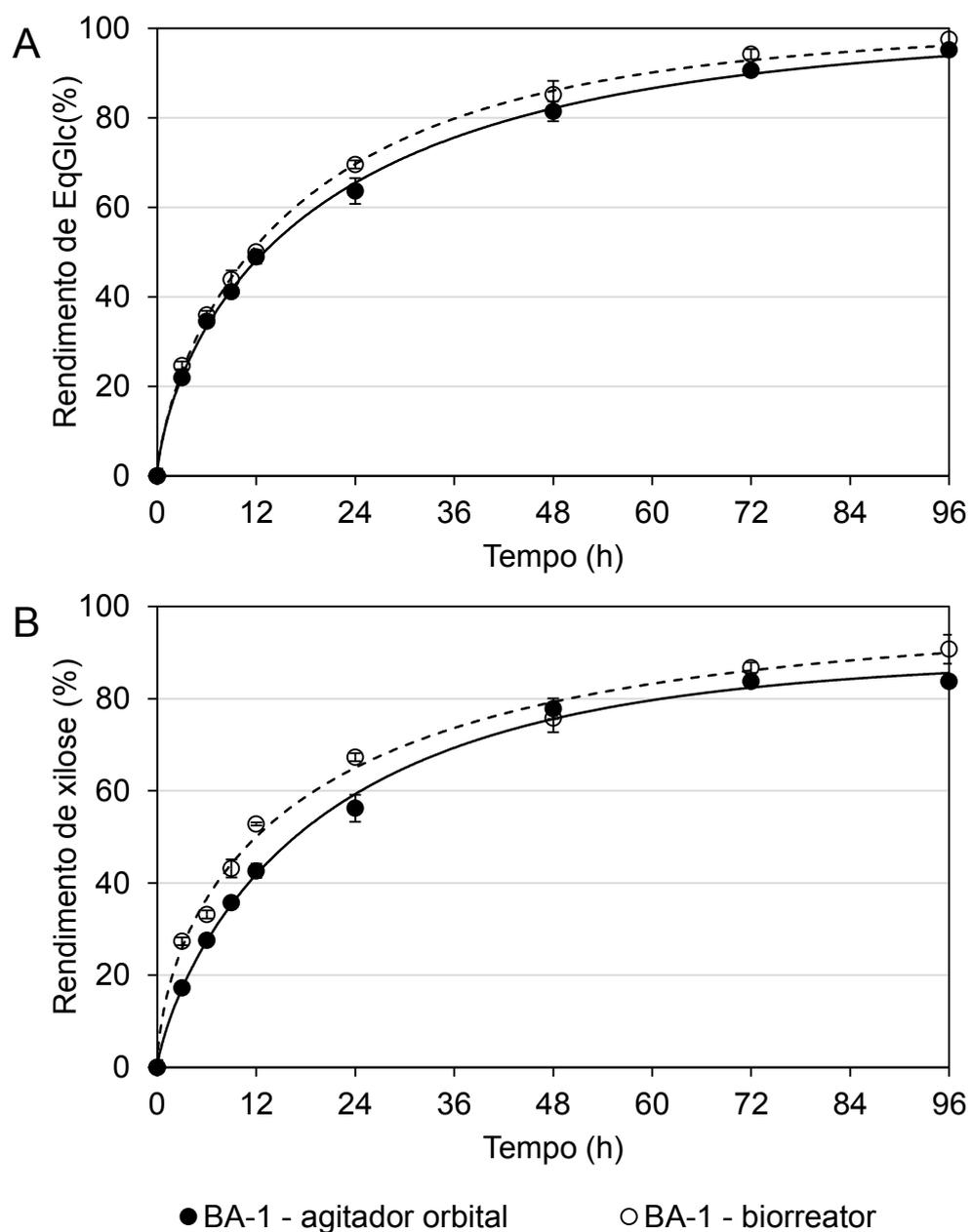
## Resultados adicionais do pré-tratamento do bagaço de cana por explosão a vapor



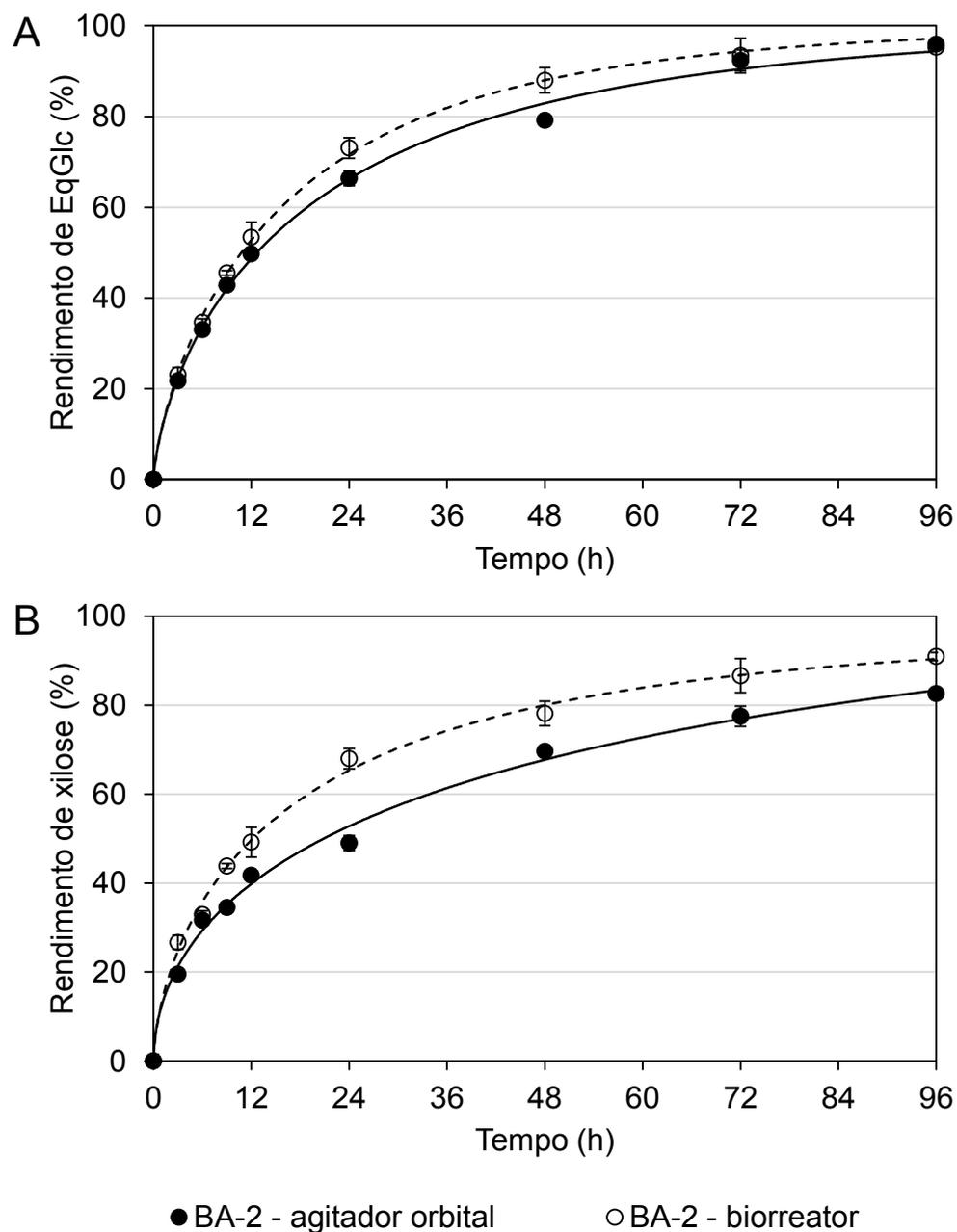
**Figura A1.1.** Difratogramas do (A) bagaço de cana nativo e para as frações de (B) holocelulose e (C)  $\alpha$ -celulose.



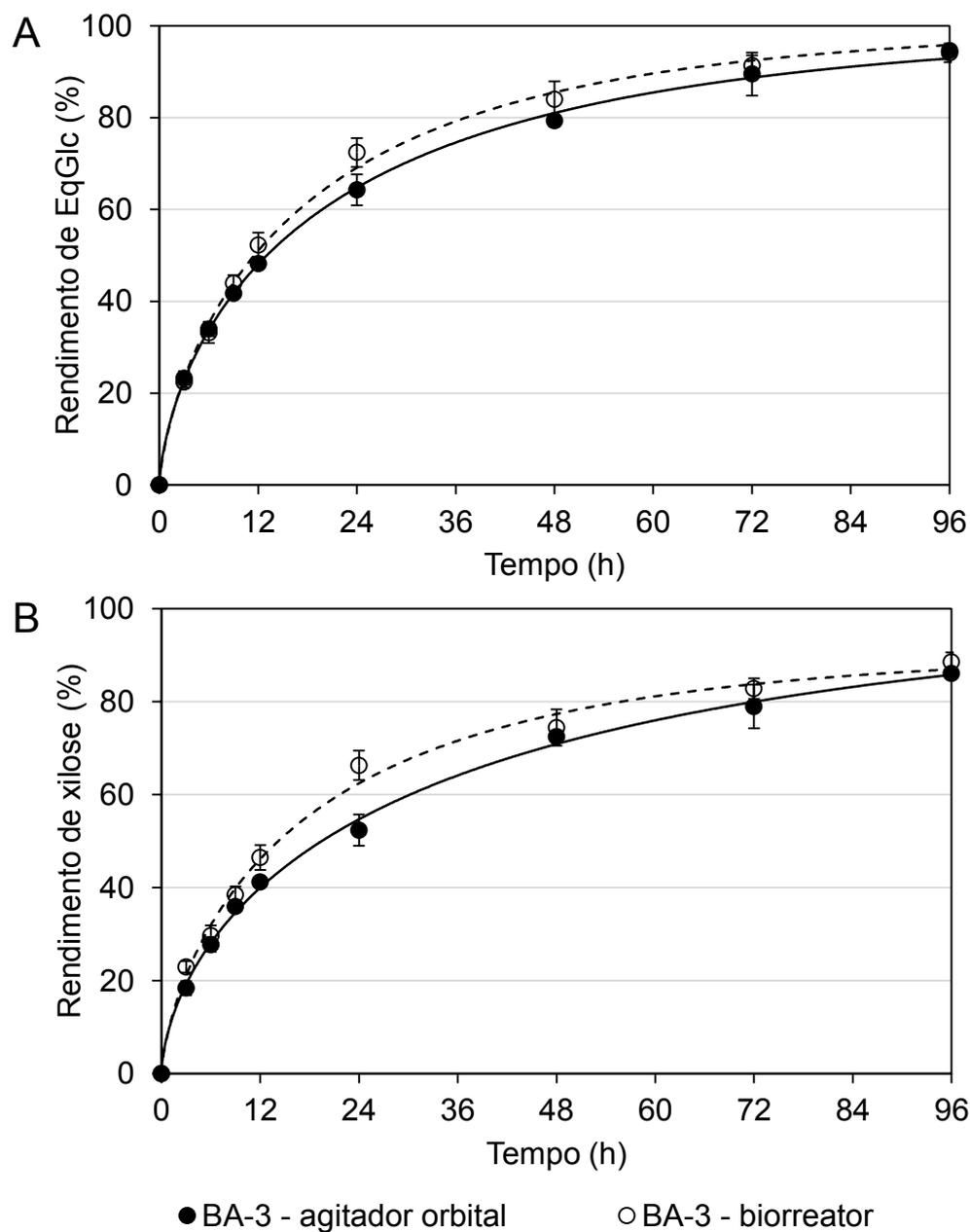
**Figura A1.2.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica (BF). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



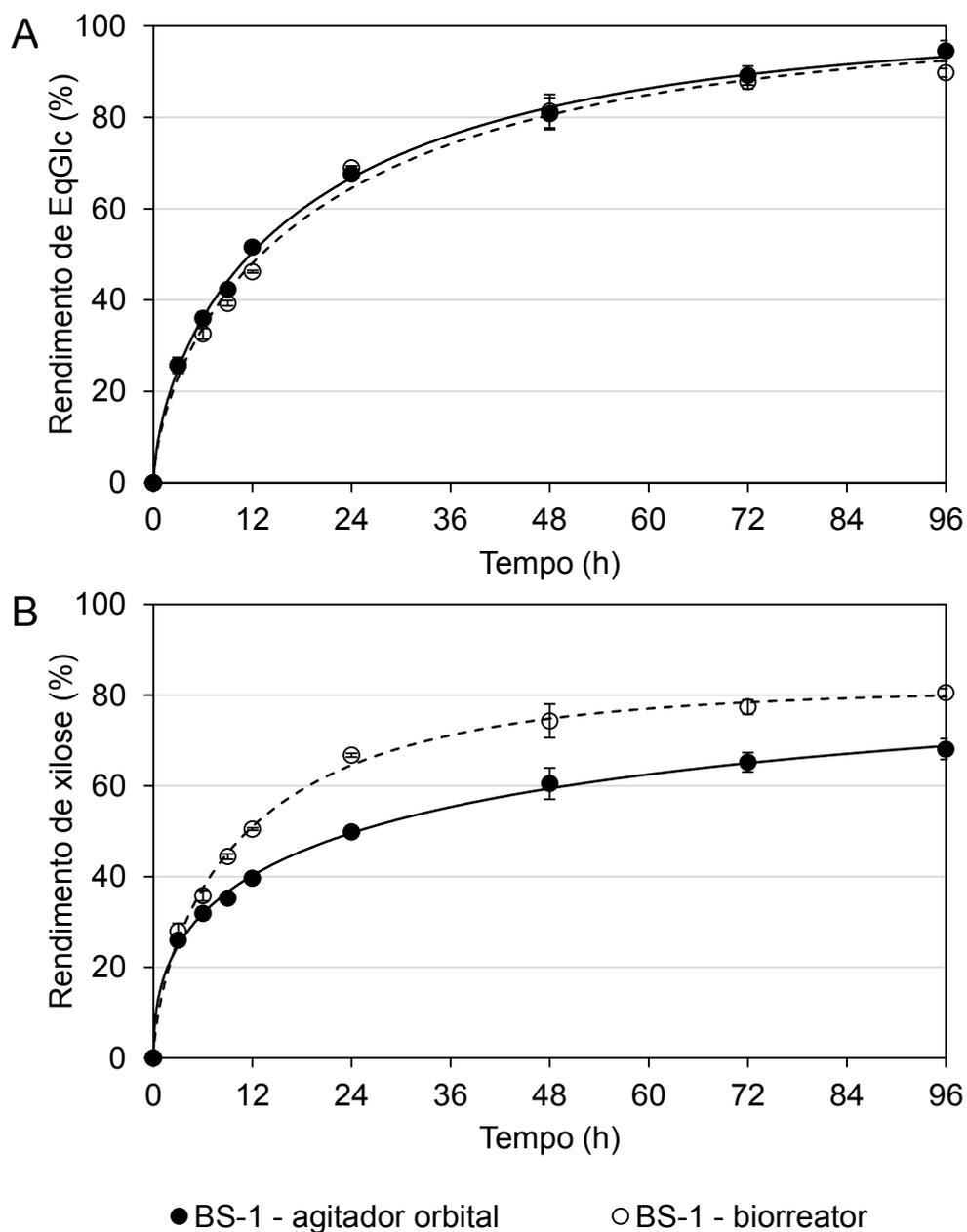
**Figura A1.3.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-1). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



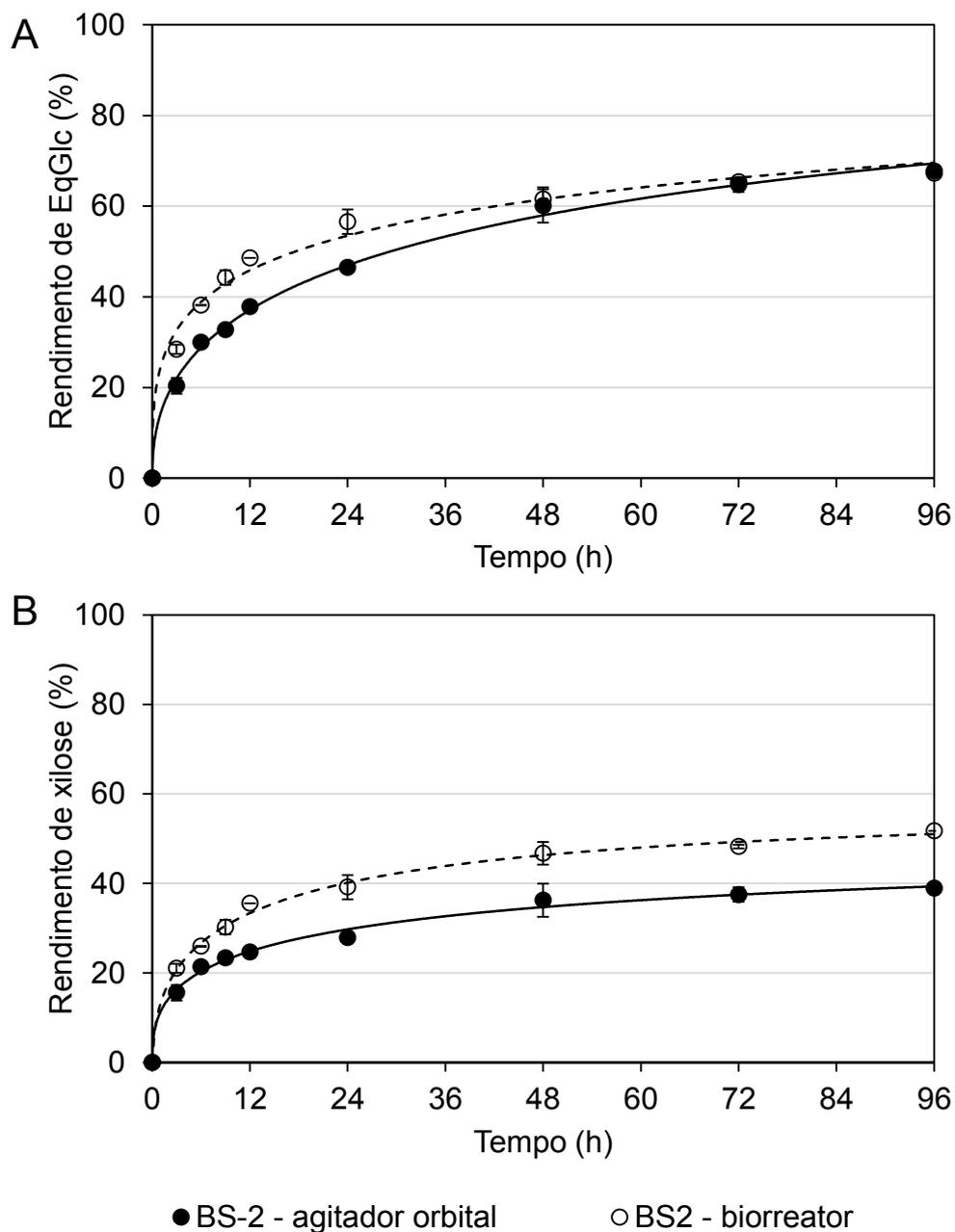
**Figura A1.4.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-2). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



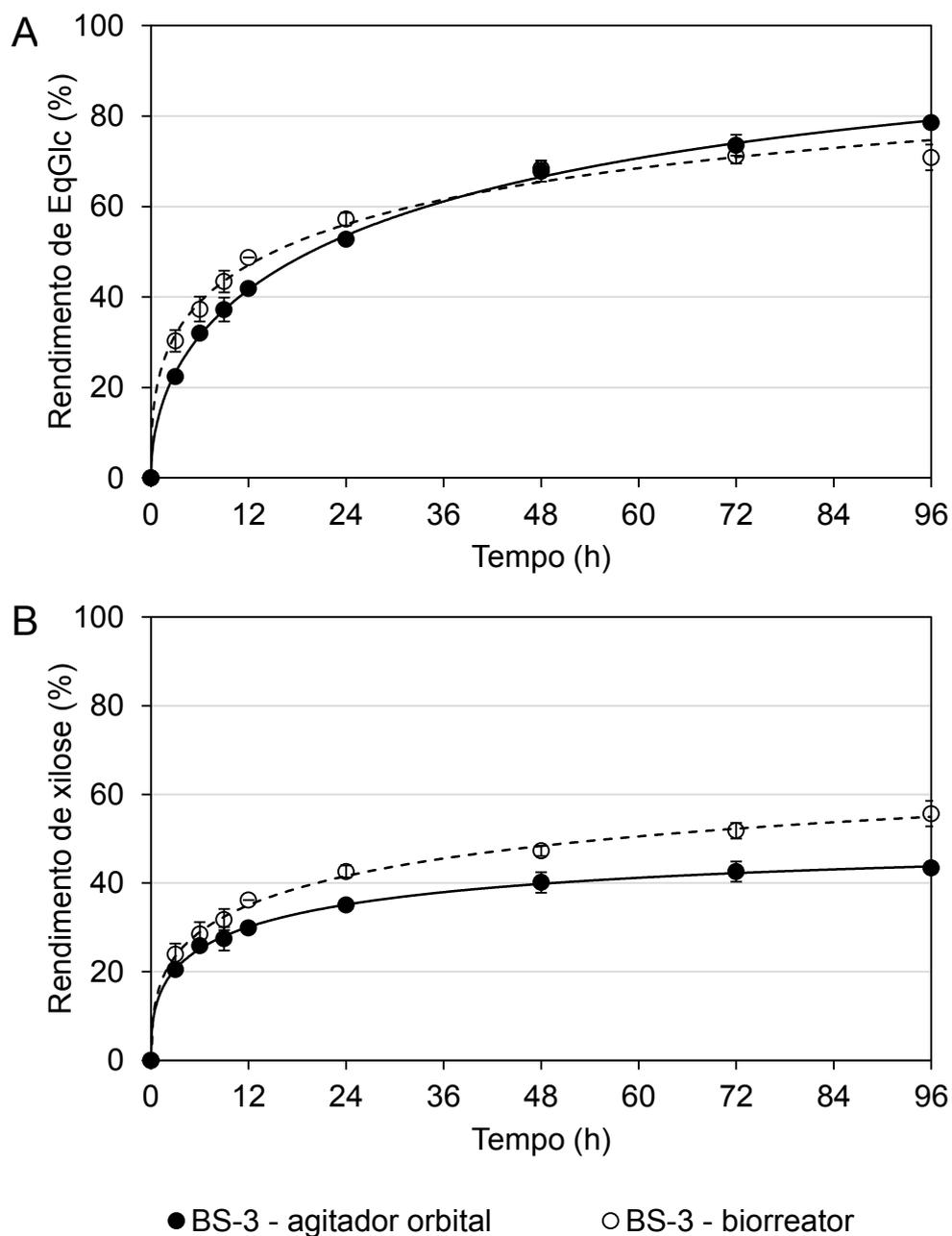
**Figura A1.5.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise (BA-3). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



**Figura A1.6.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-1). Condições de hidrólise enzimática: 15% (m v<sup>-1</sup>) de sólidos totais e 23,1 FPU g<sup>-1</sup> de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



**Figura A1.7.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-2). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.



**Figura A1.8.** Rendimento de (A) EqGlc e (B) xilose durante a hidrólise enzimática realizada em agitador orbital e biorreator do bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica (BS-3). Condições de hidrólise enzimática: 15% ( $m v^{-1}$ ) de sólidos totais e 23,1 FPU  $g^{-1}$  de glucanas (Cellic CTec3). Os ajustes foram obtidos pelo modelo fractal.

**Tabela A1.1.** Recuperação dos principais componentes nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento por explosão a vapor do bagaço de cana.

Componente	Percentual (%)						
	BF	BA-1	BA-2	BA-3	BS-1	BS-2	BS-3
<i>Material pré-tratado</i>							
Anidroglicose	93,6 ± 1,9	86,3 ± 4,4	87,2 ± 4,5	93,5 ± 5,0	93,6 ± 2,4	91,7 ± 4,4	93,5 ± 2,1
Anidroxilose	11,4 ± 0,2	12,7 ± 0,7	13,0 ± 0,7	17,0 ± 0,9	16,8 ± 0,4	28,9 ± 1,4	29,0 ± 0,7
Lignina total	77,6 ± 1,6	68,7 ± 3,5	71,8 ± 3,7	71,1 ± 3,8	79,9 ± 2,0	74,4 ± 3,5	68,3 ± 1,5
<i>Fração solúvel em água</i>							
Anidroglicose	5,0 ± 0,1	5,6 ± 0,1	6,2 ± 0,2	4,5 ± 0,3	4,3 ± 0,0	4,6 ± 0,0	4,5 ± 1,9
Anidroxilose	86,6 ± 1,0	62,7 ± 0,7	51,2 ± 1,4	57,2 ± 3,6	80,2 ± 0,5	69,8 ± 0,5	69,3 ± 2,3
Anidroarabinose	93,8 ± 1,1	88,4 ± 0,9	69,8 ± 1,9	71,8 ± 4,5	91,2 ± 0,5	97,9 ± 0,6	97,4 ± 4,2
Grupo acetila	64,2 ± 0,8	64,4 ± 0,7	67,9 ± 1,9	73,9 ± 4,6	66,0 ± 0,4	64,4 ± 0,4	64,0 ± 2,8

Legenda: BF, bagaço de cana pré-tratado por catálise fosfórica; BA, bagaço de cana pré-tratado por auto-hidrólise; BS, bagaço de cana pré-tratado por catálise sulfúrica.

**Tabela A1.2.** Composição química do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na condição de auto-hidrólise (195 °C por 7,5 min).

Componente	Percentual (%)
Anidroglucose <sup>1</sup>	54,7 ± 0,8
Anidroxilose <sup>2</sup>	3,4 ± 0,2
Anidroarabinose <sup>2</sup>	ald
Grupo acetila <sup>2</sup>	ald
Hexoses desidratadas <sup>3</sup>	0,9 ± 0,2
Pentoses desidratadas <sup>4</sup>	0,4 ± 0,0
Lignina total <sup>5</sup>	34,0 ± 0,9
<i>Lignina solúvel em ácido</i>	3,7 ± 0,2
<i>Lignina insolúvel em ácido</i>	30,3 ± 0,7
Cinzas	5,2 ± 0,5
<b>Total</b>	<b>98,6</b>

Legenda: ald, abaixo do limite de detecção.

<sup>1</sup>Presente como componente das  $\beta$ -(1→4)-D-glucanas (celulose);

<sup>2</sup>Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

<sup>3</sup>Quantificado como 5-(hidroximetil)-furfural (HMF);

<sup>4</sup>Quantificado como furfural;

<sup>5</sup>Somatório das ligninas insolúvel e solúvel em ácido sulfúrico diluído.

## APÊNDICE 2

Resultados adicionais do pré-tratamento do bagaço de cana com o sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O

**Tabela A2.1.** Recuperação dos principais componentes nas frações insolúvel e solúvel em água após as diferentes condições de pré-tratamento pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O do bagaço de cana.

Componente	Percentual (%)						
	BC-5	BC-3	BC-6	BC-7	BC-1	BC-4	BC-2
<i>Material pré-tratado</i>							
Anidroglicose	101,8 ± 0,1	100,2 ± 3,5	99,0 ± 2,5	101,0 ± 0,9	94,6 ± 4,2	93,1 ± 0,5	79,3 ± 3,0
Anidroxilose	56,0 ± 2,3	43,3 ± 1,0	26,2 ± 0,8	25,9 ± 1,1	22,8 ± 1,1	10,5 ± 0,7	9,2 ± 0,1
Anidroarabinose	33,4 ± 6,6	40,7 ± 1,1	31,8 ± 1,3	32,5 ± 3,0	32,9 ± 3,7	2,1 ± 0,1	18,8 ± 0,2
Grupo acetila	52,5 ± 1,0	44,4 ± 2,2	23,9 ± 1,0	24,3 ± 2,6	24,3 ± 1,9	7,6 ± 0,3	8,1 ± 1,0
Lignina total	95,9 ± 3,1	103,5 ± 4,9	98,7 ± 1,9	97,3 ± 1,1	99,2 ± 2,9	104,8 ± 7,5	108,2 ± 0,1
<i>Fração solúvel em água</i>							
Anidroglicose	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,6	5,5 ± 0,4	6,3 ± 0,4	7,5 ± 0,6
Anidroxilose	33,7 ± 1,4	35,5 ± 0,7	46,7 ± 1,7	31,7 ± 1,3	38,0 ± 0,9	10,3 ± 0,8	9,2 ± 0,7
Anidroarabinose	48,7 ± 3,0	46,7 ± 0,9	52,9 ± 0,0	45,3 ± 3,5	46,6 ± 1,7	34,3 ± 0,8	35,9 ± 0,9
Grupo acetila	53,0 ± 3,2	59,5 ± 2,4	79,4 ± 3,8	83,0 ± 4,5	86,5 ± 3,5	111,0 ± 4,9	120,3 ± 2,9

Legenda: BC, bagaço de cana pré-tratado pelo sistema CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O.

### APÊNDICE 3

#### Resultados adicionais do pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com hidróxido de sódio

**Tabela A3.1.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0005	2	0,0003	125,57	19,00	0,98	0,99
Resíduos	0,0000	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	1,04	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0005	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0005	2	0,0002	52,66	19,00	0,95	0,98
Resíduos	0,0000	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	3,38	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0005	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

**Tabela A3.2.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio.

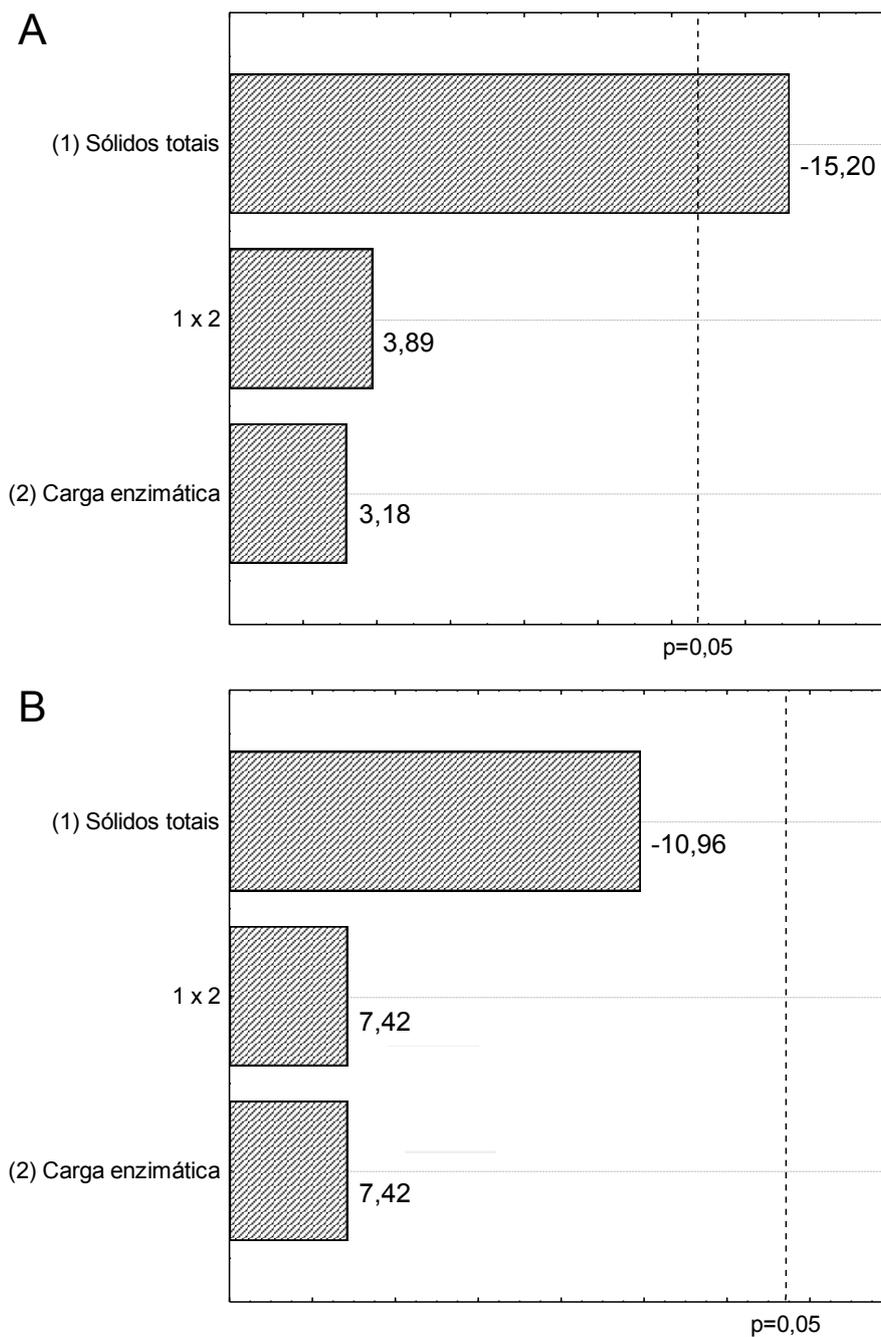
Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0109	2	0,0055	6,86	19,00	0,68	0,87
Resíduos	0,0016	2	0,0008				
Falta de ajuste	0,0016	1	0,0016	793,50	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0125	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0104	2	0,0052	2,73	19,00	0,33	0,73
Resíduos	0,0038	2	0,0019				
Falta de ajuste	0,0038	1	0,0038	1908,17	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0142	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

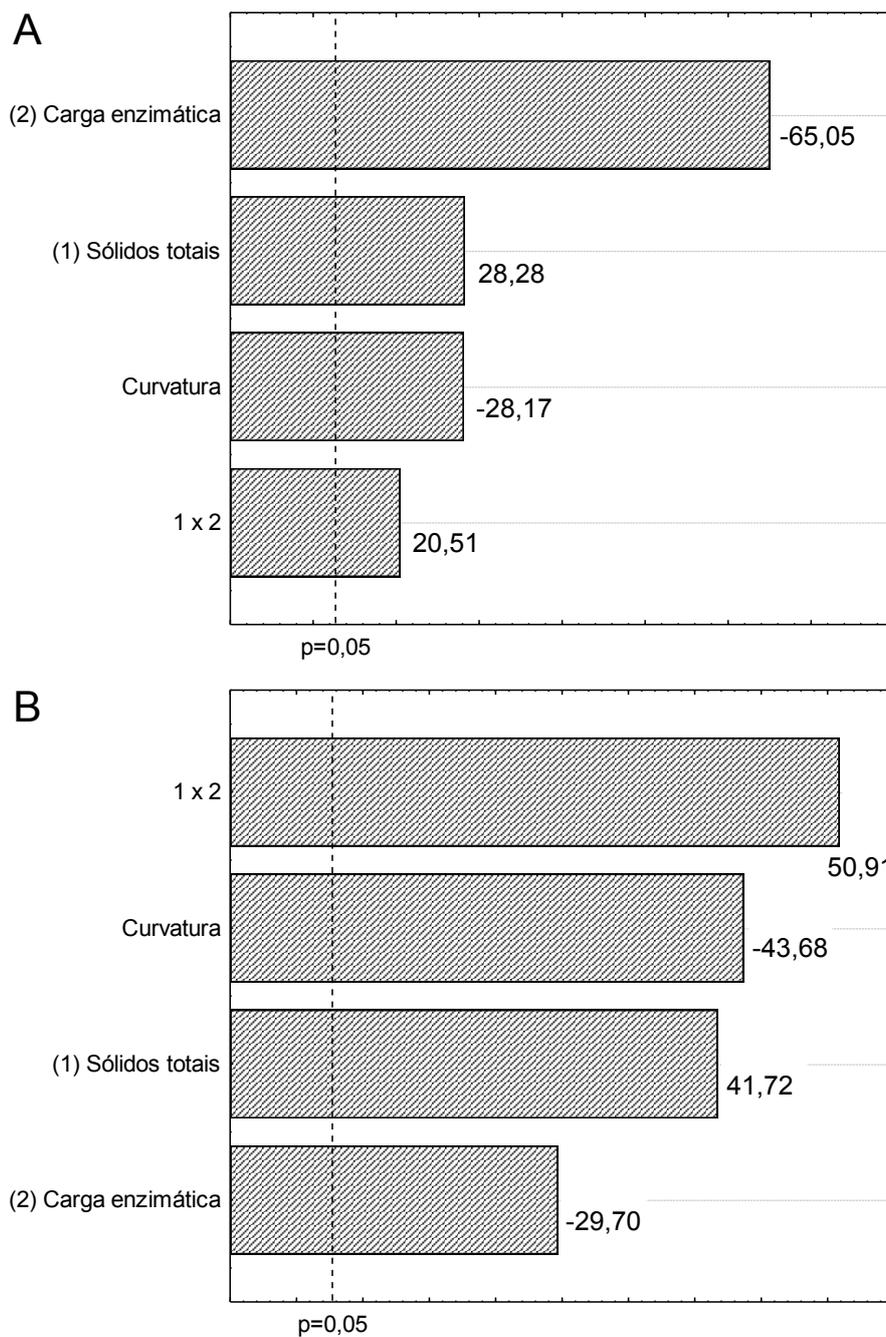
<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.



**Figura A3.1.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio.



**Figura A3.2.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com hidróxido de sódio.

**Tabela A3.3.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0005	2	0,0002	25,58	19,00	0,91	0,96
Resíduos	0,0000	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	8,17	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0005	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0011	2	0,0005	36,59	19,00	0,93	0,97
Resíduos	0,0000	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	13,50	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0011	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

**Tabela A3.4.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio.

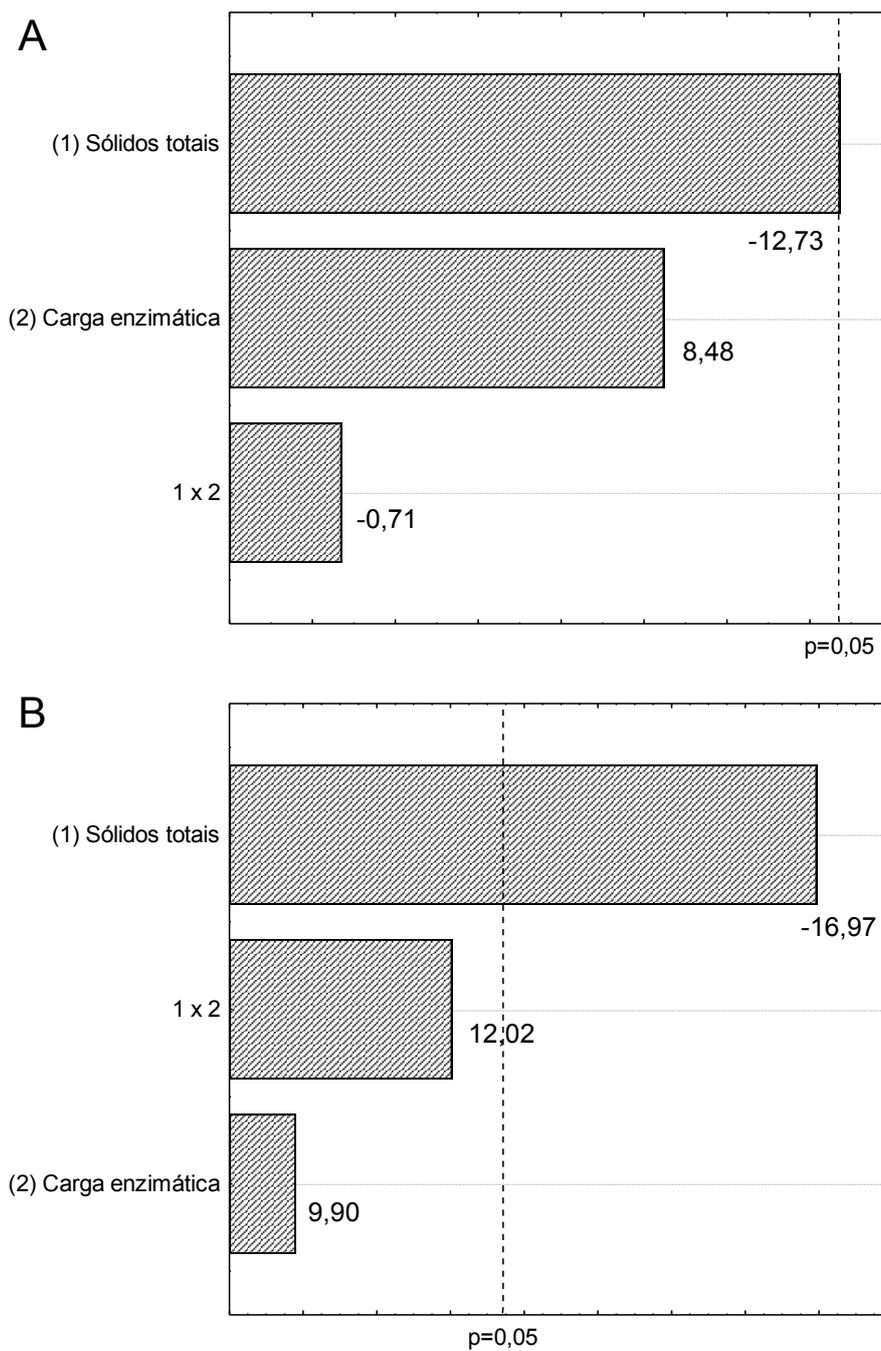
Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0083	2	0,0042	2,28	19,00	0,24	0,70
Resíduos	0,0036	2	0,0018				
Falta de ajuste	0,0036	1	0,0036	1820,04	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0120	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0187	2	0,0093	2,49	19,00	0,28	0,71
Resíduos	0,0075	2	0,0038				
Falta de ajuste	0,0075	1	0,0075	3750,00	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0262	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

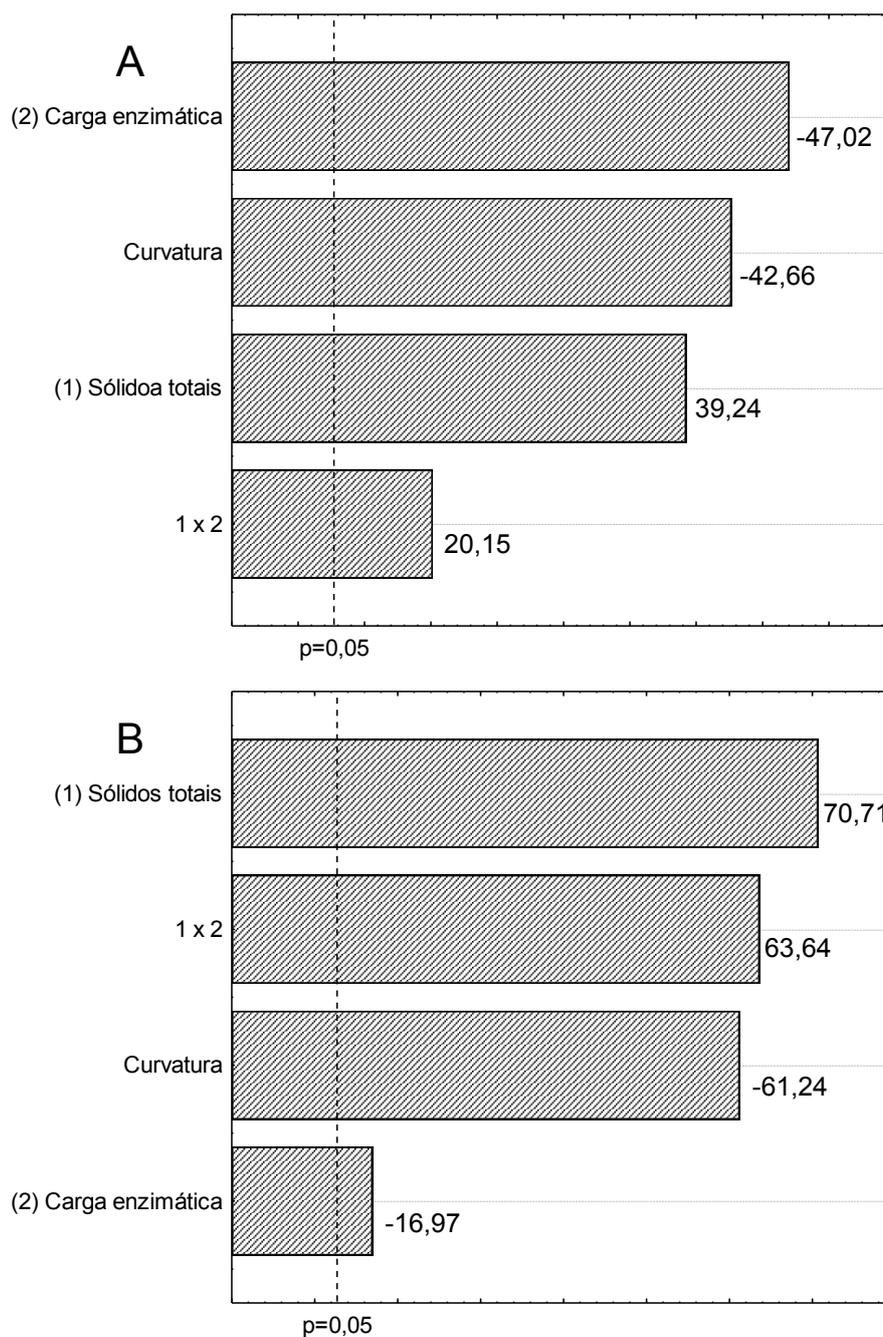
<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.



**Figura A3.3.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio.



**Figura A3.4.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com hidróxido de sódio.

## APÊNDICE 4

### Resultados adicionais do pré-tratamento dos resíduos do processamento do algodão com imidazol

**Tabela A4.1.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0027	2	0,0014	339,25	19,00	0,99	0,99
Resíduos	0,0000	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0000	1	0,0000	0,89	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0027	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0031	2	0,0015	18,27	19,00	0,87	0,95
Resíduos	0,0002	2	0,0001				
Falta de ajuste	0,0002	1	0,0002	20,17	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0033	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

**Tabela A4.2.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol.

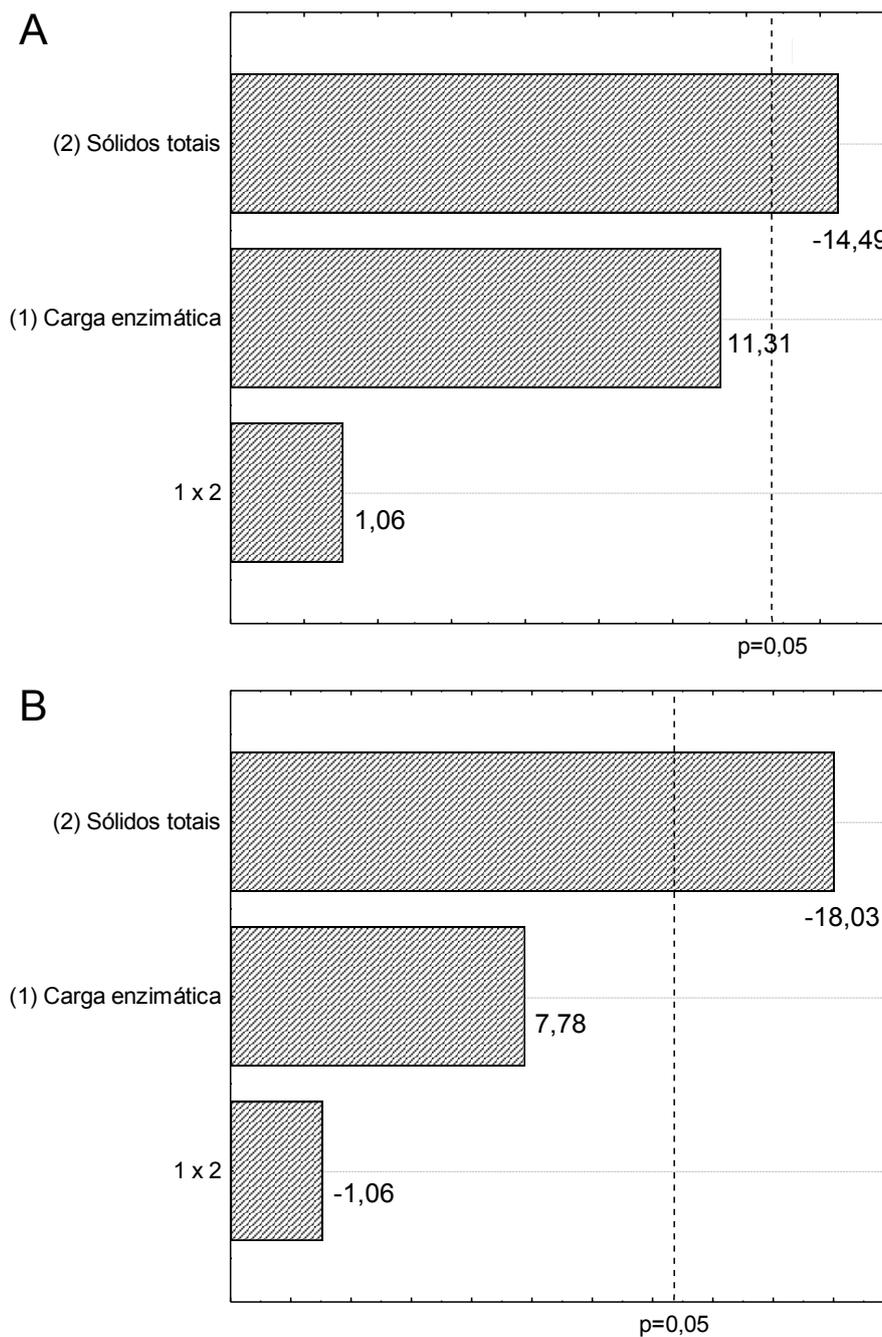
Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0093	2	0,0046	93,80	19,00	0,97	0,99
Resíduos	0,0001	2	0,0000				
Falta de ajuste	0,0001	1	0,0001	11,34	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0094	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0057	2	0,0028	5,59	19,00	0,62	0,85
Resíduos	0,0010	2	0,0005				
Falta de ajuste	0,0010	1	0,0010	126,04	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0067	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

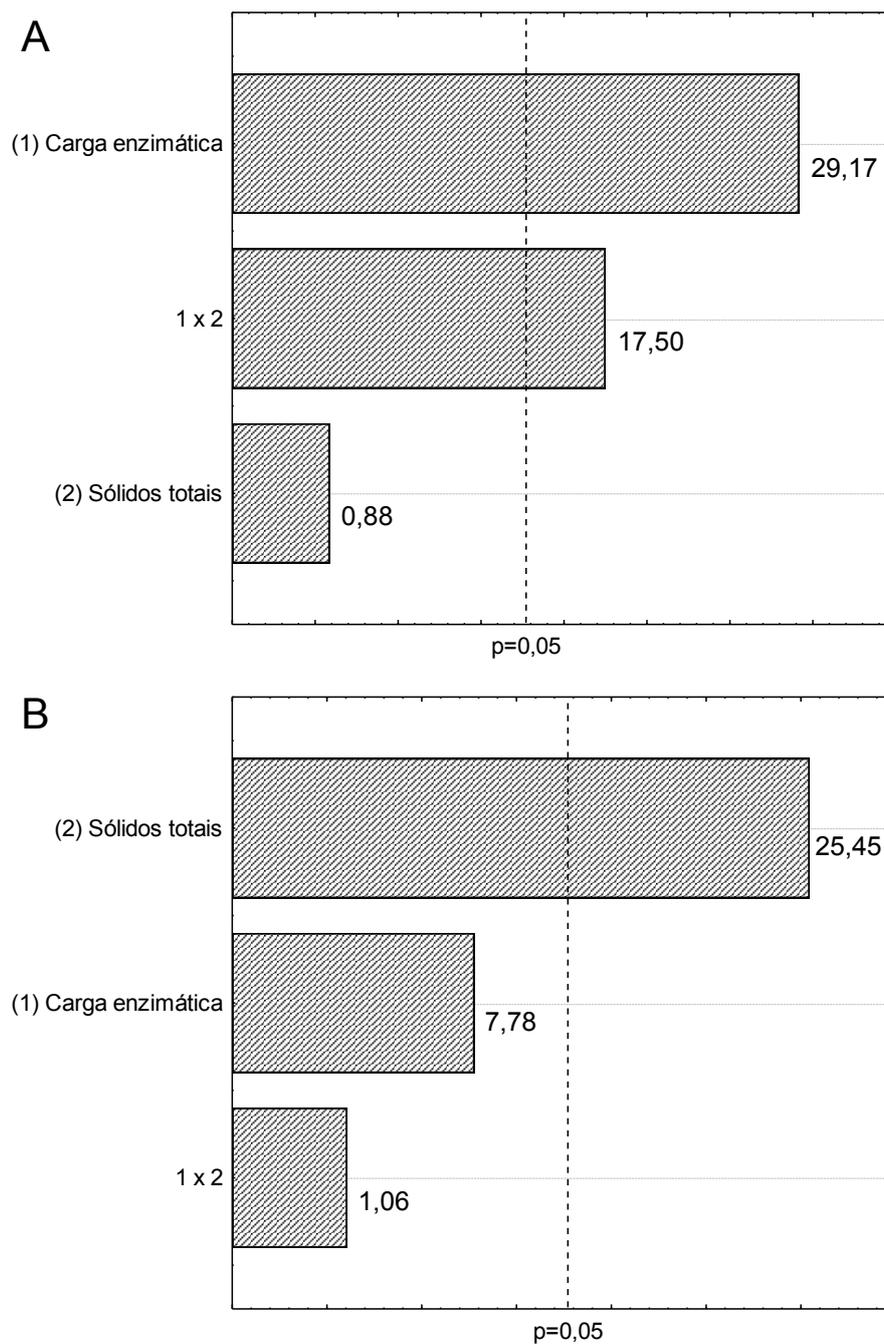
<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.



**Figura A4.1.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol.



**Figura A4.2.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do pó de filtro pré-tratado com imidazol.

**Tabela A4.3.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol.

Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0045	2	0,0022	17,67	19,00	0,87	0,95
Resíduos	0,0003	2	0,0001				
Falta de ajuste	0,0003	1	0,0003	126,04	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0047	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0132	2	0,0066	80,84	19,00	0,97	0,99
Resíduos	0,0002	2	0,0001				
Falta de ajuste	0,0002	1	0,0002	80,67	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0134	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.

**Tabela A4.4.** Análise de variância (ANOVA) para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de EqGlc e xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol.

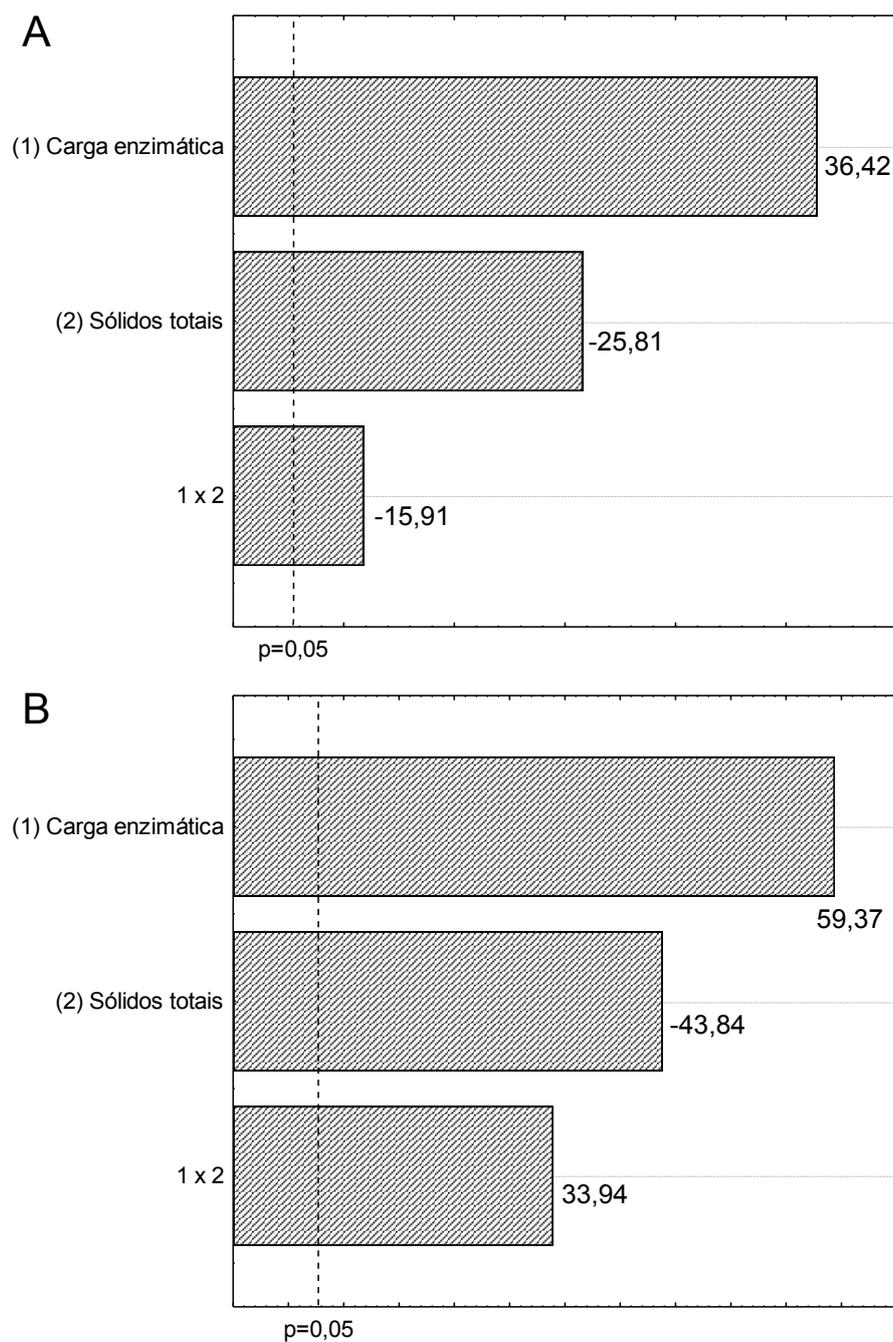
Fonte	SQ <sup>1</sup>	GL <sup>2</sup>	QM <sup>3</sup>	F	F <sub>tab</sub>	R <sup>2</sup>	Var <sup>4</sup>
<i>Rendimento de EqGlc</i>							
Regressão	0,0515	2	0,0258	81,40	19,00	0,97	0,99
Resíduos	0,0006	2	0,0003				
Falta de ajuste	0,0006	1	0,0006	315,37	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0521	4					
<i>Rendimento de xilose</i>							
Regressão	0,0566	2	0,0283	8,07	19,00	0,72	0,89
Resíduos	0,0070	2	0,0035				
Falta de ajuste	0,0070	1	0,0070	3504,17	161,45		
Erro puro	0,0000	1	0,0000				
Total	0,0636	4					

<sup>1</sup>SQ: soma dos quadrados;

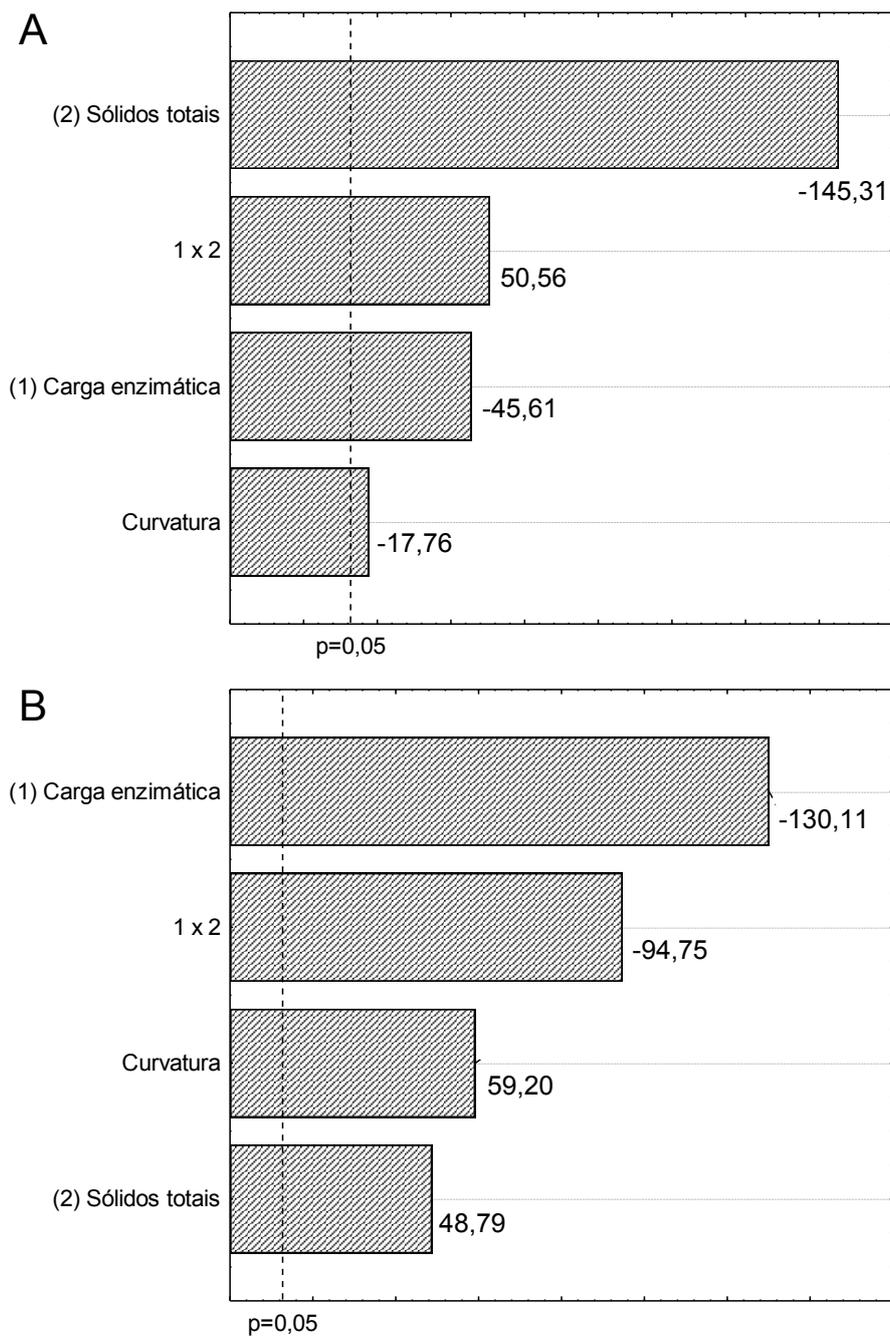
<sup>2</sup>GL: graus de liberdade;

<sup>3</sup>QM: quadrados médio;

<sup>4</sup>Var: máxima variância explicada pelo modelo.



**Figura A4.3.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $k$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol.



**Figura A4.4.** Gráficos de Pareto para o parâmetro  $h$  dos rendimentos de (A) EqGlc e (B) xilose do piolho sujo pré-tratado com imidazol.