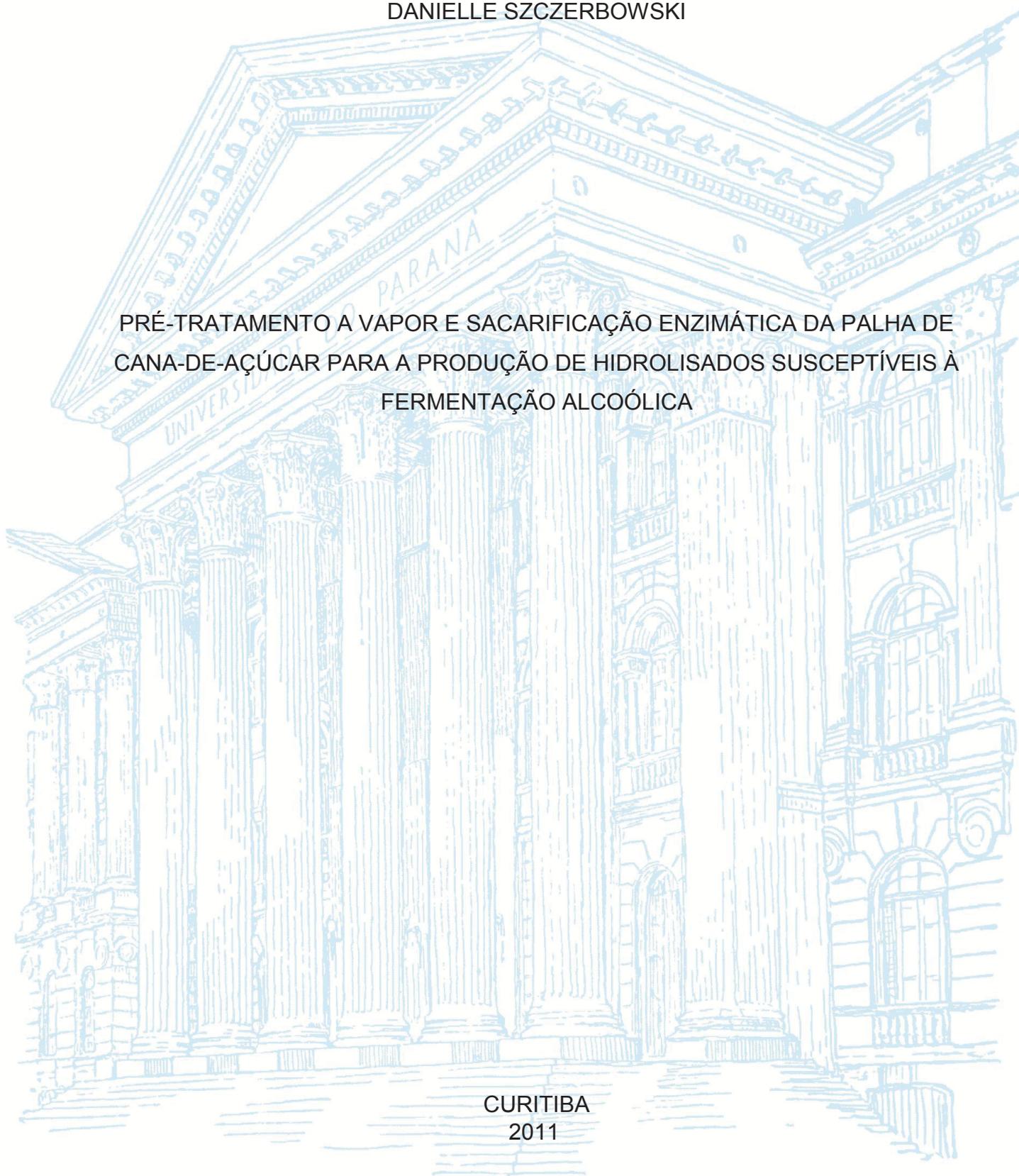


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLE SZCZERBOWSKI

PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS SUSCEPTÍVEIS À
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

CURITIBA
2011



DANIELLE SZCZERBOWSKI

PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS SUSCEPTÍVEIS À
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, subárea de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2011

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S996p	<p>Szczerbowski, Danielle</p> <p>Pré-tratamento a vapor e sacarificação enzimática da palha de cana-de- açúcar para a produção de hidrolisados susceptíveis à fermentação alcoólica [recurso eletrônico] / Danielle Szczerbowski. – Curitiba, 2011.</p> <p>Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.</p> <p>Orientador: Luiz Pereira Ramos .</p> <p>1. Bagaço de cana. 2. Cana-de-açúcar. 3. Cana-de-açúcar – Derivados. 4. Etanol. 5. Hidrólise . I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Título.</p> <p>CDD: 547</p>
-------	---

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894

TERMO DE APROVAÇÃO

**PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR E SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DA PALHA DE
CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS SUSCEPTÍVEIS À
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

por

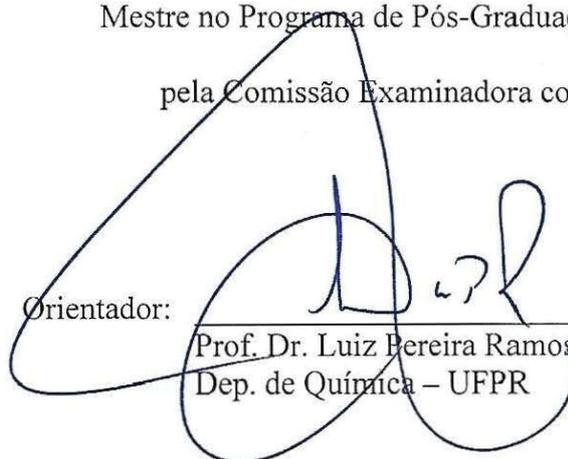
DANIELLE SZCZERBOWSKI

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

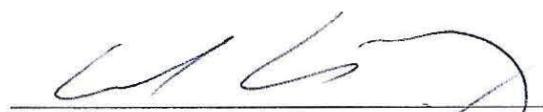
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador:



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



Prof. Dr. Andre Luis Ferraz
Faculdade de Engenharia Química – USP



Prof. Dr. Alfredo Ricardo Marques de Oliveira
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 28 de fevereiro de 2011.

Dedico este trabalho a uma das pessoas que foi mais importante em minha vida, que me incentivou a sempre seguir brilhando na vida, me ensinou a ser uma pessoa boa e temente a Deus, e que, acima de tudo, perto ou longe, esteve sempre ao meu lado me dando muito amor e carinho em todos os momentos de minha jornada.

Para a minha querida Oma Úrsula, que deixou de brilhar na Terra para brilhar no Céu!

“Deus nunca disse que a vida seria fácil.
Ele simplesmente prometeu que valeria a pena!”
Autor desconhecido

*“O Senhor é meu pastor,
nada me faltará.”
Sl. 23-1*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e sabedoria e por sempre estar à frente em minhas escolhas, fazendo maravilhas em minha vida;

À minha mãe Sigridt e ao meu pai Norberto, por todo amor, carinho e dedicação ao me ensinar a caminho a seguir, especialmente à minha mãe por sempre nos incentivar a estudar e à fazermos aquilo que amamos;

À minha irmã Daiane, que foi minha grande amiga e companheira nestes tantos anos de Química juntas, pelo seu amor, pelas risadas e por tudo que partilhamos juntas;

Ao meu irmão Felipe, ao meu opa Walter, à minha oma Úrsula (*in memoriam*) e a minha família pelo apoio, amor e carinho;

Ao Prof. Luiz Pereira Ramos, pela orientação e paciência em me ensinar, pelos incentivos e conhecimentos e pelo apoio nos momentos difíceis;

Aos meus amigos Andréia, Ana Helena, Rafa, Carol, Mari, Lidi, Flávio e Will, pela amizade de anos, pelos momentos de descontração (fundamentais nesta caminhada) e pelo apoio;

Ao Prof. Alfredo R. M. de Oliveira e ao Prof. André Ferraz, pelo aceite para participar da banca e pelo conhecimento;

À Ana Paula e à Wiviane, pela ajuda no laboratório, companheirismo e amizade;

Ao Marcos Silveira e ao Rodrigo Aguiar, pelas inúmeras contribuições para o desenvolvimento desta dissertação;

Aos professores André Ferraz e equipe, Patricio Peralta-Zamora e Andersson Barison, aos amigos Arion, Rafa, Ricardo, Marcos e Michael, e à Novozymes Latin America, pelas análises e/ou interpretações de resultados;

À turma do banco da síntese Ana Cristina, Claudio, Diogo, Rafael, Flávia, Murilo, Juliana, Sérgio, Mayara e Guilherme, pela amizade e pelas boas risadas;

À turma da síntese em especial, pelos tantos empréstimos que ajudaram no andamento deste trabalho;

Aos colegas do Cepesq;

Aos colegas do Departamento de Química;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química.

Ao CNPq e à Capes, pela concessão de financiamento à pesquisa e pela bolsa de estudos, respectivamente;

À Comunidade Europeia que, através do Projeto CaneBioFuel, financiou parcialmente a realização deste projeto de pesquisa;

Aos membros do consórcio executivo do Projeto CaneBioFuel, Prof. Guido Zacchi (Universidade de Lund, Lund, Suécia), Dra. Nina Eriksen (Novozymes AS, Bagsvaerd, Dinamarca), Dr. Benjamin Knudsen (Novozymes Latin America, Araucária, PR) e Dr. Oswaldo Godoy (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP), pela colaboração na execução do projeto;

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram com o bom andamento deste projeto.

RESUMO

O uso contínuo da energia fóssil vem sendo relatado como um problema para o futuro por envolver fontes finitas de energia cuja exploração desenfreada é prejudicial para o planeta. No intuito de contornar estes problemas, fontes renováveis de energia vêm sendo investigadas para substituir combustíveis fósseis como a gasolina e o óleo diesel. A biomassa vegetal, de composição lignocelulósica, representa uma fonte inesgotável de polissacarídeos como a celulose e as hemiceluloses que podem ser convertidos por hidrólise ácida ou enzimática e posterior fermentação a etanol de segunda geração, na tentativa de ampliar a importância do etanol como biocombustível alternativo. O Brasil é um dos maiores produtores mundial de cana-de-açúcar e devido a isto, a geração de resíduos do processamento da cana, denominados palha e bagaço, tem atraído a atenção dos pesquisadores por oferecer uma boa opção para a produção deste biocombustível. Para que isto seja possível, é necessário primeiramente realizar um pré-tratamento a fim de aumentar a acessibilidade química da celulose, uma vez que esta se encontra embebida em uma matriz composta por hemiceluloses e lignina. A composição química da palha de cana-de-açúcar revelou teores interessantes de celulose para produção de etanol. Além disso, o baixo teor de lignina indica que a palha pode apresentar boa susceptibilidade ao pré-tratamento. No entanto, a caracterização de seus componentes macromoleculares revelou, de forma qualitativa, que a lignina possui mais unidades guaiacila em sua estrutura, indicando uma estrutura mais condensada e com maior associação com os carboidratos, o que poderia dificultar a etapa de pré-tratamento. O pré-tratamento foi realizado utilizando dois planejamentos fatoriais 2^3 com e sem catálise ácida. O objetivo dos planejamentos foi o de avaliar os efeitos da temperatura (180 e 210 °C), do tempo de permanência no reator (5 e 10 min), da umidade da biomassa (8,4 e 29,5 %) e da concentração de ácido fosfórico (9,5 e 19 mg ácido/g palha seca) sobre a estrutura e reatividade do material lignocelulósico. Este estudo revelou que o aumento da umidade da palha não exerceu influência sobre a solubilização das hemiceluloses e, conseqüentemente, sobre o aumento da acessibilidade da celulose à hidrólise enzimática, ao passo que o aumento da concentração de ácido foi de suma importância para a hidrólise das hemiceluloses, assim como a temperatura e o tempo de pré-tratamento. A partir dos resultados de recuperação de glucose no pré-tratamento e dos dados da conversão de celulose em glucose via hidrólise enzimática, foi possível selecionar condições que pudessem maximizar os rendimentos do processo, sendo elas 9,5 mg de H_3PO_4 por grama de palha seca e 180 °C por 10 min, que apresentou uma recuperação de glucose, xilose e arabinose de 90,0, 80,8 e 76,6 %, respectivamente, e uma sacarificação da celulose de 64,5 % empregando a enzima Cellic CTec 2 (Novozymes) a 2,5 mg enzima por g de bagaço seco em ensaios de hidrólise realizados a 8 % em relação ao peso seco do substrato. A caracterização do substrato obtido nestas condições revelou que o pré-tratamento forneceu uma celulose com maior índice de cristalinidade, provavelmente devido à reorganização supramolecular de cadeias de menor grau de polimerização, sendo este aproximadamente a metade daquele caracterizado no material *in natura*. Por outro lado, a lignina apresentou menor massa molar média, paralelamente a uma estrutura de maior grau de condensação.

Palavras-chave: Etanol. Palha de cana. Caracterização química. Explosão a vapor. Hidrólise enzimática.

ABSTRACT

The continuous use of fossil energy has been related as a problem for the future once it involves finite energy sources whose unbridled exploitation is harmful to the planet. In order to overcome these problems, renewable energy sources are being investigated to replace fossil fuels such as petrol and diesel oil. The vegetable biomass, lignocellulosic composition, represents an inexhaustible source of polysaccharides such as cellulose and hemicellulose that can be converted by acid or enzymatic hydrolysis and subsequent fermentation to second generation ethanol, in an attempt to magnify the importance of ethanol as an alternative biofuel. Brazil is one of the world's largest producers of sugarcane and because of this, the generation of waste from cane processing, named bagasse and straw, has attracted the attention of researchers by offering a good choice for the production of this biofuel. To make this possible, first a pretreatment performance is necessary in order to increase accessibility of cellulose, since it's embedded in a matrix of hemicellulose and lignin. The chemical composition of sugarcane straw revealed interesting contents of cellulose to ethanol production. Furthermore, the low lignin content indicates that the straw may have good susceptibility toward pretreatment. However, the characterization of the macromolecular components revealed, in a qualitative way, that straw lignin structure has more guaiacyl units, indicating a more condensed lignin and more associated with carbohydrates, which could hamper the pretreatment step. The pretreatment was performed by two factorial designs 2^3 with and without acid catalysis. The objective was evaluate the effects of temperature (180 e 210 °C), residence time in the reactor (5 and 10 min), biomass moisture (8.4 and 29.5 wt %) and concentration of phosphoric acid (9.5 and 19 mg acid / g dry straw) on the structure and reactivity of lignocellulosic material. This study showed that the increasing of the straw moisture did not influence the solubilization of hemicellulose and, consequently, on increasing of cellulose accessibility to enzymatic hydrolysis, whereas the concentration of acid was of great importance for the hydrolysis of hemicellulose as well as temperature and time of pretreatment. Based on the results of glucose recovery in the pretreatment and data conversion of cellulose in glucose via enzymatic hydrolysis, it was possible to select conditions that would maximize the process yields, which were 9.5 mg of H_3PO_4 per gram of dry straw and 180 °C for 10 min, with a recovery of glucose, xylose and arabinose of 90.0, 80.8 and 76.6 %, respectively, and a cellulose saccharification of 62,5 % using the Cellic CTec 2 (Novozymes) enzyme to a load of 2,5 mg enzyme per gram of dry bagasse in hydrolysis assays performed at 8 % in relation of the dry weight of the substrate. The characterization of the substrate obtained under these conditions showed that the pretreatment provided a cellulose with higher crystallinity, probably due to the reorganization of supramolecular chains with lower degree of polymerization, being approximately half of that featured in the raw material. Moreover, the lignin had lower average molar weight in addition to a structure with higher degree of condensation.

Keywords: Ethanol. Sugarcane straw. Chemical characterization. Steam explosion. Enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ASSOCIAÇÃO QUÍMICA NA PAREDE CELULAR DE VEGETAIS SUPERIORES (RAMOS, 2003).	5
FIGURA 2. FORMAÇÃO DA CADEIA DE CELULOSE PELA UNIÃO DE UNIDADES β -D-GLUCOSE (MORAIS <i>et al.</i> , 2005)	6
FIGURA 3. FORMAÇÃO DOS DOIS ANÔMEROS HEMIACETÁLICOS DA D-GLUCOSE – MUTARROTAÇÃO DA GLUCOSE (SILVA <i>et al.</i> , 2006).	7
FIGURA 4. SUBSTITUINTES AXIAIS E EQUATORIAIS NA CONFORMAÇÃO EM CADEIRA DO ANEL HEMIACETÁLICO.	7
FIGURA 5. REGIÕES CRISTALINAS E AMORFAS NA ESTRUTURA DA CELULOSE (JARDINE <i>et al.</i> , 2009).	8
FIGURA 6. LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO RESPONSÁVEIS PELA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE (MODIFICADO DE GARRETT; GRISHAM, 1999).	9
FIGURA 7. MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES: (1) D-GLUCOSE, (2) D-GALACTOSE, (3) L-ARABINOSE, (4) D-XILOSE, (5) D-MANOSE, (6) 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO E (7) L-RHAMNOSE (SJÖSTRÖM; WESTERMARK, 1999).	10
FIGURA 8. ESTRUTURA DE UMA ARABINOXILANA COM AS POSSÍVEIS LIGAÇÕES FORMADAS ENTRE A XILOSE E A ARABINOSE (CHAPLIN, 2011).	10
FIGURA 9. ESTRUTURA DOS ALCOÓIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992).	11
FIGURA 10. LIGAÇÕES EXISTENTES ENTRE AS UNIDADES MONOLIGNÓIS NA ESTRUTURA DA LIGNINA.	12
FIGURA 11. ESTRUTURA DO COMPLEXO LIGNINA-CARBOIDRATO E AS LIGAÇÕES EXISTENTES ENTRE AS UNIDADES MONOLIGNÓIS (SAKAGAMI <i>et al.</i> , 2010).	13
FIGURA 12. FONTES DE ETANOL E SUBPRODUTOS GERADOS (BASTOS 2007).	16
FIGURA 13. DIAGRAMA GLOBAL DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E SUAS POSSÍVEIS FORMAS DE INTEGRAÇÃO (PITARELO <i>et al.</i> , 2010)	18
FIGURA 14. FRAGMENTAÇÃO DA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (RAMOS, 2003)	22
FIGURA 15. PADRÃO DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA COMO RESULTADO DA EXPLOSÃO A VAPOR (TANAHASHI 1990 citado por RAMOS 2003).	24
FIGURA 16. MATRIZ UTILIZADA PARA CÁLCULOS DA MODELAGEM QUADRÁTICA.	47
FIGURA 17. PORCENTUAL DOS COMPOSTOS EXTRAÍVEIS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ÉTER ETÍLICO (EE), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENTO 1:2 (ETOH/TOL), ETANOL (ETOH 95%) E ÁGUA QUENTE. 51	

FIGURA 18. ESPECTROS DE IVTF DOS EXTRAÍVEIS DA PALHA, OBTIDOS EM CADA UM DOS SOLVENTES UTILIZADOS.	52
FIGURA 19. PERFIL DE DRX DA PALHA <i>IN NATURA</i> LIVRE DE EXTRAÍVEIS (PALHA-LE) E DA SUA HOLOCELULOSE (PALHA-HOLO) E α -CELULOSE.	57
FIGURA 20. PERFIL DE DRX DAS HEMICELULOSES A E B DA PALHA.	59
FIGURA 21. PERFIL DE DRX DA CELULOSE DE SISAL ANTES E APÓS MERCERIZAÇÃO COM NaOH 20 % (M/V) (ALMEIDA, 2009).	58
FIGURA 22 . PERFIL DE IVTF DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA <i>IN NATURA</i> ANTES (LPIN) E DEPOIS DE ACETILADA (LPIN-ACETILADA).	63
FIGURA 23. ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 400 MHz DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA EM DMSO- d_6	63
FIGURA 24. ESPECTRO DE RMN DE ^1H 400 MHz DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA EM CDCl_3	64
FIGURA 25. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA.	66
FIGURA 26. CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS DO PONTO CENTRAL PC-AF ANTES (A E C) E DEPOIS (B E D) DA PÓS-HIDRÓLISE. (A) E (B) – DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRAÇÃO. (C) E (D) – DETECTOR DE ULTRAVIOLETA.	68
FIGURA 30. ANÁLISE DA MODELAGEM QUADRÁTICA EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS A VAPOR.	88
FIGURA 31. ANÁLISE DA MODELAGEM QUADRÁTICA EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS A VAPOR E LAVADOS COM ÁGUA.	88
FIGURA 34. ÁCIDOS FERÚLICO E COUMÁRICO LIGADOS À ARABINOSE EM UMA CADEIA DE ARABINOXILANA (R = H, OCH_3).	95
FIGURA 35. TEORES DOS ÉSTERES E ÉTERES DOS ÁCIDOS FERÚLICO (AF) E COUMÁRICO (AC) NA PALHA <i>IN NATURA</i> (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*), EXPRESSOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA DO MATERIAL DE ORIGEM.	96
FIGURA 36. ESTRUTURA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NA FS DERIVADA DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA POR CG-EM.	98
FIGURA 37. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA PALHA <i>IN NATURA</i> (PIN), DA PALHA PRÉ-TRATADA (EXPERIMENTO AF-2*) E DE SUAS RESPECTIVAS HOLOCELULOSES (PIN-HOLO E AF-2*-HOLO).	102
FIGURA 40. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA DIOXANO DERIVADA DA PALHA <i>IN NATURA</i> (PIN) E DA PALHA PRÉ-TRATADA SOB CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO PRÉ-SELECIONADAS (AF-2*).	109
FIGURA 41. GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO LAVADO COM ÁGUA QUE FOI DERIVADO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA SOB CONDIÇÕES PRÉ-SELECIONADAS.	110

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA (%) EM DIFERENTES PLANTAS (AHMED <i>et al.</i> , 2001).	4
TABELA 2. EXEMPLOS DE PRÉ-TRATAMENTOS ATUALMENTE UTILIZADOS PARA DIFERENTES TIPOS DE BIOMASSA VEGETAL.	20
TABELA 3. PLANEJAMENTOS FATORIAIS A E B PARA O PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.	42
TABELA 4. LIMITES SUPERIORES E INFERIORES DE CADA VARIÁVEL DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS.	45
TABELA 5. ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS.	50
TABELA 6. PORCENTUAL MÁSSICO DOS COMPONENTES DE AMOSTRAS SECAS E LIVRES DE EXTRAÍVEIS DA PALHA E DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	54
TABELA 7. PORCENTUAL DA HOLOCELULOSE E DE SUAS FRAÇÕES EXPRESSOS EM RELAÇÃO À PALHA SECA E LIVRE DE EXTRAÍVEIS.	56
TABELA 8. PORCENTUAL MÁSSICO DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE, DA α -CELULOSE E DAS HEMICELULOSES A E B.	56
TABELA 9. ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.	58
TABELA 10. GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E POLIDISPERSIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, DETERMINADOS POR CPG.	60
TABELA 11. RAZÃO MOLAR DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA PALHA <i>IN NATURA</i> E NAS FRAÇÕES DELA DERIVADAS (AnGlc:AnXyl:AnAra).	61
TABELA 12. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA E DAS FIBRAS RESULTANTES DA EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl, A PARTIR DA PALHA LIVRE DE EXTRAÍVEIS.	62
TABELA 13. PORCENTUAL DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA ESTRUTURA QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO.	64
TABELA 14. MASSA MOLAR APARENTE E POLIDISPERSIVIDADE DA LIGNINA DIOXANO ACETILADA, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL.	66
TABELA 15. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES DO PLANEJAMENTO A.	69
TABELA 16. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO DO PLANEJAMENTO A.	70
TABELA 17. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FI DE CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO A.	71

TABELA 18. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FS DE CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO A.....	71
TABELA 19. BALANÇO DE MASSAS DOS CONSTITUINTES DA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA).....	72
TABELA 20. EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO DA FS, FI E TOTAL E PARA O BALANÇO DE MASSAS (FI+FS) DO PLANEJAMENTO A.	73
TABELA 21. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES.....	75
TABELA 22. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.	76
TABELA 23. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA A FRAÇÃO INSOLÚVEL DE CADA EXPERIMENTO REALIZADO.....	78
TABELA 24. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FRAÇÃO SOLÚVEL DE CADA EXPERIMENTO REALIZADO.	78
TABELA 25. BALANÇO DE MASSAS DE CADA COMPONENTE PRESENTE NA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA) EM RELAÇÃO À MASSA SECA INICIAL EMPREGADA NO REATOR.	79
TABELA 26. EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO DA FS, FI E TOTAL E PARA O BALANÇO DE MASSAS DO PLANEJAMENTO B.	80
TABELA 27. TEOR DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS NA FS, BALANÇO DE MASSAS DE GLUCOSE APÓS O PRÉ-TRATAMENTO E TAXA DE CONVERSÃO DE CELULOSE NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	86
TABELA 28. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES.....	93
TABELA 29. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.	93
TABELA 30. RECUPERAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FI E FS DOS EXPERIMENTOS AF-2 E AF-2*.....	94
TABELA 31. BALANÇO DE MASSAS DE CADA COMPONENTE PRESENTE NA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA).	95
TABELA 32. COMPOSTOS FENÓLICOS LIBERADOS NO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA NO EXPERIMENTO ÓTIMO.	97
TABELA 33. ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, EXPRESSOS EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS, EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS OBTIDOS PARA A PIN.....	99
TABELA 34. PORCENTUAL MÁSSICO DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE DA PALHA <i>IN NATURA</i> (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*).	100

TABELA 35. ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	101
TABELA 36. GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E POLIDISPERSIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR DETERMINADOS POR CPG, ANTES E DEPOIS DO PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR.....	103
TABELA 37. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO E DAS FIBRAS DESLIGNIFICADAS POR ACIDÓLISE DA PALHA <i>IN NATURA</i> E DO EXPERIMENTO AF-2*.....	105
TABELA 38. GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA ESTRUTURA QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA <i>IN NATURA</i> E PRÉ-TRATADA.....	106
TABELA 39. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ¹ H DAS LIGNINAS DIOXANO PER-ACETILADAS ORIUNDAS DAS PALHAS NATIVA (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*).	107
TABELA 40. MASSA MOLAR APARENTE E POLIDISPERSIVIDADE DA LIGNINA DIOXANO ACETILADA DA PALHA <i>IN NATURA</i> (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*), OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL.	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF- = ácido fosfórico

AH- = auto-hidrólise

AnAra = anidroarabinose

AnGlc = anidrogucose

AnXyl = anidroxilose

AOAC = Associação Oficial dos Químicos Analistas

ATG = análise termogravimétrica

BGL = β -glucosidases

C = concentração

CBH = celobiohidrolase

CF = co-fermentação

CG-EM = cromatografia em fase gasosa com detector seletivo de massas

CLAE = cromatografia a líquido de alta eficiência

CPG = cromatografia de permeação em gel

DCM = diclorometano

DRX = difração de raios-X

EE = éter etílico

EG = endoglucanase

EqGlc HE = equivalente de glucose liberado pela hidrólise enzimática

EtOH = etanol

EtOH/Tol = etanol:tolueno 1:2 (v/v)

FI = fração insolúvel

FRX = Fluorescência de raios-X

FS = fração solúvel

G = guaiacila

GP = grau de polimerização

GP_M = grau de polimerização baseado na MM_M

GP_N = grau de polimerização baseado no MM_N

H = *p*-hidroxifenilpropanóides

HMF = hidroximetilfurfural

ICr = índice de cristalinidade

IVTF = espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier

LE = livre de extraíveis

MM = massa molar

MM_M = massa molar média

MM_N = número molar médio

MMA_M = massa molar aparente

MMA_N = número molar aparente

PC-AF = ponto central da catálise fosfórica

PC-AH = ponto central da auto-hidrólise

PD = polidispersividade

PIN = palha *in natura*

RID = índice de refração

RMN DE ¹H = ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN DE ¹³C = ressonância magnética nuclear de carbono-13

S = seringila

SSCF = sacarificação e co-fermentação simultâneas

SSF = sacarificação e fermentação simultâneas

ST = sólidos totais

ST-FI = sólidos totais da fração insolúvel

ST-FS = sólidos totais da fração solúvel

T = temperatura

t = tempo

T_R = tempo de retenção

TAPPI = Associação Técnica das Indústrias de Papel e Celulose

UV = espectrofotometria de absorção no ultravioleta

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1	Fontes de Energia	1
1.2	Biomassa vegetal	3
1.3	Composição química da biomassa vegetal	4
1.3.1	Celulose.....	6
1.3.2	Hemiceluloses	9
1.3.3	Lignina	11
1.3.4	Componentes minoritários.....	13
1.4	Etanol	14
1.5	Pré-tratamento.....	19
1.6	Hidrólise enzimática	24
2.	Objetivos	27
3.	Materiais e Métodos	28
3.1	Materiais.....	28
3.2	Determinação do teor de cinzas	28
3.3	Determinação da composição inorgânica das cinzas	28
3.4	Determinação do teor de extraíveis.....	29
3.5	Análise química pelo método da lignina de Klason	29
3.6	Determinação do teor de proteínas	31
3.7	Procedimento de obtenção da holocelulose e seus derivados	31
3.8	Determinação do índice de cristalinidade	33
3.9	Determinação da massa molar dos carboidratos	33
3.10	Determinação da razão molar dos carboidratos	34
3.11	Extração da lignina dioxano.....	35
3.12	Caracterização da lignina dioxano.....	36
3.12.1	Hidroxilas fenólicas.....	36
3.12.2	Hidroxilas alifáticas.....	37
3.12.3	Hidroxilas totais	37
3.12.4	Grupamentos ácidos	38
3.12.5	Carbonilas	38
3.12.6	Acetilação.....	39
3.12.7	Ressonância magnética nuclear (RMN)	39
3.12.7.1	RMN de ¹ H.....	39

3.12.7.2	RMN de ¹³ C.....	39
3.12.8	Determinação da massa molar aparente.....	40
3.12.9	Análise termogravimétrica (ATG)	40
3.13	Determinação dos teores de ácido ferúlico e p-coumárico.....	40
3.14	Pré-tratamento.....	41
3.15	Rendimento do pré-tratamento.....	43
3.15.1	Fração insolúvel	43
3.15.2	Fração solúvel	44
3.15.3	Sólidos totais e balanço de massas	45
3.16	Estudo da variância dos planejamentos fatoriais 2 ³	45
3.17	Determinação dos compostos fenólicos na fração solúvel por CLAE.....	46
3.18	Hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados	46
3.19	Modelagem matemática para seleção das melhores condições	47
3.20	Pré-tratamento nas condições do experimento selecionado	48
3.20.1	Determinação dos compostos fenólicos na fração solúvel por CG-EM	48
3.20.2	Caracterização do substrato.....	48
3.20.3	Hidrólise enzimática do substrato.....	48
4.	Resultados e Discussão	49
4.1	Caracterização da palha de cana-de-açúcar.....	49
4.1.1	Cinzas	49
4.1.2	Extraíveis.....	51
4.1.3	Lignina, carboidratos e demais componentes da biomassa	53
4.1.4	Caracterização dos carboidratos	55
4.1.5	Caracterização da lignina	61
4.2	Explosão a vapor.....	67
4.2.1	Planejamento A – Auto-hidrólise	69
4.2.2	Planejamento B - Catálise fosfórica.....	74
4.2.3	Planejamento C.....	81
4.2.4	Definição do experimento com as melhores condições.....	92
4.3	Pré-tratamento da palha nas condições selecionadas	92
4.3.1	Recuperação de sólidos totais e balanço de massas.....	93
4.3.2	Compostos fenólicos	96
4.4	Caracterização química do substrato	98
4.4.1	Cinzas	98

4.4.2	Carboidratos	100
4.4.3	Lignina dioxano	104
4.4.4	Hidrólise enzimática	109
5.	Conclusão	111
	Referências	112

1. Introdução

1.1 Fontes de Energia

Por cerca de duas décadas, o termo “desenvolvimento sustentável” tem predominado nas discussões sobre como cuidar melhor do nosso planeta, o que também implica em melhores condições de vida e de prosperidade para toda a raça humana. Portanto, a sustentabilidade engloba não somente questões ecológicas, mas também aspectos econômicos e sociais, que devem ser sempre considerados de forma integrada e coletiva. Uma definição abrangente para sustentabilidade foi inicialmente proposta pela Comissão Brundtland, por ocasião da Conferência Rio 1992. O relatório de Brundtland define desenvolvimento sustentável como um “processo que atende às necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras em atender as suas próprias necessidades”. Neste sentido, a energia desempenha um papel crucial no desenvolvimento sustentável da humanidade (PASKA *et al.*, 2009).

Um dos maiores problemas do modelo energético atual, baseado em fontes não renováveis como carvão, petróleo e gás natural, é que, a menos que medidas urgentes sejam tomadas, o crescimento da demanda levará a um aumento no custo dos combustíveis convencionais. Porém, outros desafios também estão diretamente relacionados ao presente modelo. Primeiro, existem os recorrentes danos ambientais causados pelo sistema energético convencional, como derramamentos de petróleo, acidentes nucleares, vazamentos de metano e emissões de gases do efeito estufa. Segundo, tornam-se cada vez mais evidentes os riscos relacionados à segurança energética de países que ainda se encontram em desenvolvimento (DE ALEGRÍA MANCISIDOR *et al.*, 2009), com implicações importantes na segurança alimentar. Sendo assim, a manutenção do uso descontrolado de energia fóssil encontra-se no sentido oposto à tentativa de garantir processos sustentáveis que preservem os ecossistemas, particularmente por serem fontes finitas e controladas por economias instáveis e, geralmente, antidemocráticas. O combate ao uso destas fontes de energia vem sendo baseado principalmente em questões ambientais, que foram materializadas por mecanismos internacionais de controle, como o Protocolo de Kyoto, que impõe metas de redução de emissões dos gases do efeito estufa e de

sustentabilidade ambiental para todos os países signatários (NIKNAM; FIROUZI, 2009).

O sistema energético internacional é fortemente dependente de combustíveis fósseis que ainda contribuem com mais de 80% da demanda energética mundial. Dentre os variados tipos de combustíveis fósseis, os derivados do petróleo são os mais significativos, representando 38% do consumo mundial de energia, seguido pelo carvão (26%) e pelo gás (23%) (SRIROTH *et al.*, 2010). O setor de transporte é responsável por 70% das emissões globais de monóxido de carbono (CO) e 19% das emissões globais de dióxido de carbono (CO₂), os quais contribuem para o efeito estufa. Estes fatores, juntamente a outros como o dramático aumento no preço do petróleo, a natureza finita das fontes fósseis, as preocupações crescentes sobre impacto ambiental e as questões relativas à saúde e à segurança, estão forçando a busca de novas fontes de energia e novas alternativas de transporte para o mundo moderno (BALAT, 2011).

Fontes renováveis de energia são inesgotáveis e possuem impacto menos adverso sobre o meio ambiente do que os combustíveis fósseis (KORONEOS *et al.*, 2003). Na verdade, alguns autores alertam que estas formas de energia representam a única garantia confiável para o atendimento da demanda energética do futuro (PASKA *et al.*, 2009). Dentre as diversas formas de energia renovável que se encontram na literatura, merecem menção a energia eólica, a energia solar, a energia das marés, a energia hidroelétrica, a energia geotérmica e a energia da biomassa (DUTRA; SZKLO, 2008; PATERNIANI; SILVA, 2005; ANGELIS-DIMAKIS *et al.*, 2011, KILICASLAN *et al.*, 1999).

Atualmente, as fontes de energia renovável fornecem em torno de 15 a 20 % da demanda mundial de energia, sendo a biomassa a principal delas. Uma série de estudos sobre este cenário têm demonstrado o potencial com que as energias renováveis poderão contribuir para o abastecimento energético global, indicando que, na segunda metade do século 21, estas corresponderão a mais de 50% da demanda, particularmente devido à implementação de novas políticas públicas em favor do meio ambiente (AKELLA *et al.*, 2009). No entanto, a utilização em grande escala dessas fontes de energia renovável ainda enfrenta problemas estruturais, como dificuldades logísticas e custos de produção.

A biomassa vegetal tem grande potencial como fonte de energia renovável, tanto pela sua ampla disponibilidade como pelos seus desempenhos ambiental, social

e econômico, podendo ser usada para vários propósitos industriais, como a produção de biocombustíveis e de insumos químicos e bioquímicos de alto valor agregado (LIU *et al.*, 2010).

1.2 Biomassa vegetal

Ao contrário das fontes fósseis de energia, como o petróleo e o carvão mineral, a produção de biomassa vegetal é considerada renovável por apresentar um ciclo anual, muito mais favorável para garantir o suprimento e a sustentabilidade de nossos processos industriais (PUBVET, 2008). Como exemplos de biomassas amplamente empregadas para fins energéticos figuram os materiais ditos lignocelulósicos, que possuem em sua composição cerca de dois terços a três quartos de carboidratos estruturais (celulose e hemiceluloses) que podem ser quebrados para liberar açúcares simples que, por sua vez, podem ser convertidos, biológica ou quimicamente, a uma vasta gama de produtos químicos, biomoléculas e biocombustíveis líquidos como o etanol (DEMARTINI; WYMAN, 2011). No entanto, algumas destas aplicações são limitadas pela associação que existe entre os três componentes estruturais da parede vegetal, a celulose, as hemiceluloses e a lignina (RAMOS, 2003). Diversos tipos de materiais lignocelulósicos podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis e insumos químicos, tais como madeiras moles (coníferas), madeiras duras (folhosas), resíduos florestais, resíduos agrícolas e lixo orgânico municipal (CARDONA *et al.*, 2010).

As matérias-primas de origem agrícola podem ser classificadas em três grandes categorias: sacarínicas, amiláceas e celulósicas. As sacarínicas, como a cana-de-açúcar, contêm açúcares simples que podem ser diretamente fermentados por bactérias ou leveduras para produzir etanol, dentre outros. As amiláceas, como o milho e a batata, oferecem o amido para processos de bioconversão e as celulósicas, representadas por materiais como cavacos de madeira, serragem, aparas, costaneiras, palhadas e bagaços, contêm celulose e hemiceluloses para este mesmo fim. No entanto, estes polissacarídeos devem ser primeiro convertidos a açúcares simples por meio de um pré-tratamento e/ou hidrólise para então serem fermentados adequadamente. Neste sentido, a hidrólise do amido é muito mais simples do que a

hidrólise da celulose, devido ao grau de associação molecular que existe ao nível da parede celular de plantas superiores (DEMIRBAS, 2011).

Como dito acima, materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos prontamente disponíveis para a bioconversão. Ao invés disso, eles contêm polissacarídeos que devem ser hidrolisados, por ácidos ou enzimas, a açúcares fermentescíveis (CARDONA *et al.*, 2010). Sendo assim, a utilização industrial de seus diferentes componentes requer uma separação seletiva. Isto implica na ruptura do complexo lignina-carboidratos e na remoção de cada uma destas frações por técnicas de pré-tratamento, extração aquosa e deslignificação (RAMOS, 2000).

1.3 Composição química da biomassa vegetal

Quantitativamente, a biomassa lignocelulósica contém cerca de 60 a 70% de carboidratos, compostos majoritariamente por celulose $(C_6H_{10}O_5)_n$ e hemiceluloses $(C_5H_8O_4)_m$, e até 20-30% de lignina $[C_9H_{10}O_3(OCH_3)_{0.9-1.7}]_x$ (BALAT *et al.*, 2008), que variam qualitativa e quantitativamente de acordo com a espécie (FERNANDES *et al.*, 2009), local, condições de cultivo, colheita, tempo de estocagem e até mesmo em função do tipo de tecido vegetal em questão (LIU *et al.*, 2010). A Tabela 1 mostra a diferença no percentual dos principais constituintes em diferentes tipos de materiais lignocelulósicos.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO LIGNOCELULÓSICA (%) EM DIFERENTES PLANTAS (AHMED *et al.*, 2001).

Planta	Celulose	Hemiceluloses	Lignina
Gramíneas	25-40	25-50	10-30
Coníferas	45-50	25-35	25-35
Folhosas	45-55	24-40	18-25

As propriedades estruturais da lignocelulose nativa podem ser justificadas pela associação íntima que existe entre esses três componentes macromoleculares da parede celular. Em suma, estruturas microfibrilares da celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemiceluloses e lignina cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação microbiana (RAMOS, 2000).

A Figura 1 mostra como acontece a formação das microfibrilas. Primeiramente, unidades de glucose se ligam através de ligações glicosídicas para dar origem a uma cadeia unitária de celulose (1), cujo grau de polimerização (GP) vai depender do tipo de planta, podendo variar de 2000 a 25000 unidades de glucose (FESTICCI-BUSELLI *et al.*, 2007). As cadeias de celulose se agrupam de forma ordenada através de ligações de hidrogênio, formando as fibrilas elementares ou cristalitos (2), contendo 36 cadeias de celulose. Por sua vez, quatro fibrilas elementares, com uma espessura média de 3,5 nm cada, associam-se umas as outras para formar cristais de celulose, cujas dimensões dependem da origem e do tratamento da amostra (FENGEL; WEGENER 1989 citado por RAMOS 2003), que darão origem à celulose cristalina (3). As fibrilas elementares são então conectadas por uma monocamada de hemiceluloses, gerando uma estrutura de 25 nm de largura que se encontram embebidas em uma matriz de hemiceluloses e protolignina (4). Desta maneira, o composto natural que resulta dessa estreita associação é a microfibrila de celulose (RAMOS, 2003; HIMMEL *et al.*, 2007).

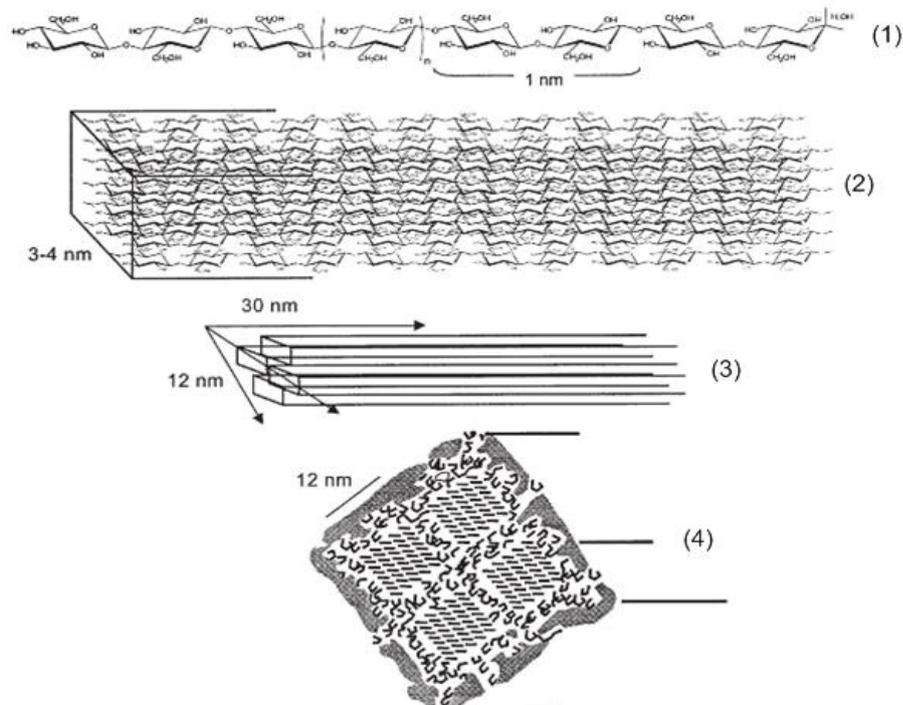


FIGURA 1. ASSOCIAÇÃO QUÍMICA NA PAREDE CELULAR DE VEGETAIS SUPERIORES (RAMOS, 2003).

1.3.1 Celulose

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza (MORAIS *et al.*, 2005), pois constitui entre 40-50% de quase todas as plantas (KLOCK *et al.*, 2006). Este polissacarídeo tem funções estruturais e é sintetizado por um complexo enzimático denominado celulose sintetase, que é considerado o principal dissipador do carbono atmosférico nas plantas (FESTICCI-BUSELLI *et al.*, 2007). Trata-se de um homopolissacarídeo linear formado por unidades de D-glucose (D-glucopirranose) ligadas umas às outras por ligações β -(1-4) glicosídicas (β -D-glucanas) (RAMOS, 2003) (Figura 2). A glucose é a unidade fundamental das cadeias, enquanto que a celobiose é definida como a sua unidade estrutural fundamental (FENGEL; WEGENER, 1989).

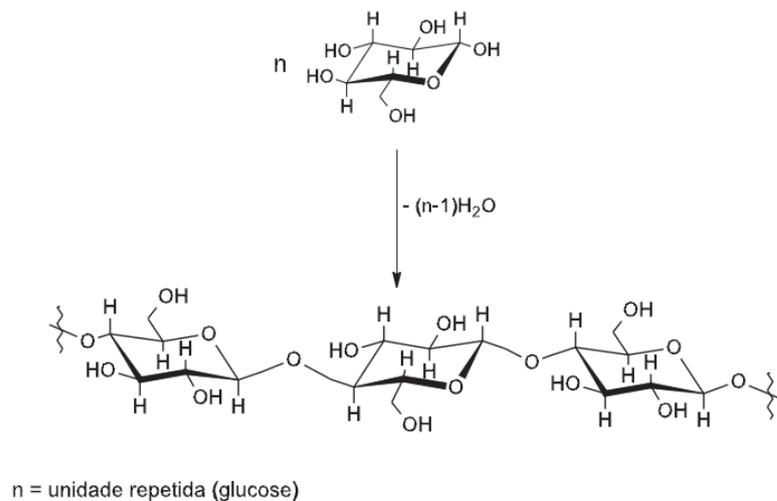


FIGURA 2. FORMAÇÃO DA CADEIA DE CELULOSE PELA UNIÃO DE UNIDADES β -D-GLUCOSE (MORAIS *et al.*, 2005)

A β -D-glucose é o isômero de conformação mais estável deste monossacarídeo, pois todas as hidroxilas se encontram em orientação equatorial. No entanto, a glucose pode ocorrer na forma α , gerando as ligações α -(1-4) glicosídicas da amilose. O esquema da Figura 3 mostra que o C-1 desta aldohexose, em cadeia aberta, pode reagir com o grupo hidroxila do C-5 formando um anel estável de seis membros (anel hemiacetal). Portanto, o fechamento do anel gera um centro quiral em C-1, de onde podem ser formados os anômeros α (conformação axial) ou β

(conformação equatorial) (Figura 4), dependendo da posição assumida pela hidroxila anomérica (SILVA FILHO, 2008). Estas formas podem se interconverter em solução aquosa pelo fenômeno da mutarrotação, que é típico de açúcares redutores, onde a abertura do anel de anômeros cíclicos promove a passagem de uma forma à outra através de uma fase intermediária acíclica. Após um período, o equilíbrio é estabelecido entre as duas formas, sendo que a α -D-glucopiranosose corresponde a 1/3 das formas anoméricas em solução, a forma β -D-glucopiranosose a 2/3 e uma pequena parcela ainda permanece na forma aberta, responsável pela interconversão (LEHNINGER *et al.*, 2008).

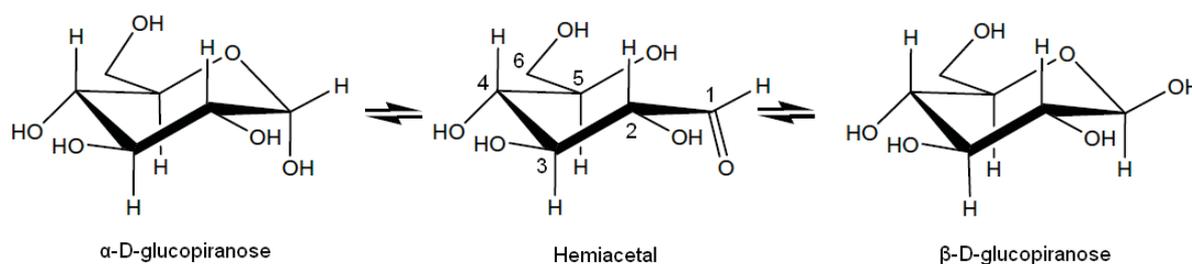


FIGURA 3. FORMAÇÃO DOS DOIS ANÔMEROS HEMIACETÁLICOS DA D-GLUCOSE – MUTARROTAÇÃO DA GLUCOSE (SILVA *et al.*, 2006).

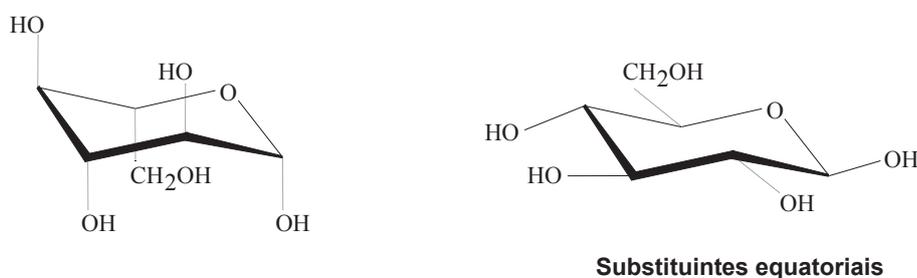


FIGURA 4. SUBSTITUINTES AXIAIS E EQUATORIAIS NA CONFORMAÇÃO EM CADEIRA DO ANEL HEMIACETÁLICO.

Nas cadeias de celulose nativa do algodão existem aproximadamente 15.000 unidades de anidrogucose, enquanto que, nas de celulose de madeiras, há cerca de 10.000 unidades. Cada unidade de anidrogucose possui massa de 162 g/mol. Portanto, ao dividir a massa molar da celulose por 162, obtém-se o seu grau de polimerização (GP) (MORAIS *et al.*, 2005).

A estrutura da celulose possui regiões cristalinas e amorfas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), como apresentado na Figura 5, sendo que as regiões amorfas são

mais suscetíveis à hidrólise devido a sua maior área superficial e facilidade de penetração das moléculas de água em seu interior (JARDINE *et al.*, 2009). As forças responsáveis por manter as regiões cristalinas são basicamente o resultado de uma extensa rede de ligações de hidrogênio intracadeia, intercadeia e interplanares (RAMOS, 2003) (Figura 6). Como consequência, a celulose possui alta resistência à tração e é insolúvel na maioria dos solventes (KLOCK *et al.*, 2006).

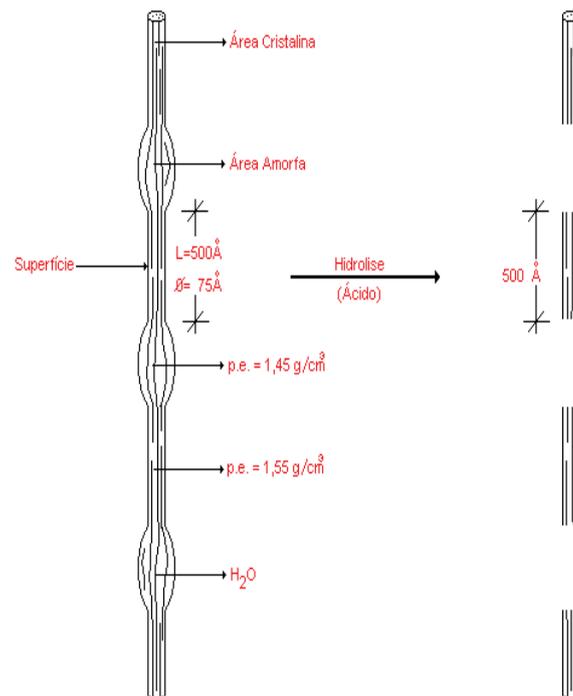


FIGURA 5. REGIÕES CRISTALINAS E AMORFAS NA ESTRUTURA DA CELULOSE (JARDINE *et al.*, 2009).

Atualmente, sabe-se que a celulose possui sete formas cristalinas, sendo elas $I\alpha$, $I\beta$, II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}. Cada uma destas formas apresenta características físicas e químicas próprias, como solubilidade, densidade, forma do cristal, além de propriedades ópticas e elétricas (OGEDA; PETRI, 2010). A celulose I ($I\alpha$ e $I\beta$) é o produto direto da biossíntese e por isso é denominada celulose nativa. Já as demais formas são de natureza sintética, onde, através de tratamentos térmicos ou alcalinos, as cadeias da celulose nativa se abrem e se recombinaem de forma aleatória, dando origem a uma nova forma alomórfica.

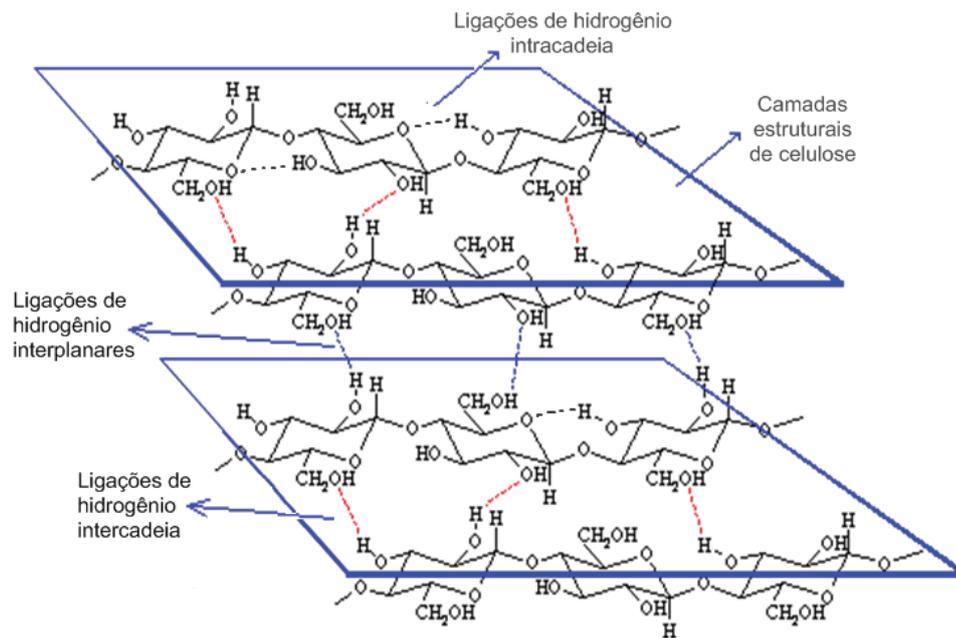


FIGURA 6. LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO RESPONSÁVEIS PELA ESTRUTURA CRISTALINA DA CELULOSE (MODIFICADO DE GARRETT; GRISHAM, 1999).

1.3.2 Hemiceluloses

Diferentemente da celulose, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por várias unidades constituintes (Figura 7), como pentoses, hexoses e ácidos urônicos (MORAIS *et al.*, 2005; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Sua estrutura não é cristalina e, portanto, pode ser facilmente hidrolisada por ataque ácido (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

As hemiceluloses são estruturalmente relacionadas à celulose e são depositadas na parede celular nos primeiros estágios da biossíntese, com sua composição variando de tecido para tecido e de espécie para espécie (RYDHOLM, 1965). Possuem massa molar inferior à celulose e servem como conexão entre esta e a lignina, dando mais rigidez à estrutura (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). As hemiceluloses também conectam os polímeros da parede celular através de ligações de hidrogênio e a variação da relação entre hemiceluloses e celulose pode mudar a força mecânica da parede celular de cada planta (WRIGHT, 2008).

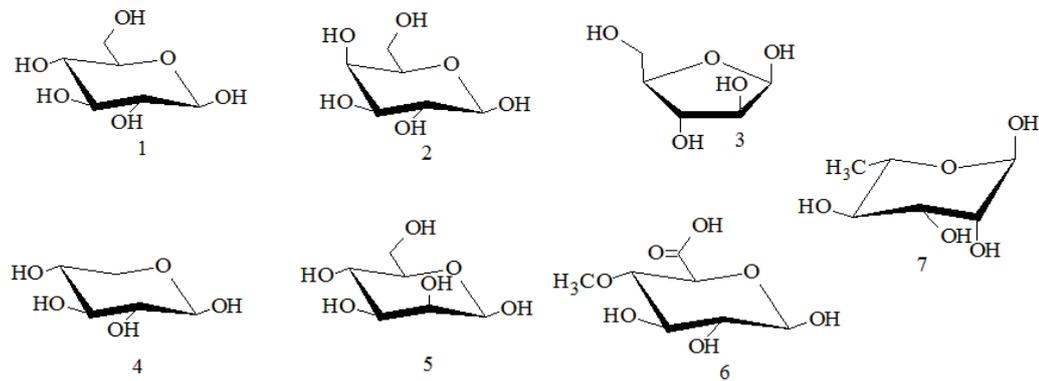


FIGURA 7. MONOSSACARÍDEOS CONSTITUINTES DAS HEMICELULOSES: (1) D-GLUCOSE, (2) D-GALACTOSE, (3) L-ARABINOSE, (4) D-XILOSE, (5) D-MANOSE, (6) 4-O-METIL-D-GLUCURÔNICO E (7) L-RHAMNOSE (SJÖSTRÖM; WESTERMARK, 1999).

A Figura 8 representa a estrutura típica de uma arabinoxilana, sendo a cadeia principal composta por unidades de xilose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4). Já as ramificações correspondem a unidades de arabinose ligadas à cadeia principal através de ligações glicosídicas α -(1-2) e α -(1-3).

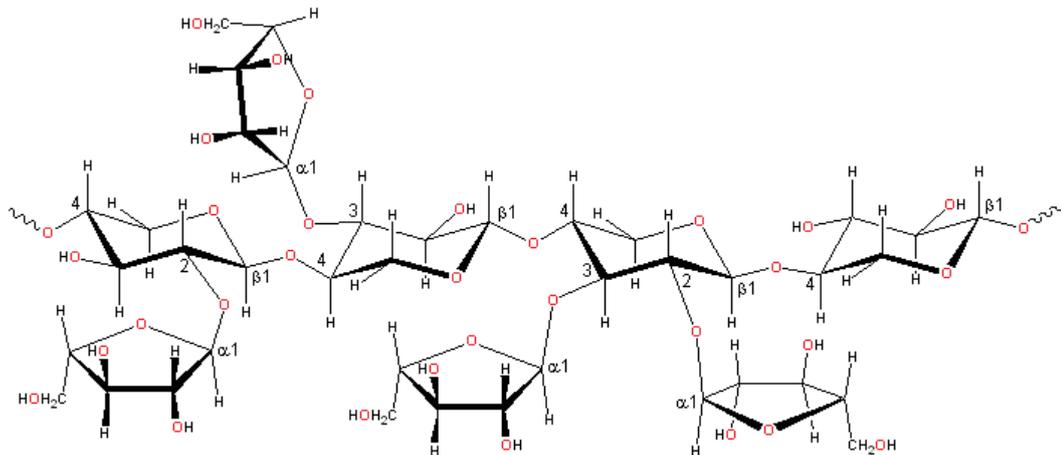


FIGURA 8. ESTRUTURA DE UMA ARABINOXILANA COM AS POSSÍVEIS LIGAÇÕES FORMADAS ENTRE A XILOSE E A ARABINOSE (CHAPLIN, 2011).

1.3.3 Lignina

A lignina ocorre na maioria das plantas, mas, ao contrário da celulose e das hemiceluloses, não é um polissacarídeo estrutural. Sua estrutura química é bastante complexa e não totalmente conhecida, principalmente pelas alterações que sofre durante o seu isolamento da parede celular (KLOCK *et al.*, 2006). A lignina pode ser definida como um material polifenólico, baseado em três precursores monoméricos, os alcoóis coniferílico, sinapílico e *p*-coumárico (Figura 9) (BURANOV; MAZZA, 2008), que darão origem às subunidades *p*-hidroxifenil-propanóides (H), guaiacílicas (G) e siringílicas (S), respectivamente, chamados de monolignóis (STUDART-GUIMARÃES *et al.*, 2003). O propósito da lignina é de dar suporte, impermeabilidade e resistência à parede celular contra ataques microbianos e estresse oxidativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Por outro lado, a lignina obtida por extração alcalina pode fornecer uma série de compostos fenólicos de interesse comercial, como o siringaldeído e o *p*-hidroxibenzaldeído, assim como a vanilina (essência de baunilha), que é produzida por oxidação de seus produtos de hidrólise (MATHIAS, 1993 citado por RAMOS, 2000).

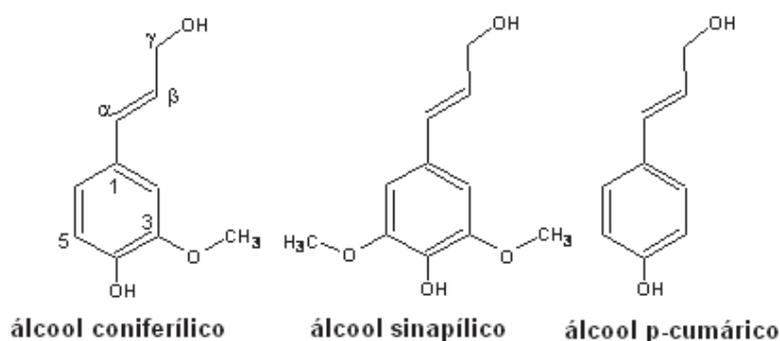


FIGURA 9. ESTRUTURA DOS ALCOÓIS PRECURSORES DA LIGNINA (SJÖSTRÖM, 1992).

As ligninas podem ser classificadas dependendo da relação que exista entre as subunidades H, G e S, que diferem no número de grupos metoxilas ligados ao anel aromático. Durante o processo de lignificação, estas unidades produzem um complexo tridimensional amorfo ao ligarem-se umas às outras por diversas ligações carbono-carbono, condensadas ou etéreas, como α -O-4, β -5, β -1, 5-5, 4-O-5, β - β , sendo que a ligação mais comum é a β -O-4 (BURANOV; MAZZA, 2008;

CHRISTIERNIN *et al.*, 2005). A Figura 10 traz algumas das ligações que podem ocorrer entre as unidades monolignóis que irão formar a lignina.

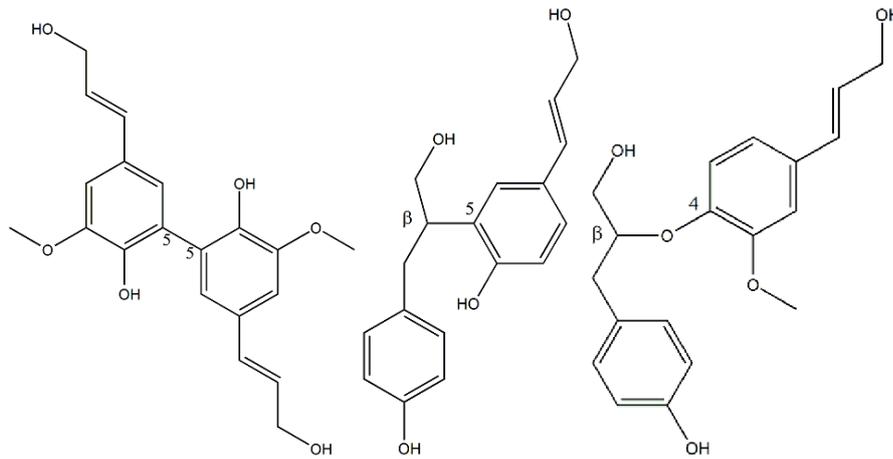


FIGURA 10. LIGAÇÕES EXISTENTES ENTRE AS UNIDADES MONOLIGNÓIS NA ESTRUTURA DA LIGNINA.

As ligninas de gramíneas vêm sendo classificadas como ligninas HGS, sendo diferentes das ligninas de coníferas (ligninas G) e de folhosas (ligninas GS). Além disso, ácidos fenólicos, principalmente os ácidos *p*-coumárico e ferúlico, vêm sendo investigados como elos de conexão covalente entre a lignina e os carboidratos (SUN *et al.*, 1997). Os diferentes tipos de lignina possuem propriedades físicas diferentes devido a sua composição química e até mesmo à maneira como se encontra interligada aos carboidratos. A predominância de estruturas do tipo guaiacila, formada pelo álcool coniferílico, torna a lignina mais ramificada e condensada, resultando em um aumento de seu grau de associação com polissacarídeos. Já a lignina do tipo siringila, formada pelo álcool sinapílico, torna a molécula de lignina mais linear e menos condensada, portanto, com menor grau de associação com os polissacarídeos (JUNG; DEETZ, 1993, citado por SANTANA; CAVALI, 2006). A lignina se associa com os carboidratos (em particular, com as hemiceluloses) via ligações covalentes no C- α das unidades fenil-propanóides, e essa associação é chamada de complexo lignina-carboidrato (Figura 11).

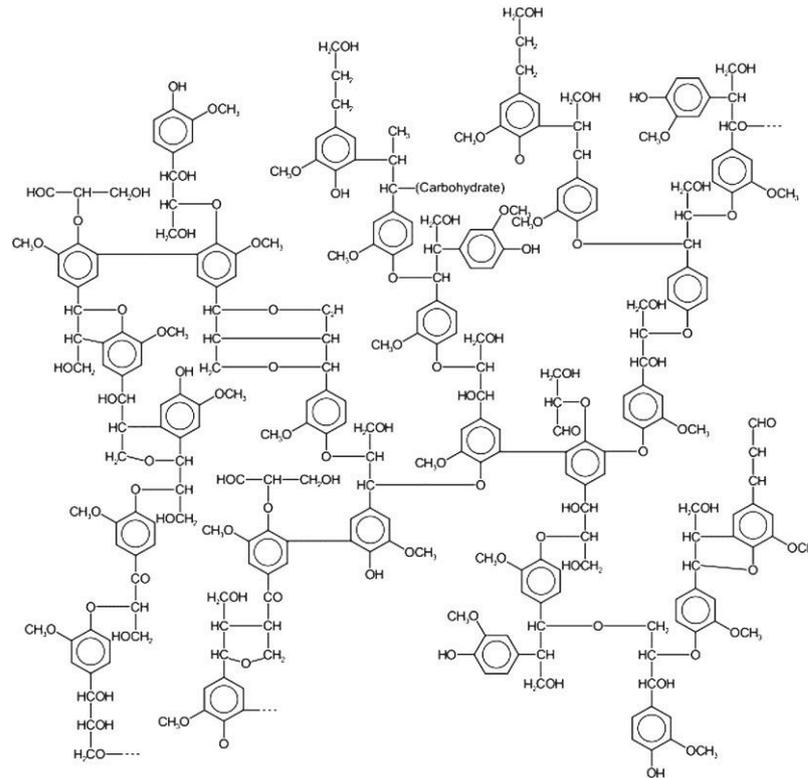


FIGURA 11. ESTRUTURA DO COMPLEXO LIGNINA-CARBOIDRATO E AS LIGAÇÕES EXISTENTES ENTRE AS UNIDADES MONOLIGNÓIS (SAKAGAMI *et al.*, 2010).

1.3.4 Componentes minoritários

Os componentes de menor massa molar presentes na biomassa incluem uma variedade de compostos, cuja presença relativa é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes, designados como extraíveis, não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extraíveis por serem solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor. A segunda classe engloba materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécticas. Os extraíveis são frequentemente responsáveis por determinadas características da planta, como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1988), e englobam os óleos essenciais, resinas, taninos, graxas e pigmentos (MORAIS *et al.*, 2005).

Além dos compostos de menor massa molar, as pectinas estão presentes na parede celular e nela exercem importante função estrutural, apesar de geralmente estarem presentes em pequena quantidade. Substâncias pécticas, ou pectinas, são basicamente um mistura de polissacarídeos cujo componente majoritário consiste de unidades de ácido α -D-galacturônico ligados por ligações glicosídicas do tipo α -(1-4). Nesta cadeia principal, unidades de L-rhamnose são ocasionalmente inseridas através de ligações glicosídicas do tipo β -(1-4) e β -(2-1) e parte dos grupos carboxílicos se encontram parcialmente esterificados pelo álcool metílico ou neutralizados com cátions mono e divalentes. Outros açúcares neutros como arabinose, fucose, galactose, glucose, manose e xilose, também podem ocorrer como cadeias laterais em substâncias pécticas (LEITÃO *et al.*, 1995).

1.4 Etanol

O etanol é o biocombustível mais amplamente usado para transporte em todo o mundo, seja puro ou em mistura com a gasolina. O uso de etanol como combustível foi difundido na Europa e nos Estados Unidos até o início de 1900. No entanto, especialmente depois da 2ª Guerra Mundial, seu custo de produção superou o da produção de combustíveis derivados do petróleo e o seu potencial passou a ser ignorado até a crise do petróleo em 1970 (DEMIRBAS *et al.*, 2009). Em 1975, movido pela necessidade de reagir a esta crise mundial, o Brasil lançou o ProÁlcool - Programa Nacional do Álcool, que tinha como objetivo substituir os derivados do petróleo pelo etanol de cana-de-açúcar (CASTRO *et al.*, 2010), e em 1984, o etanol começou a ser usado na Alemanha e na França pela então ainda incipiente indústria de motores de combustão interna (BALAT, 2011).

Atualmente, o etanol conta com aproximadamente 94% da produção global de biocombustíveis, sendo produzido majoritariamente a partir da cana-de-açúcar e do amido de milho. O Brasil e os EUA são os líderes mundiais em produção de etanol; juntos, totalizam 78% de todo o etanol produzido no mundo. Portanto, o etanol já é um biocombustível bem estabelecido e vem sendo amplamente utilizado no setor de transporte e no setor industrial em vários países. O Brasil vem utilizando o etanol como combustível desde 1925 e, atualmente, a gasolina vendida no país contém 25% de

etanol. Já os EUA vêm utilizando etanol produzido do milho desde 1980 e sua meta atual é de adicionar 10% de etanol à gasolina (DEMIRBAS, 2011).

O etanol é um biocombustível oxigenado (35% de oxigênio) cuja produção pode ser estritamente baseada em recursos renováveis, oferecendo, assim, uma alternativa com emissões de gases do efeito estufa praticamente nula, pois o dióxido de carbono liberado na atmosfera é reabsorvido durante o cultivo da cana-de-açúcar (JOYCE *et al.*, 2006). Neste sentido, expandir a produção de etanol para o aproveitamento de resíduos agroindustriais, como as palhas de milho, de trigo e de cana-de-açúcar, representa uma das mais importantes alternativas tecnológicas para a consolidação de um modelo sustentável que esteja voltado à produção de biocombustíveis para os setores automotivos e de transporte, já que pode haver limites para a expansão da monocultura (SUKUMARAM *et al.*, 2009).

O etanol pode ser obtido a partir de diferentes tipos de biomassas e por diferentes tecnologias de conversão, sendo que estas podem ser de primeira ou de segunda geração. Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação da sacarose, presente, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar, as tecnologias de segunda geração utilizam resíduos agrícolas e agroindustriais para este mesmo fim (RAMOS, 2003; PITARELO, 2007). Neste caso, o processo fermentativo é baseado nos carboidratos liberados da biomassa vegetal por hidrólise da celulose e das hemiceluloses, fato que oferece barreiras tecnológicas que ainda vêm sendo estudadas por vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Além disto, tecnologias altamente promissoras estão emergindo do uso de processos fermentativos avançados e do emprego de algas, que possuem carboidratos que podem ser convertidos a etanol. Estas tecnologias são conhecidas como de terceira geração e ainda estão em estágio inicial de pesquisa e desenvolvimento (HARUN; DANQUAH, 2011, SINGH *et al.*, 2011, JOHN *et al.*, 2011)

Tais evoluções nas tecnologias de processamento do etanol são fundamentais principalmente para a economia de países desenvolvidos, onde as matérias-primas hoje utilizadas competem com a produção de alimentos e os custos de produção ainda são altos em comparação com o petróleo ou com o etanol derivado da sacarose da cana. Sua importância decorre, também, do fato de o etanol celulósico ter potencial para extrair pelo menos duas vezes mais combustível da mesma área cultivável (BASTOS, 2007). Segundo o Portal da Unica (2010), o Brasil produz em média sete mil litros de etanol por hectare de cana. Com uma tecnologia consolidada,

usando o bagaço e a cana, a produtividade por hectare poderá crescer para até quatorze mil litros por hectare.

A Figura 12 revela as principais fontes de produção de etanol e os subprodutos que podem ser obtidos durante o processo. Neste cenário, espera-se que a demanda por etanol aumente mais que o dobro nos próximos 10 anos e, para que seja possível atender a essa demanda, novas tecnologias deverão evoluir dos laboratórios para a realidade comercial. A produção de etanol a partir do amido ou da sacarose vem sendo culpada pela alta do preço de vários produtos do setor alimentício (DEMARTINI; WYMAN, 2011). Em contraste com este paradigma, a utilização de materiais lignocelulósicos não compromete o fornecimento de produtos ao setor alimentício, evitando o debate de alimentos *versus* combustíveis (DOHERTY *et al.*, 2010), além de serem substratos altamente atraentes devido ao seu baixo custo e grande disponibilidade (PICCOLO; BEZZO, 2009).

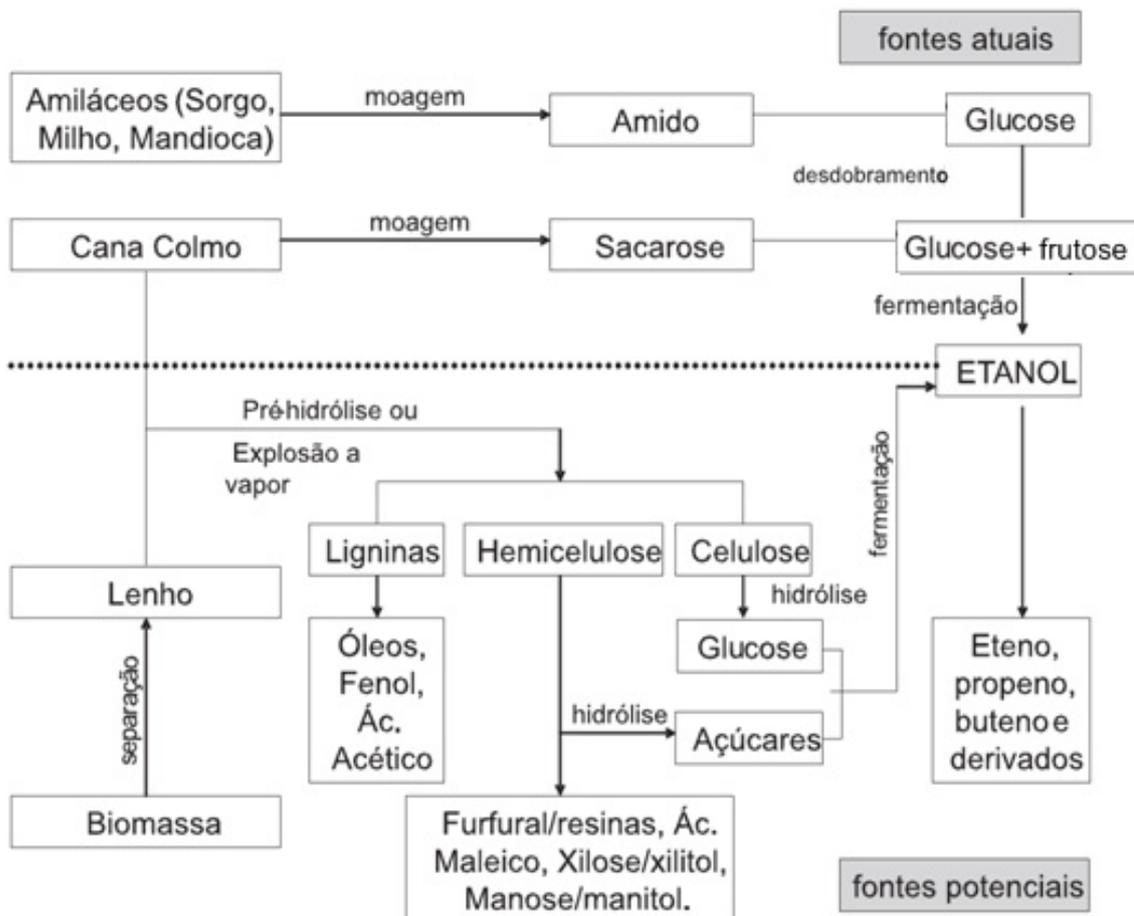


FIGURA 12. FONTES DE ETANOL E SUBPRODUTOS GERADOS (BASTOS 2007).

A produção de etanol celulósico também pode fornecer uma variedade de outros compostos derivados da lignina e das hemiceluloses, como compostos fenólicos e polióis como o xilitol, respectivamente. Por outro lado, a lignina, devido seu alto poder calorífico, também pode ser utilizada na co-geração de energia, garantindo a sustentabilidade do processo.

O processo de produção de etanol celulósico inclui as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação de pentoses e hexoses, separação da lignina residual e recuperação e concentração do etanol. Desta forma, o etanol celulósico é mais caro do que aquele produzido a partir de amido, revelando a necessidade de reduzir o seu custo de produção. Os requisitos para a redução destes custos incluem um pré-tratamento efetivo para reduzir o uso de celulasas, a otimização da hidrólise das hemiceluloses e da celulose a açúcares fermentescíveis, o uso de ambas as frações (pentoses e hexoses) para fermentação e a integração dos processos para a redução de custos de capital e de energia (DEMARTINI; WYMAN, 2011).

A Figura 13 mostra algumas das possíveis integrações que vêm sendo estudadas atualmente. O processo de sacarificação e fermentação simultânea (SSF) reduz o tempo de processamento, pois a glucose liberada por hidrólise é rapidamente convertida a etanol pelos micro-organismos da fermentação, reduzindo a inibição das celulasas pelo acúmulo dos produtos de hidrólise da celulose (WATANABE *et al.*, 2010). Esse processo resulta em um maior rendimento de etanol quando comparado a processos separados de sacarificação e fermentação. No entanto, a desvantagem deste processo é a diferença da temperatura ótima das enzimas de hidrólise e dos micro-organismos de fermentação (BINOD *et al.*, 2010). Já a co-fermentação (CF) de hidrolisados lignocelulósicos consiste na utilização de uma mistura de dois ou mais micro-organismos que fermentam tanto as hexoses como as pentoses presentes no meio (CARDONA *et al.*, 2010). Por sua vez, o processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) representa a integração dos processos de SSF e de CF. No entanto, barreiras tecnológicas ainda precisam ser superadas para que esses processos sejam eficientes, como a obtenção de micro-organismos que fermentem efetivamente as hexoses e as pentoses ao mesmo tempo.

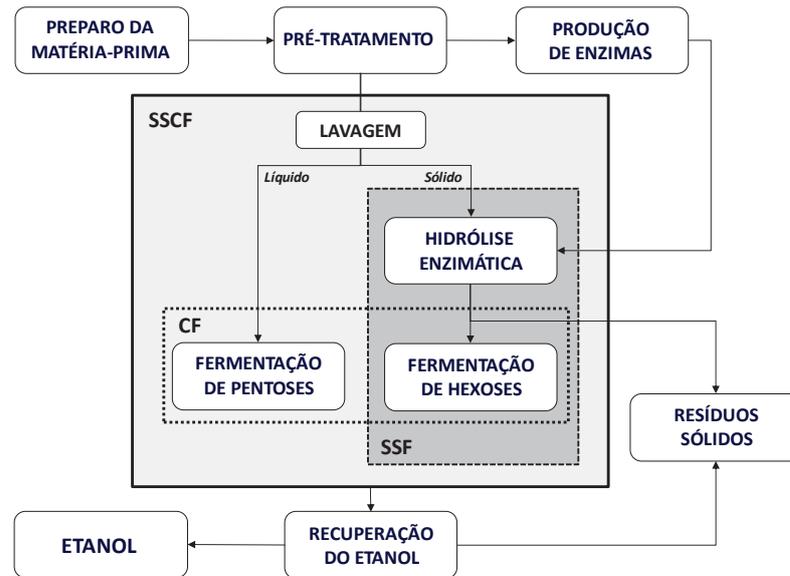


FIGURA 13. DIAGRAMA GLOBAL DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS E SUAS POSSÍVEIS FORMAS DE INTEGRAÇÃO (PITARELO *et al.*, 2010)

A colheita de cana-de-açúcar e o seu processamento geram resíduos, chamados palha e bagaço, que correspondem aos recursos renováveis mais amplamente disponíveis em várias regiões do mundo (JOYCE *et al.*, 2006). No Brasil, foram produzidos cerca de 514 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2007 (AGÊNCIA DE INFORMAÇÕES EMBRAPA, 2007). Como cada tonelada de cana possui 14% de palha e 12,5% de bagaço (base seca), estima-se que a produção destes resíduos tenha atingido 72 e 64 milhões de toneladas, respectivamente, neste mesmo período (MORIYA *et al.*, 2006). Atualmente, o bagaço é usado para a produção de vapor e bioeletricidade em processos de co-geração (CARRASCO *et al.*, 2010) para garantir a sustentabilidade energética do processo, sendo que a quantidade de bagaço usado para esta finalidade depende da capacidade de processamento da usina. Já a palha é tradicionalmente queimada na época da safra para facilitar o corte manual e aumentar a segurança dos trabalhadores, pois além de eliminar do local as folhas e o palhiço, espanta animais peçonhentos como cobras e escorpiões, muito comuns no meio das plantações (MAGALHÃES *et al.*, 2007). No entanto, a fuligem gerada durante a queima da palha da cana-de-açúcar carrega cerca de setenta produtos químicos em sua composição, que contribuem para o efeito estufa e causam sérios problemas respiratórios para a população (FAPESP, 2008). Para contornar esse problema, o Decreto Estadual do Estado de São Paulo 41.719, de 16

de abril de 1997, determinou a redução gradativa do uso desta prática, estabelecendo a sua extinção em oito anos nas áreas definidas como mecanizáveis e em quinze anos nas áreas definidas como não mecanizáveis (MENEGUELLO, 2006). Devido a isto, a tendência é que a palha permaneça no campo como adubo orgânico. Dessa forma, o futuro aumento da disponibilidade da palha de cana-de-açúcar tem impulsionado vários grupos de pesquisa a desenvolver tecnologias que visem o seu aproveitamento (KRISHNA *et al.*, 1998; SAAD; GONÇALVES, 2005).

Palha de cana-de-açúcar é a denominação para as partes não relativas ao colmo da cana, ou seja, folhas verdes e parcialmente secas, ponteiros da cana (entrenós imaturos do topo) e folhas novas ao redor do meristema apical (CTC, 2010). Uma opção para o uso deste resíduo é a sua hidrólise a açúcares fermentescíveis. Porém, como dito anteriormente, este processo é tecnicamente difícil porque a estrutura da parede celular dificulta a acessibilidade das enzimas ou de catalisadores ácidos aos seus carboidratos constituintes (LI *et al.*, 2009). Uma medida para aumentar o rendimento do processo de hidrólise é a realização de um pré-tratamento para quebrar essa associação e separar os diferentes componentes presentes na biomassa (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Em alguns casos, antes do pré-tratamento que irá modificar quimicamente a estrutura lignocelulósica, é necessário realizar a redução do tamanho das partículas, utilizando, por exemplo, um processo mecânico como a moagem para aumentar a superfície de contato. Em suma, os processos de pré-tratamento preparam a biomassa para a etapa de hidrólise enzimática, através da hidrólise das hemiceluloses e/ou da remoção da lignina, tornando a celulose mais acessível à sacarificação (CARRASCO *et al.*, 2010).

1.5 Pré-tratamento

O pré-tratamento é um dos mais importantes componentes da tecnologia de produção do bioetanol celulósico, pois define a extensão e a eficiência com que os carboidratos poderão ser convertidos a este biocombustível (BALAT *et al.*, 2008).

A realização do pré-tratamento está especialmente orientada a melhorar a acessibilidade da celulose à hidrólise (CARA *et al.*, 2007). Portanto, para ser reconhecido como um passo fundamental para o processo de bioconversão, o pré-tratamento deve produzir fibras acessíveis (LASER *et al.*, 2002) de forma a facultar a

produção de açúcares fermentescíveis em alto rendimento e apresentar um bom custo-benefício (RUIZ *et al.*, 2008). Para ser econômico, o processo deve minimizar a demanda de energia e limitar os custos associados com a redução do tamanho do resíduo. O pré-tratamento deve ainda evitar a degradação da celulose e das hemiceluloses, pois estas reações, além de diminuir o rendimento final em etanol, também resultam em produtos que são inibidores das leveduras utilizadas na fermentação (ÖHGREN *et al.*, 2007; RUIZ *et al.*, 2008). Desenvolver um pré-tratamento que atenda a estas exigências é o desafio das atuais indústrias de transformação de biomassa.

Os pré-tratamentos podem ser químicos, físicos ou biológicos, ou ainda estarem baseados na combinação destes. Métodos químicos tendem a solubilizar hemiceluloses e lignina, a fim de expor o componente celulósico à hidrólise ácida e/ou enzimática (RAMOS, 2003). Métodos físicos, que usualmente demandam uma grande quantidade de energia, empregam meios puramente mecânicos para reduzir o tamanho das partículas da biomassa, aumentando assim a sua área superficial de contato (LASER *et al.*, 2002). Finalmente, métodos biológicos resultam na deslignificação parcial da lignocelulose, empregando micro-organismos (fungos e bactérias) decompositores da lignina (RAMOS, 2003).

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos na literatura, desde a simples moagem mecânica (para reduzir o tamanho das partículas e a cristalinidade) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009) até processos tecnologicamente mais complexos, como a hidrólise ácida (para solubilizar as hemiceluloses e tornar a celulose mais acessível à hidrólise) (MOSIER *et al.*, 2005; BALAT *et al.*, 2008), a oxidação (para remover as hemiceluloses e lignina através da adição de peróxido de hidrogênio alcalino ou ácido peracético) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), a extração alcalina (para remover as hemiceluloses e a lignina de maior acessibilidade química) (BALAT *et al.*, 2008), a explosão a vapor (RAMOS, 2003), o tratamento com amônia líquida a altas temperaturas (MOSIER *et al.*, 2005), o uso de líquidos iônicos (DOHERTY *et al.*, 2010), dentre outros.

A Tabela 2 mostra os tipos de pré-tratamentos que vêm sendo utilizados para pré-tratar diferentes tipos de biomassa vegetal. De acordo com esta tabela, o ácido sulfúrico é o ácido mais utilizado, seja como pré-tratamento químico ou como catalisador em técnicas combinadas. Pré-tratamentos combinados também são os que produzem os melhores resultados, com destaque para os físico-químicos, por

geralmente exigirem condições mais brandas. Pré-tratamentos robustos também vêm sendo propostos através da combinação dos três tipos de pré-tratamento - biológico, físico e químico – como, por exemplo, na biodegradação com fungos seguida de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído (MA *et al.*, 2010).

TABELA 2. EXEMPLOS DE PRÉ-TRATAMENTOS ATUALMENTE UTILIZADOS PARA DIFERENTES TIPOS DE BIOMASSA VEGETAL.

Tipo	Pré-tratamento	Biomassa	Referência	
Biológico	Fungo	Palha de cana Bagaço de cana Palha de milho	Saad <i>et al.</i> (2008) Camassola e Dillon (2009) Zhong <i>et al.</i> (2011)	
	Físico	Irradiação	Palha de arroz Bagaço e palha de cana	Baket <i>et al.</i> (2009) Silva <i>et al.</i> (2009)
		Moagem	Bagaço de cana	Buaban <i>et al.</i> (2010)
Químico	H ₂ SO ₄ diluído	Palha de colza	Castro <i>et al.</i> (2011)	
	Amônia aquosa	Palha de milho	Li <i>et al.</i> (2010)	
Biológico e químico	Fungo e sal inorgânico	Palha de trigo	Zeng <i>et al.</i> (2011)	
Físico e químico	H ₂ SO ₄ diluído e alta temperatura	Capim-bermuda Resíduos de mandioca	Redding <i>et al.</i> (2011) Zhang <i>et al.</i> (2011)	
	H ₂ SO ₄ diluído e explosão a vapor	Palha de arroz	Chen <i>et al.</i> (2011)	
	H ₂ SO ₄ diluído e alta pressão	Bagaço de cana	Rocha <i>et al.</i> (2011)	
	CO ₂ supercrítico e temperatura	Palha de arroz	Gao <i>et al.</i> (2010)	
	CO ₂ e vapor	Bagaço de cana	Carrasco <i>et al.</i> (2010)	
	Líquidos iônicos e temperatura	Switchgrass	Samayam e Schall (2010)	
	Polpação alcalina e explosão a vapor	Palha de arroz	Ibrahim <i>et al.</i> (2011)	
	Congelamento com solução tampão acetato	Palha de arroz	Cheng <i>et al.</i> (2011)	
	Explosão com amônia	Palha de milho	Chundawat <i>et al.</i> (2010)	
	Moagem e peróxido de hidrogênio	Bagaço de cana	Monte <i>et al.</i> (2011)	
Biológico, físico e químico	Fungo, H ₂ SO ₄ diluído e temperatura	Aguapé	Ma <i>et al.</i> (2010)	
	Ultrassom, H ₂ O ₂ e fungo	Casca de arroz	Yu <i>et al.</i> (2009)	

Entre os diferentes tipos de pré-tratamento já existentes, a explosão a vapor é um dos mais comumente usados para fracionar os componentes da biomassa (RUIZ *et al.*, 2008). Neste processo, a biomassa é tratada a altas pressões e altas

temperaturas por alguns minutos para, então, sofrer uma descompressão imediata denominada explosão (SUN; CHENG, 2002; RAMOS, 2003).

A explosão a vapor resulta em uma quebra substancial da estrutura lignocelulósica, fundamentada na hidrólise da fração hemicelulósica, na despolimerização dos componentes da lignina e na desagregação da fibra celulósica, promovendo, com isto, o aumento da acessibilidade química dos materiais pré-tratados (RUIZ *et al.*, 2008). A explosão a vapor não gera apenas monossacarídeos, mas também oligômeros de alta e baixa massa molar, além de outros subprodutos como hidroximetilfurfural, furfural, ácido levulínico, entre outros, conforme representado na Figura 14.

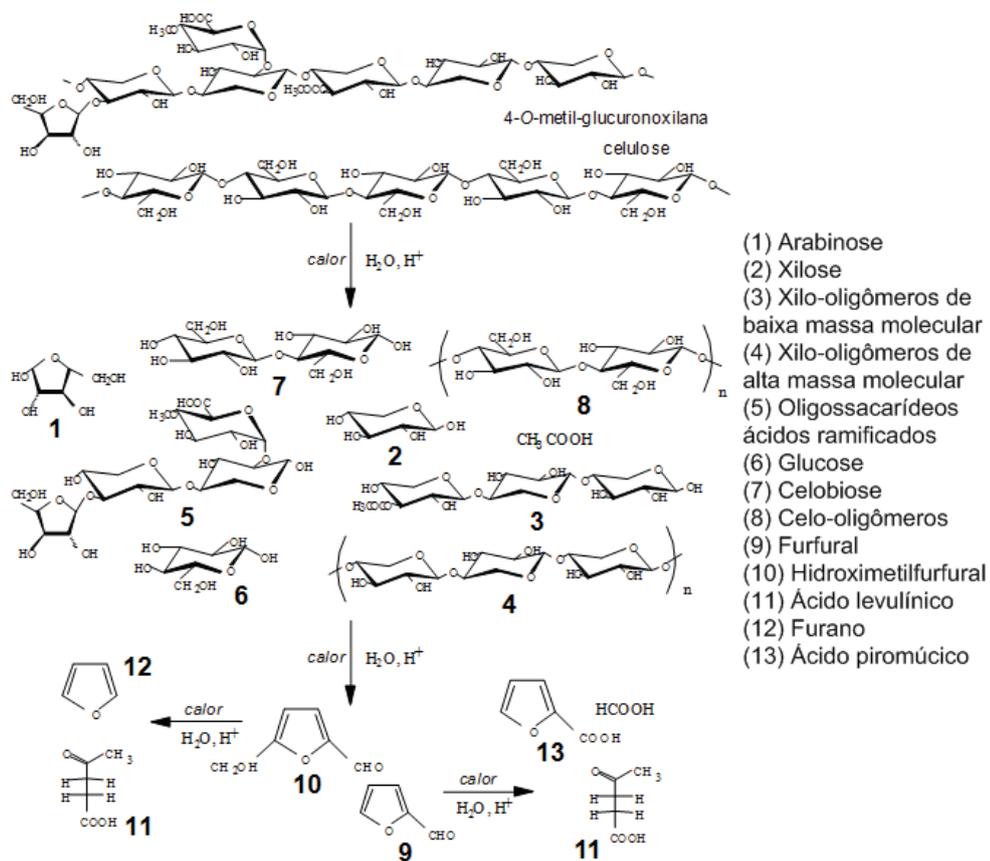


FIGURA 14. FRAGMENTAÇÃO DA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (RAMOS, 2003)

Em relação à lignina, a degradação de parte de sua estrutura libera compostos fenólicos na fração solúvel e sua quantificação é uma evidência direta da severidade do pré-tratamento. Esta degradação é decorrente de três possíveis reações que podem ocorrer na estrutura da lignina, sendo elas: hidrólise ácida (inclusive a

desmetoxilação), a clivagem homolítica e a condensação dos compostos gerados. As reações de hidrólise da lignina ocorrem basicamente quebrando as ligações aril éter α -O-4 e β -O-4 existentes em sua estrutura. A quebra destas ligações promove a liberação de oligômeros de baixa massa molar e de compostos fenólicos, que são altamente reativos devido à presença de hidroxilas alifáticas e aromáticas. Além da hidrólise, a clivagem homolítica das ligações aril éter também liberam compostos fenólicos. Estes compostos, devido sua reatividade, podem sofrer reações de condensação, formando oligômeros ou condensando de volta na estrutura da lignina através de ligações carbono-carbono. O resultado destas reações é a formação de uma lignina mais recalcitrante e menos reativa que a lignina de origem.

A Figura 15 indica os carbonos α e β na estrutura da lignina e exemplos das reações que envolvem a lignina e os possíveis compostos formados, onde hidroxilas fenólicas são geradas pela hidrólise ácida (A) de subestruturas β -O-4 a partir das quais, por um processo de rearranjo (B), são formadas estruturas quinônicas, cujos carbono α é bastante elétron deficiente. Em seguida, ocorre uma cisão homolítica ao nível do carbono β da estrutura, gerando dois radicais que se submetem a um desproporcionamento e subsequente acoplamento (condensação) entre os diferentes tipos de radicais formados na reação.

Diversos catalisadores são utilizados na explosão a vapor, como SO_2 (CARRASCO *et al.*, 2010), CO_2 (SUN; CHENG, 2002, SHEVCHENKO *et al.*, 2000), H_2SO_4 , catalisador mais comumente utilizado no processo, (CHEN *et al.*, 2011, EMMEL *et al.*, 2003, CARA *et al.*, 2008) e mais recentemente H_3PO_4 (PITARELO *et al.*, 2010). O uso de catalisadores pode melhorar a eficiência da hidrólise enzimática, diminuir a produção de compostos inibidores e levar a uma remoção mais completa das hemiceluloses. Pode-se também utilizar amônia em um processo conhecido como “ammonia fiber explosion – AFEX”. No entanto, este método apresentou-se eficiente apenas para materiais lignocelulósicos com baixo teor de lignina (BALAT *et al.*, 2008).

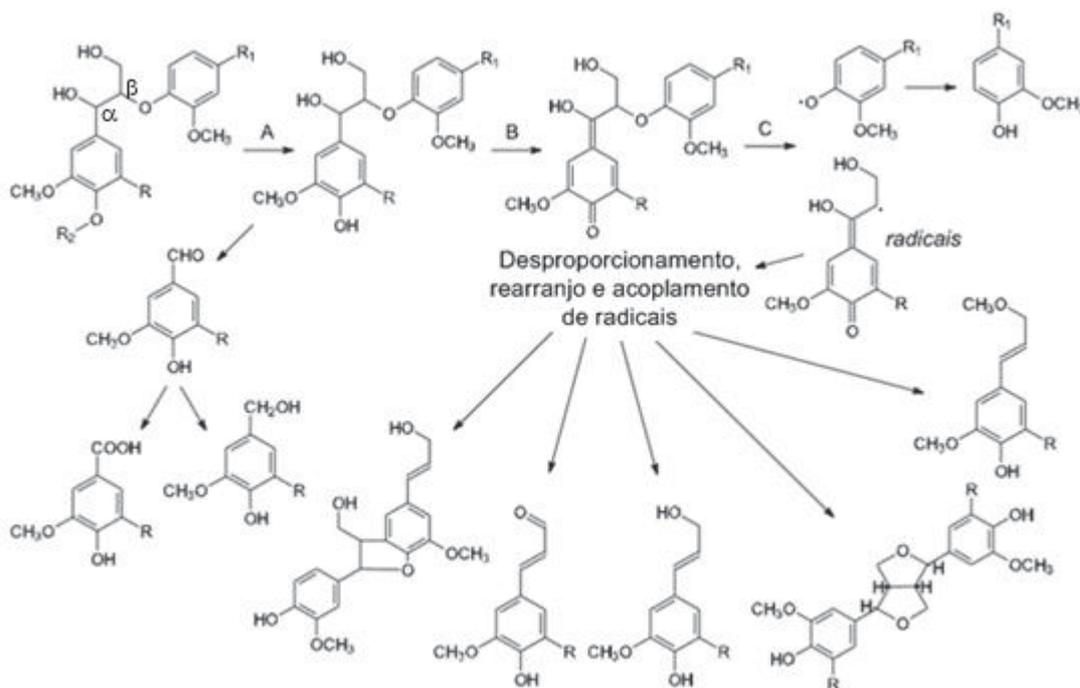


FIGURA 15. PADRÃO DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA COMO RESULTADO DA EXPLOSÃO A VAPOR (ADAPTADO DE TANAHASHI 1990 citado por RAMOS 2003).

1.6 Hidrólise enzimática

Os primeiros passos para a bioconversão da lignocelulose a etanol envolvem o aumento da área superficial, a remoção da lignina e das hemiceluloses, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade dos materiais (SUN; CHENG, 2002). Tais medidas melhoram a taxa de hidrólise enzimática e aumentam o rendimento em açúcares fermentescíveis a partir da celulose e das hemiceluloses (MOSIER *et al.*, 2005; BALAT *et al.*, 2008).

A hidrólise enzimática apresenta grandes vantagens quando comparada com hidrólise ácida (LIAO *et al.*, 2006; DEMIRBAS, 2007; ZHU *et al.*, 2008). Em geral, a hidrólise enzimática é mais eficiente porque fornece maiores rendimentos em glucose sem a formação de produtos de degradação (CARA *et al.*, 2007), não apresenta problemas de corrosão (SUN; CHENG, 2002) e pode ocorrer sob condições normais, sem a geração de resíduos tóxicos (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

Na hidrólise enzimática, diferentes tipos de celulasas fúngicas e bacterianas podem ser utilizadas. Como resultado, a celulose é hidrolisada a açúcares que podem ser fermentados a etanol por leveduras ou bactérias (SUN; CHENG, 2002).

Geralmente, essa degradação é caracterizada por uma fase inicial rápida, seguida por uma segunda fase lenta que prossegue até que todo o substrato seja consumido (BALAT *et al.*, 2008).

As celulases fúngicas atuam de forma sinérgica através de três atividades específicas: as endoglucanases (EG), as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) e as β -glucosidases (BGL) (LIMA; RODRIGUES, 2007). As endoglucanases desempenham um importante papel na hidrólise da celulose por clivarem as cadeias aleatoriamente, gerando em um rápido decréscimo do seu grau de polimerização. Elas hidrolisam ligações intramoleculares β -(1-4)-glucosídicas das cadeias da celulose para produzir novos terminais redutores e não redutores. As celobiohidrolases agem nestes mesmos terminais das cadeias de celulose para liberar celobiose e as β -glucosidases completam o processo catalisando a hidrólise da celobiose a glucose, a fim de eliminar o efeito inibidor da celobiase sobre as outras enzimas do complexo (RAMOS *et al.*, 1993).

A concentração do substrato é um dos principais fatores que afetam o rendimento e a velocidade inicial da hidrólise, mesmo quando a relação entre a concentração de substrato e a carga enzimática empregada no processo é mantida constante (RAMOS, 2003). Segundo alguns autores, a alta concentração de substrato no meio de reação dificulta os fenômenos de transferência de massa, como também aumenta a concentração dos produtos de hidrólise no meio (celobiose e glucose), interferindo diretamente na eficiência do processo de sacarificação por aumentar a inibição retroativa das enzimas. Uma maneira de melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise é a de aumentar a dosagem de celulases por grama de substrato, porém, esta estratégia tem efeito relativamente restrito e pode aumentar consideravelmente o custo do processo (SUN; CHENG, 2002).

A hidrólise enzimática ocorre em três etapas: primeiramente, as enzimas adsorvem sobre a superfície da celulose, depois promovem a hidrólise da ligação glicosídica e, por fim, desorvem da superfície retornando à solução. Este processo pode eventualmente levar a uma desativação parcial das enzimas, causada principalmente pela adsorção irreversível sobre regiões hidrofóbicas do complexo lignina-carboidrato. Uma maneira de minimizar este efeito é a deslignificação do material antes da hidrólise enzimática, sendo que a forma mais clássica é a extração alcalina (HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009), podendo ser suplementada, por exemplo, com peróxido de hidrogênio para aumentar o rendimento da extração (CARA *et al.*,

2006). No entanto, existem problemas adicionais a este processo, como o custo e a geração de passivos ambientais, principalmente pelo consumo de água e produção de efluentes que necessitam de tratamento.

As celulases podem ser parcialmente recicladas após a hidrólise, mas a eficiência com que isto pode ser realizado depende muito das propriedades e composição química do substrato (SUN; CHENG, 2002). Segundo CARA *et al.* (2007), a presença de lignina residual (não totalmente removida após o pré-tratamento) no substrato representa uma limitação importante para a reciclagem e pode inclusive limitar a eficiência do processo de hidrólise, dependendo da sua natureza química e da extensão da modificação estrutural sofrida durante o pré-tratamento.

2. Objetivos

Desenvolver e aprimorar técnicas adequadas à caracterização, pré-tratamento e hidrólise enzimática de substratos celulósicos derivados da palha de cana-de-açúcar, de modo a facultar o aproveitamento integral desta biomassa residual por processos químicos e biotecnológicos. Tal objetivo será alcançado através dos seguintes objetivos específicos:

- Caracterizar a composição química dos componentes presentes na palha de cana-de-açúcar;
- Otimizar a produção de substratos celulósicos a partir da palha de cana, utilizando a técnica de explosão a vapor com e sem a adição de H_3PO_4 como catalisador;
- Caracterizar quimicamente e determinar o rendimento das diferentes frações obtidas durante o processo;
- Caracterizar a susceptibilidade dos materiais pré-tratados à hidrólise por complexos celulásicos comerciais;
- Identificar e selecionar as condições de pré-tratamento que proporcionaram os melhores rendimentos no processo de hidrólise enzimática;
- Caracterizar o substrato obtido sob condições ideais a fim de investigar as modificações químicas causadas pelo pré-tratamento na estrutura lignocelulósica e que proporcionaram aumento na acessibilidade química da celulose.

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

A palha de cana-de-açúcar foi obtida junto à Usina São Martinho (Iracemápolis, SP) com auxílio do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP), sendo que esta apresentava umidade de aproximadamente 30 % em relação ao seu peso úmido. Para evitar a proliferação de fungos iminentes à umidade do material, a palha foi seca em estufa a 50 °C até atingir a umidade de 10 %, para depois ser acondicionada em sacos plásticos e armazenada em local seco na temperatura ambiente. O ácido fosfórico utilizado na impregnação ácida da palha antes do pré-tratamento foi adquirido junto à Quimex Produtos Químicos (São Paulo, SP) com pureza de 85 %. Já a enzima Cellic CTec 2 utilizada na hidrólise enzimática foi da empresa Novozymes Latin America Ltda. Os demais reagentes, solventes, gases e padrões analíticos foram adquiridos de acordo com as exigências de cada técnica da análise.

3.2 Determinação do teor de cinzas

O teor de cinzas da palha de cana-de-açúcar, nativa e pré-tratada, foi determinado em cadinho de porcelana, previamente calcinado e tarado, que depois foi levado à mufla a 525 °C, segundo a norma TAPPI T211 om-93. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com as cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à massa seca do material originalmente empregada no ensaio.

3.3 Determinação da composição inorgânica das cinzas

A composição inorgânica das cinzas da palha foi determinada no Laboratório de Análises de Minerais e Rochas (LAMIR/UFPR) por fluorescência de raios-X em aparelho Philips Analytical XRF, modelo PW 2400/00, provido de um amostrador Philips modelo 2510. As cinzas utilizadas para essa determinação foram obtidas

segundo a norma TAPPI T413 om-02, calcinando-se a palha a 900 °C para obtenção dos compostos na forma de óxidos. Para a análise, utilizou-se uma pastilha obtida pela fundição de uma quantidade pré-determinada de cinzas com tetraborato de lítio e nitrato de amônio, sob aquecimento por 20 min. Em seguida, a mistura foi despejada em uma pequena bandeja de aproximadamente 5 cm de diâmetro. Ao resfriar, o material foi retirado da bandeja, resultando em uma pastilha pronta para ser analisada. O teor de cada óxido encontrado foi expresso em relação à massa seca das cinzas.

3.4 Determinação do teor de extraíveis

O teor de extraíveis presentes na palha foi determinado por extração sequencial em aparelho Soxhlet, utilizando-se uma sequência de solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico, diclorometano, etanol:tolueno 1:2 (v/v) e etanol 95 %, segundo a norma TAPPI T204 om-88, e uma extração com água quente, segundo a norma TAPPI T264 om-88. Entre as extrações, quando utilizado solvente orgânico, o material foi mantido em capela até que o solvente evaporasse. No caso da extração com água, o material foi filtrado, lavado exaustivamente com água destilada e seco em estufa a 40 °C. Os percentuais de cada extrato foram obtidos por diferença de massa em relação à massa seca do material originalmente empregado no ensaio, sendo que os mesmos foram analisados por espectrometria no infravermelho em equipamento Bomen modelo MB-100, no intervalo de 400-4000 cm⁻¹ e 64 varreduras, empregando-se pastilhas de KBr com concentração aproximada de 1 % de amostra.

3.5 Análise química pelo método da lignina de Klason

O teor de lignina de Klason foi determinado de acordo com o método descrito por Gomide e Demuner (1986). A técnica consiste em tratar 300 mg de material livre de extraíveis com ácido sulfúrico 72 % (v/v) a 30 °C por 1 h sob constante agitação, com o auxílio de um bastão de vidro. Após este tempo, o ácido foi diluído até a concentração de 3 % e a solução foi autoclavada (118 °C) para hidrólise total dos carboidratos presentes no material. Ao término de 1 h, a mistura foi filtrada a quente

em cadinho de Gooch n° 2 previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa a 105 °C até peso constante e a porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido (lignina de Klason) foi determinada em relação à massa seca de amostra. O filtrado foi então recolhido em um balão volumétrico de 250 mL e o volume aferido para determinação da lignina solúvel em meio ácido, que foi quantificada por espectroscopia no ultravioleta, em um equipamento Varian modelo Cary 100 scan, sendo o teor calculado pela equação:

$$C(g / L) = \frac{4,53 \cdot (A_{215} - A_{280})}{300}, \quad \text{Equação 1}$$

onde, A_{215} e A_{280} correspondem às leituras em 215 e 280 nm (DENCE; LIN, 1992). Já os carboidratos liberados por hidrólise ácida, e seus respectivos produtos de desidratação, foram determinados por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) do filtrado avolumado, usando um sistema Shimadzu modelo LC10AD, provido de amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e dois detectores, um modelo RID10A para índice de refração e outro modelo SPD-M10Avp para espectrofotometria no ultravioleta. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C, precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com fase móvel H_2SO_4 8 mmol/L a uma vazão de 0,6 mL/min (PITARELO, 2007). A quantificação foi efetuada por padronização externa, baseada em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado, levando-se em conta seus respectivos fatores de hidrólise ácida, sendo estes de 0,95 para a celobiose, 0,90 para a glucose, 0,88 para a xilose e arabinose e 0,72 para o ácido acético. Além disso, a análise por CLAE forneceu o teor dos subprodutos de desidratação da hexose e das pentoses (hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente). A estes componentes foram aplicados fatores para a conversão aos seus carboidratos de origem e somados aos teores obtidos na análise, sendo o hidroximetilfurfural somado ao teor de anidrogucose e o furfural ao de anidroarabinose, devido a este monossacarídeo sofrer hidrólise mais facilmente e, conseqüentemente, desidratação.

3.6 Determinação do teor de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada no Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA/UFPR) segundo a metodologia 991.20 da AOAC (2005). O método, conhecido como micro-Kjeldahl, consiste em digerir de 0,5 a 0,8 g de amostra em um tubo de Kjeldahl com 2,5 g de uma mistura catalítica (K_2SO_4 e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 10:1 m/m) e 7 mL de H_2SO_4 concentrado. A mistura foi aquecida lentamente em um bloco digestor, mantendo a temperatura de 50 °C por 1 h. Em seguida, a temperatura foi elevada gradativamente até atingir 350-400 °C. Após o líquido se tornar límpido e transparente, de tonalidade azul-esverdeada, a amostra foi retirada do aquecimento e deixada esfriar, para então adicionar 10 mL de água e NaOH 50 % (m/v). O tubo de Kjeldahl foi adaptado em um destilador, sendo precedida a destilação. O destilado (amônia) foi recolhido em um Erlenmeyer contendo 20 mL de H_3BO_3 (ácido bórico) 4 % (m/v) com 4-5 gotas de um indicador misto (0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol em 200 mL de álcool etílico 70 % (v/v)). O ponto final da destilação foi testado com papel de indicador de pH até que não ocorresse a reação alcalina. Em seguida, a solução foi titulada com ácido sulfúrico 0,05 mol/L até a viragem do indicador. O teor de nitrogênio total foi calculado pela equação:

$$\% \text{ nitrogênio total} = \frac{V \cdot M \cdot 2 \cdot f \cdot 0,014 \cdot 100}{P} \quad \text{Equação 2}$$

onde V é o volume de solução de H_2SO_4 0,5 mol/L gasto na titulação, M e f são a molaridade teórica da solução e o fator de correção, respectivamente, da solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L e P é a massa de amostra em gramas. O teor de proteínas foi obtido multiplicando a porcentagem de nitrogênio total por 6,25.

3.7 Procedimento de obtenção da holocelulose e seus derivados

Cerca de 4 g de amostra seca e livre de extraíveis foram colocados em um Erlenmeyer contendo 110 mL de água. Em seguida, foram adicionados 3 mL de ácido acético glacial, 21,5 mL de acetato de sódio 20 % (m/v) e 8,5 mL de clorito de sódio

40 % (m/v) e a mistura foi colocada em banho a 75 °C por 30 min, agitando o frasco frequentemente. Posteriormente, novas quantidades de ácido, de acetato e de clorito foram adicionadas ao meio reacional e esta operação foi repetida até um tempo total de 2 h. Após esse tempo, a mistura foi filtrada em cadinho Gooch 2 previamente tarado e o resíduo foi lavado exaustivamente com água gelada até pH neutro e depois por 2 vezes com acetona. O material fibroso foi seco em estufa a 105 °C, obtendo-se assim a holocelulose (GUERRA, 2002).

Para obtenção da hemicelulose A, foram acondicionados 3 g de holocelulose em um Erlenmeyer, no qual se adicionou 100 mL de KOH 5 % (m/v) e a mistura deixada em banho a 25 °C por 120 min, agitando o frasco a cada 10 min. Ao final, o material foi filtrado em cadinho e lavado com KOH 5 % e água. O filtrado foi transferido para uma proveta de 1 L e o volume foi completado com etanol/ácido acético 1:1 (v,v). Esta mistura foi deixada em repouso até o outro dia para decantação do precipitado formado. O sobrenadante foi sifonado e o resíduo centrifugado por 15 min a 3000 rpm, depois lavado várias vezes com uma mistura etanol/água (70:30), sempre centrifugando e descartando o sobrenadante, até obter pH neutro. Por último, o precipitado foi lavado uma vez com água, congelado com nitrogênio líquido em um balão de fundo redondo de forma homogênea e liofilizado. O precipitado branco obtido correspondeu à hemicelulose A. O resíduo fibroso do cadinho foi transferido para um erlenmeyer e o processo foi repetido, porém, com KOH 24 % para a obtenção da hemicelulose B (precipitado branco), sendo também realizadas as etapas de lavagem do precipitado e de liofilização citadas acima. Depois da extração das hemiceluloses, o resíduo fibroso foi lavado com água até que o pH se tornasse neutro e, em seguida, lavado com pequenas porções de acetona, sendo seco em estufa a 50 °C para obter a α -celulose da palha de cana-de-açúcar (FENGEL; WEGENER, 1989).

A análise da composição química da holocelulose e da α -celulose foi realizada pelo método da lignina de Klason, descrito no item 3.5. Além disso, a holocelulose foi analisada por difração de raios-X (DRX) segundo o item 3.8. As demais frações, hemiceluloses A e B, foram analisadas por CLAE empregando o procedimento descrito no item 3.5, após hidrólise com H₂SO₄ 1 mol/L por 2 h em estufa a 105 °C.

3.8 Determinação do índice de cristalinidade

A determinação do índice de cristalinidade das diferentes frações da palha de cana, obtidas no item 3.7, foi realizada por difração de raios-X (DRX). As análises de DRX foram realizadas em um difratômetro Shimadzu modelo X XRD-7000, usando radiação Cu K_{α} =1,5418 Å, 30 mA e 40 Kv. A varredura foi de 5 a 40° com velocidade de 2°/min. O índice de cristalinidade (ICr) foi estimado expressando a intensidade do pico em 002 (em torno de 22 ° de 2 θ) em relação ao somatório da intensidade a 22 ° e a região amorfa em 18 ° (SEGAL *et al.*, 1959).

3.9 Determinação da massa molar dos carboidratos

A distribuição de massas moleculares (MM) dos polissacarídeos da palha de cana, bem como de suas diferentes frações (holocelulose, hemiceluloses A e B e α -celulose), foi obtida por cromatografia de permeação em gel (CPG) de derivados obtidos por carbamilação, de onde foram calculados os seus respectivos graus de polimerização (GP) por calibração universal.

A carbamilação das amostras liofilizadas foi realizada suspendendo 50 mg de amostra em 4 mL de piridina seca em um tubo com tampa de teflon. Em seguida, 0,5 mL de isocianato de fenila foram adicionados e a reação transcorreu por 48 h em banho seco a 80 °C, agitando-se levemente a mistura ao longo do período reacional. Após este período, o material carbamilado foi precipitado adicionando ao tubo uma mistura de MeOH/H₂O (80:20) sob agitação vigorosa e o precipitado foi lavado com esta mesma mistura até a eliminação da piridina, descartando o sobrenadante após cada lavagem. O precipitado foi então seco e armazenado em dessecador a vácuo contra P₂O₅. Posteriormente, cada amostra foi solubilizada em tetrahidrofurano (THF, grau espectrométrico) a fim de se obter uma concentração mássica de 1 mg/mL. Após a solubilização, a amostra foi filtrada e analisada por CPG para determinação da distribuição em massa molar aparente.

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a líquido Waters modelo 1515 e quatro colunas TSK Gel (7,8 x 300 mm) em série, cujos limites de exclusão corresponderam a 4×10^7 (TSK 6000 HXL), 4×10^5 (TSK 4000 HXL), 6×10^4 (TSK 3000 HXL) e 1×10^3 (TSK 1000 HXL) unidades de massa atômica. As amostras

foram monitoradas por detectores de índice de refração e de espectrofotometria no ultravioleta (UV em 240 nm), modelos 2414 e 2487 (Waters), respectivamente, utilizando THF como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min e a temperatura da coluna em 45°C.

A curva de calibração foi gerada a partir do perfil de eluição de vinte padrões de poliestireno. Uma dispersão típica de 2-3% foi observada na curva bimodal como resultado de uma modelagem quadrática. O cálculo da massa molar foi realizado pelo método de calibração universal, utilizando os coeficientes alfa (α) e kappa (k) de Mark-Houwink (VALTASAARI; SAARELA, 1975) de 0,92 e $2,01 \times 10^{-5}$ para a celulose per-carbamilada, respectivamente, e de 0,74 e $1,18 \times 10^{-4}$ para o poliestireno, utilizando THF como solvente. Assim, baseados na curva de calibração dos padrões de poliestireno, foi possível calcular o número molar médio (ou média aritmética das massas molares, MM_N) e a massa molar média (ou média ponderada das massas molares, MM_M) dos polissacarídeos da palha de cana. O GP foi determinado através da equação de $GP = MM/519$, onde o numerador corresponde à massa molar obtida na curva de calibração e o denominador corresponde à massa molar de uma unidade de anidroglicose per-carbamilada (Ramos et al., 1992). Neste caso, os valores calculados de GP para hemiceluloses per-carbamiladas utilizaram os valores de α e k mencionados acima, devido à inexistência na literatura especializada de valores específicos para esta classe de compostos, tratando-se, portanto, de uma aproximação.

3.10 Determinação da razão molar dos carboidratos

As razões molares dos carboidratos presentes na palha nativa e pré-tratada foram obtidas através da acetilação dos hidrolisados de Klason, utilizando o método do acetato de alditol (BLAKENEY *et al.*, 1983). Primeiramente, 500 μ L do hidrolisado foram neutralizados com 120 μ L de amônia (1 mol/L) em um tubo com tampa de teflon, ao qual foram posteriormente adicionados 50 μ L de uma solução de myo-inositol (padrão interno), preparado a partir de 0,2 g do padrão em 100 mL de água destilada. A solução foi reduzida a 40°C por 90 min em banho seco com 1 mL de uma solução de borohidreto de sódio 20 mg/mL em dimetilsulfóxido. Terminado o tempo de reação, 200 μ L de ácido acético glacial foram adicionados à mistura, que foi agitada

vigorosamente por 15 s para então receber 200 μ L de 1-metilimidazol e 2mL de anidrido acético. Esta mistura permaneceu em repouso por 15 min a 25°C para que ocorresse a acetilação. O excesso de anidrido acético foi neutralizado com a adição de 5mL de água destilada gelada e os monossacarídeos acetilados foram extraídos com 1 mL de diclorometano para serem analisados por cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).

As análises por CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Varian modelo 450-GC com coluna capilar VF-5MS (30 m x 0,25 mm) e fase estacionária com filme de 25 μ m. A fase móvel utilizada foi hélio 5.0 a uma vazão de 1 mL/min (proporção de split de 1:80). O injetor Varian, modelo 1177, foi mantido a 210 °C durante toda a corrida cromatográfica. Uma rampa de pressão foi estabelecida no injetor com controlador de fluxo eletrônico que foi inicialmente mantido por 4 min a 10 psi, seguido de um acréscimo de 2 psi/min até atingir 20 psi, que foi mantido pelo tempo de 8,5 min. Paralelamente, a coluna foi submetida à seguinte programação de temperatura: inicialmente, 180 °C por 2 min, ao que se seguiu uma rampa de 5 °C/min até 195 °C, que foi mantida por 1 min para depois ser elevada a 210 °C com uma rampa de 1,5 °C/min, totalizando 16 min de corrida cromatográfica. O detector seletivo de massas Varian 320-MS, no modo de impacto de elétrons, foi programado para uma espera de 6,8 min sem aquisição de dados, sendo então acionado o modo de monitoramento de múltiplas reações com 0,7 u.m.a (unidade de massa atômica), tempo de escaneamento de 0,32 s e faixa de leitura de massas entre 43 e 400 Da. O processo de integração utilizou medida de área por altura, calibração interna e minimização de ruídos. Os critérios de confirmação de compostos foram absolutos em relação aos íons de referência. Uma tolerância de 5 % foi admitida no tempo de retenção relativo e a quantificação foi feita pelo método de parâmetros de monitoramento do íon seletivo. Os parâmetros de integração admitiram janela de pico de 10 s e uma sensibilidade sinal/ruído igual a 8.

3.11 Extração da lignina dioxano

Para a extração da lignina, 5 g de palha livre de extraíveis foram acomodadas em um balão de fundo redondo, no qual foi adicionado 100 mL de uma solução de dioxano:HCl 2 mol/L (9:1) (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001) que permaneceu sob

refluxo por 30 min sob atmosfera de N₂. Após esse período, o sistema foi resfriado e a solução foi filtrada a vácuo. O resíduo sólido fibroso foi lavado com dioxano 96% e depois com água, sendo seco em estufa a 50 °C. Já o filtrado foi neutralizado com bicarbonato de sódio, filtrado sob vácuo em membrana de náilon e evaporado até aproximadamente 20 mL sob pressão reduzida para concentração da lignina. Esta solução foi gotejada em um béquer contendo 200 mL de água destilada sob agitação vigorosa e a suspensão final foi então centrifugada por 15 min a 5.000 rpm. O precipitado foi separado e dissolvido em 5,0 mL de dioxano, filtrado e novamente gotejado em um frasco de centrifuga que continha 200 mL de éter etílico anidro. A mistura foi centrifugada por 15 min, o sobrenadante descartado e o precipitado (lignina) lavado mais duas vezes com éter etílico anidro para remoção da água. Por último, a lignina foi lavada com 80 mL de éter de petróleo, centrifugada (descartando o sobrenadante), seca em estufa a 50 °C e transferida para um frasco escuro onde foi armazenada sob refrigeração (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001). A composição química, tanto da lignina extraída como da fibra resultante, foi determinada segundo a metodologia da lignina de Klason (item 3.5).

3.12 Caracterização da lignina dioxano

A lignina extraída com dioxano foi caracterizada quanto à porcentagem de hidroxilas fenólicas e alifáticas, grupamentos ácidos e carbonilas. A lignina dioxano foi também analisada por RMN de ¹³C (ressonância magnética nuclear de carbono-13) por termogravimetria e por microscopia eletrônica de varredura, além de ser acetilada para ser analisada por RMN de ¹H (ressonância magnética nuclear de hidrogênio) e cromatografia de permeação em gel. As metodologias utilizadas seguem descritas abaixo.

3.12.1 Hidroxilas fenólicas

Para a determinação de hidroxilas fenólicas, foi empregado o método de espectrometria diferencial na região do ultravioleta, que inicialmente consiste na preparação de uma solução estoque de lignina (0,5 mg/mL em dioxano 96 %) cujo pH foi ajustado em 13 pela adição de NaOH 1,0 mol/L. Um branco foi feito na mesma

diluição, porém em pH 1, ajustado pela adição de HCl 1,0 mol/L. A varredura foi realizada utilizando-se em um espectrofotômetro de absorção no ultravioleta/visível de feixe duplo modelo, marca Varian, modelo Cary 100 Scan. O teor de hidroxilas fenólicas foi calculado pela equação:

$$\% = \frac{(\Delta 250 \cdot 0,192)}{C}, \quad \text{Equação 3}$$

onde $\Delta 250$ é a absorbância da solução em 250 nm já subtraída da absorbância relativa à linha de base do espectro, 0,192 é a relação de porcentagem de hidroxila fenólica por absorvidade em 250 nm (L/g.cm) e C é a concentração de lignina em g/L (GUERRA, 2002).

3.12.2 Hidroxilas alifáticas

À amostra (100 mg) foram adicionados 5 mL de mistura ftalante (50 mL de piridina e 5 g de anidrido ftálico) e 2 mL de benzeno. O frasco foi fechado e mantido a 80 °C por 3 h. Após este período, foram adicionados 5 mL de água para neutralizar o excesso de anidrido ftálico e o frasco permaneceu por mais 10 min na temperatura de 80 °C. Posteriormente, a amostra foi filtrada em cadinho Gooch n° 2 e o filtrado foi titulado com KOH 0,2 mol/L, utilizando como indicador a fenolftaleína. A porcentagem de OH foi obtida pela equação (ZAKIS, 1994):

$$\% = \frac{(b - a) \cdot f \cdot 170}{m}, \quad \text{Equação 4}$$

onde b e a correspondem aos volumes de KOH gastos na titulação do branco e da amostra, f é a concentração do KOH e m é a massa da amostra em mg.

3.12.3 Hidroxilas totais

O percentual de hidroxilas totais foi determinado pela soma das hidroxilas fenólicas e hidroxilas alifáticas.

3.12.4 Grupamentos ácidos

Cerca de 40 mg de lignina foram tratados com 5 mL de LiOH 0,1 mol/L e 2 mL de etanol em um frasco fechado, que foi acondicionado a 85 °C por 3 min, seguido da adição de 1 mL de cloreto de bário e de repouso até resfriamento. Água foi adicionada até um volume final de 25 mL e, após agitação, o material foi centrifugado. A 20 mL do sobrenadante obtido foram adicionados 5 mL de HCl 0,1 mol/L e gotas de vermelho de metila. O excesso de ácido foi titulado com LiOH 0,1 mol/L e a porcentagem de grupamentos ácidos foi calculada segundo a equação:

$$\% = \frac{(b - a) \cdot f \cdot 212,5}{m}, \quad \text{Equação 5}$$

onde b e a correspondem ao volume de LiOH gasto na titulação do branco e da amostra, f é a concentração do LiOH e m é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.12.5 Carbonilas

Amostras de lignina (80 mg) foram acondicionadas em tubo, onde se adicionou 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 5 mL de mistura oximante (0,2 mol/L $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ e 0,08 mol/L trietanolamina). O tubo foi aquecido a 80 °C por 2 h. Em seguida, o conteúdo foi transferido quantitativamente a um Erlenmeyer com um mínimo de água e o excesso de trietanolamina foi titulado com HCl 0,1 mol/L até pH 3,3. O teor de carbonilas foi obtido pela equação:

$$\% = \frac{(b - a) \cdot f \cdot 280,1}{m}, \quad \text{Equação 6}$$

onde b e a correspondem aos volumes de HCl gastos na titulação do branco e amostra, f é a concentração do HCl e A é a massa da amostra em mg (ZAKIS, 1994).

3.12.6 Acetilação

A cerca de 50 mg de lignina foram adicionados 2 mL de uma mistura de anidrido acético:piridina (1:1, v:v) e a suspensão foi deixada por 54 h na temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de anidrido foi destruído com 13 mL de etanol, seguido de repouso por 30 min. Os solventes foram então evaporados sob baixa pressão e a piridina removida por co-evaporação com metanol e etanol. Após a remoção da piridina, foi realizada uma extração líquido-líquido com água e diclorometano para a remoção do ácido acético. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o diclorometano foi retirado por evaporação à pressão reduzida. A amostra acetilada foi então dissolvida em clorofórmio e posteriormente seca contra pentóxido de fósforo e lentilhas de hidróxido de potássio em dessecador (DENCE; LIN, 1992). Para confirmação da acetilação da lignina foi realizado uma análise por espectrometria no infravermelho em um equipamento espectrômetro Varian 660-IR, empregando pastilhas de KBr (3 mg de amostra em 150 mg KBr) e analisadas na região de 500-4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} e varredura de 64.

3.12.7 Ressonância magnética nuclear (RMN)

3.12.7.1 RMN de ^1H

O espectro de RMN de hidrogênio (RMN de ^1H) da lignina acetilada foi adquirido por 4 h em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz. Cerca de 30 mg de lignina acetilada foi dissolvida em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) ($\delta = 7,29$ ppm) contendo 1 % de TMS (tetrametilsilano) como padrão interno. Os deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN de ^1H foram tabelados e comparados com dados disponíveis na literatura (DENCE; LIN, 1992).

3.12.7.2 RMN de ^{13}C

A análise por RMN de carbono-13 (RMN de ^{13}C) da lignina dioxano foi realizada como método não destrutivo para avaliar os detalhes de sua estrutura química e grupos funcionais. O espectro de RMN de ^{13}C foi adquirido por 24 h em um espectrômetro Bruker Avance 400 MHz a 60 °C (323 K), utilizando tubo de 10 mm contendo 700 mg de amostra em 1,8 mL de dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO-

d₆) (δ 39,6). Os deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN de ¹³C foram tabelados e comparados com dados disponíveis na literatura (DENCE; LIN, 1992).

3.12.8 Determinação da massa molar aparente

A distribuição em massas molares aparentes das amostras de lignina acetilada foi determinada por cromatografia de permeação em gel (CPG), empregando o procedimento descrito anteriormente para a celulose per-carbamilada. As análises foram realizadas a 45 °C em duas colunas TSK Gel (HXL G2000 e G1000) em série, utilizando um cromatógrafo líquido Waters modelo 1515. Tetrahidrofurano (THF) foi empregado como fase móvel a uma vazão de 1 mL/min e o eluato da coluna foi monitorado por detectores de índice de refração e de espectrofotometria no ultravioleta (UV em 280 nm), respectivamente.

3.12.9 Análise termogravimétrica (ATG)

A análise termogravimétrica da lignina dioxano foi obtida em um equipamento Mettler Toledo TGA/s-DTA851 e usando cadinhos de platina. A análise foi realizada sob fluxo de oxigênio (50 mL/min) com uma rampa de aquecimento de 10 °C/min até atingir a temperatura de 1000 °C.

3.13 Determinação dos teores de ácido ferúlico e *p*-coumárico

A determinação dos teores de ácido ferúlico e *p*-coumárico foi realizada em duas temperaturas, 30 e 170 °C, uma vez que a extração a 30 °C extrai a forma éster e a 170 °C extrai as duas formas (éster e éter). Pela diferença do valor destas, é possível obter o teor da forma éter.

O primeiro experimento consistiu em pesar aproximadamente 200 mg de palha seca em um Erlenmeyer de 125 mL, sendo adicionados 16 mL de NaOH 2 mol/L lacrado com Parafilm® e mantido sob agitação a 120 rpm e 30°C por 20 h. Ao final das 20 h, o Erlenmeyer foi retirado e a solução foi acidificada até aproximadamente pH 2 utilizando-se um potenciômetro e um agitador magnético. Após a acidificação, a

suspensão foi avolumada em um balão de 50 mL e armazenada em geladeira por 12 h.

O segundo experimento consistiu em pesar aproximadamente 200 mg de palha seca e 2 mg de antraquinona P.A em um reator de aço inoxidável. Ao reator foram adicionados 16 mL de NaOH 4 mol/L e uma barra magnética. O reator foi fechado e colocado em um banho de silicone. Quando atingido a temperatura de 170°C, o reator foi mantido no banho por 2 h e, ao final deste tempo, o reator foi retirado e resfriado em banho de gelo. Quando o reator atingiu a temperatura ambiente, a solução foi acidificada sob agitação magnética até pH 2, com auxílio de um potenciômetro. Após a acidificação, a suspensão foi avolumada em um balão de 100 mL e armazenada em geladeira por 12 h.

Em ambos os experimentos (30 e 170°C), ao final das 12 h sob refrigeração, os balões foram acondicionados à temperatura ambiente. Para a análise dos ácidos ferúlico e p-coumárico, uma pequena alíquota de cada balão volumétrico foi filtrada em membrana de 0,45 µm e injetada em um cromatográfico FPLC AKTA Purifier, conectado a uma coluna de fase reversa (C18). A análise foi realizada a um fluxo de 0,8 mL/min com uma fase móvel contendo acetonitrila:água (1:4) com 1% de ácido acético P.A.

3.14 Pré-tratamento

O pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar foi realizado pelo processo de explosão a vapor com o objetivo de romper a estrutura lignocelulósica, recuperar os três componentes básicos da biomassa nas frações solúveis e insolúveis, e aumentar a susceptibilidade do componente celulósico ao tratamento enzimático. Os experimentos foram realizados na ausência e na presença de um catalisador (ácido fosfórico) para aumentar a eficiência do processo.

Os experimentos foram realizados utilizando dois planejamentos fatoriais do tipo 2³, variando-se o tempo, a temperatura e a umidade (auto-hidrólise) ou a concentração de ácido empregada na reação (catálise fosfórica) em dois níveis. As condições dos planejamentos encontram-se na Tabela 3. A diferença entre os dois planejamentos é a presença do catalisador ácido. Enquanto que o planejamento sem catálise ácida (Planejamento A), denominado auto-hidrólise, visou estudar a influência

da umidade nos rendimentos de pré-tratamento, o segundo planejamento (Planejamento B) visou estudar os efeitos da adição do catalisador sobre o rendimento e a acessibilidade dos substratos à hidrólise enzimática.

TABELA 3. PLANEJAMENTOS FATORIAIS A E B PARA O PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Exp.	Planejamento A Auto-hidrólise			Exp.	Planejamento B Catálise Fosfórica		
	Umidade (%)	Tempo (min)	Temperatura (°C)		H ₃ PO ₄ (mg/g)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
AH-1	8,4	5	190	AF-1	9,5	5	180
AH-2		10		AF-2		10	
AH-3		5	210	AF-3		5	
AH-4		10		AF-4		10	
PC-AH	19	7,5	200	PC-AF	14,25	7,5	195
AH-8	29,5	5	190	AF-8	19	5	180
AH-9		10		AF-9		10	
AH-10		5	210	AF-10		5	
AH-11		10		AF-11		10	

Os experimentos de auto-hidrólise sob menor teor de umidade (8,4 %) utilizaram a palha seca que estava armazenada em sacos plásticos. Para os experimentos em que a umidade da biomassa foi diferente à da palha estocada, foi necessário borrifar um determinado volume de água sob a palha seca de modo a restabelecer umidade desejada (19 e 29,5 %). Já para os experimentos de catálise ácida, a impregnação ácida foi realizada por borrifamento de uma solução de ácido fosfórico (na concentração desejada) sobre amostras de palha com 10 % de umidade, previamente acondicionadas em um saco plástico, sendo que o volume de água utilizado para preparar a solução corresponde ao necessário para elevar a umidade do material a 29,5 % (conforme a umidade da palha *in natura*). A impregnação foi realizada por 24 h antes do pré-tratamento e o saco plástico foi mantido selado e sob refrigeração durante este período.

O pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar foi realizado em um reator de aço inox com capacidade para 10 L, munido de painel de controle da temperatura e do tempo de reação. A pressão foi controlada na entrada principal do vapor, sendo que esta é dividida em três válvulas para proporcionar uma melhor distribuição do

vapor e uma maior homogeneidade do meio de reação durante o pré-tratamento. O reator está acoplado a uma caldeira de alta pressão, um compressor de ar e um ciclone, que é empregado para a descarga do material e escape de vapores.

Para cada experimento de explosão a vapor, 350-400 g de palha (em relação ao seu peso seco), pré-impregnada ou não com ácido fosfórico, foram introduzidos no reator pré-aquecido. A válvula de vapor foi aberta e a contagem do tempo de pré-tratamento foi iniciada apenas quando a temperatura desejada foi atingida. Ao término do tempo de pré-tratamento, a entrada de vapor foi fechada e, em seguida, acionou-se a abertura da válvula inferior, promovendo a descompressão do material (explosão). O material foi então arrastado para o interior de um ciclone de resfriamento e coletado em um recipiente coletor. Posteriormente, o material coletado foi transferido para um recipiente plástico que permaneceu fechado durante o resfriamento, para evitar a perda de voláteis. Com o material na temperatura ambiente, realizou-se a sua filtração em funil de Büchner, separando a fração solúvel (filtrado) da fração insolúvel (fibras). Uma etapa de lavagem aquosa foi realizada para eliminar açúcares solúveis residuais das fibras pré-tratadas, aonde o material fibroso foi mantido sob agitação mecânica por 1 h, em uma consistência de aproximadamente 2,5 % (m/v). Em seguida, a suspensão foi novamente filtrada em funil de Büchner, drenada e reservada para determinação da umidade e análises posteriores. As frações solúveis da filtração e da lavagem, doravante denominadas FSF e FSL, respectivamente, foram acondicionadas em garrafas plásticas e congeladas para a quantificação de sólidos totais, açúcares solúveis e ácidos orgânicos, dentre outros procedimentos de controle.

3.15 Rendimento do pré-tratamento

3.15.1 Fração insolúvel

O material fibroso obtido, após a lavagem do material pré-tratado, foi acondicionado em saco plástico, selado e armazenado a 2 °C. Para a realização de algumas análises, uma quantidade de material foi seca em estufa a 50 °C e moído em moinho de facas do tipo Wiley até granulometria entre 40 e 60 mesh.

A determinação de sólidos totais da fração insolúvel (ST-FI) foi obtida pela expressão da massa de material pré-tratado, após a etapa de lavagem, em relação à massa inicial empregada no reator, sempre em relação ao peso seco.

Para a determinação do teor de cinzas e da composição química da fração insolúvel, foram realizadas análises de acordo com os procedimentos descritos nos itens 3.2 e 3.5, respectivamente. A análise por CLAE dos hidrolisados de Klason permitiu expressar a recuperação dos principais constituintes presentes na biomassa em relação ao material original, expressa em relação à massa seca de origem empregada no início do pré-tratamento, visando o fechamento do balanço de massas do pré-tratamento.

3.15.2 Fração solúvel

As frações solúveis obtidas contêm particularmente os açúcares derivados das hemiceluloses por hidrólise ácida. Para a quantificação desses açúcares, alíquotas do filtrado e do lavado foram centrifugadas em tubos Eppendorf e analisadas por CLAE para obtenção do perfil cromatográfico dos hidrolisados. Uma etapa de pós-hidrólise foi realizada nestas frações com H_2SO_4 1 mol/L para a hidrólise de oligômeros gerados no pré-tratamento. As amostras foram então analisadas por CLAE nas condições já mencionadas no item 3.5. Os componentes identificados e quantificados em ambas as frações pós-hidrolisadas foram convertidos em suas respectivas formas anidras e expressos em relação à massa seca de origem. De forma análoga, estes resultados permitiram expressar a recuperação dos principais constituintes presentes na biomassa em relação ao material original, para o fechamento do balanço de massas do processo, expressa em relação à massa seca de origem empregada no início do pré-tratamento.

O porcentual de sólidos totais da fração solúvel (ST-FS) foi determinado acondicionando 10 mL de FSF ou FSL em pesa-filtro previamente tarado, que foi colocado em estufa a 80 °C por 24 h. Após esse período, colocou-se o pesa-filtro em estufa a 105 °C por 1 h. O teor de ST-FS foi obtido pela expressão da diferença das pesadas em relação à massa inicial seca do material *in natura*, ressaltando que o valor de ST-FS é a soma dos sólidos totais da FSF e da FSL.

3.15.3 Sólidos totais e balanço de massas

O rendimento dos sólidos totais do pré-tratamento foi obtido pela soma do percentual de sólidos da fração solúvel com os sólidos da fração insolúvel, expressando assim a recuperação dos sólidos totais após o pré-tratamento. Já o balanço de massas do pré-tratamento foi fechado com base na recuperação de cada componente presente nas frações FS e FI, expressos em relação ao teor inicial na palha *in natura*. Pela soma do balanço de massas das duas frações, foi obtido o balanço de massas para cada componente após o pré-tratamento.

3.16 Estudo da variância dos planejamentos fatoriais 2³

A partir dos dados obtidos nos dois planejamentos fatoriais 2³, foi possível fazer um estudo dos efeitos de cada variável, de forma independente e através da interação destas, por análise estatística de variância. Esta análise foi realizada para a recuperação de sólidos totais na fração insolúvel (FI), na fração solúvel (FS) e na somatória destas (FI+FS), bem como para o balanço de massas de anidroglicose, anidroxilose e anidroarabinose.

O cálculo dos efeitos principais (variável independente) foi realizado pela Equação 7, onde E⁺ corresponde aos experimentos da variável com o limite superior, E⁻ com o limite inferior e N o número de experimentos (Tabela 4). Os efeitos foram comparados ao desvio padrão da triplicata do planejamento, sendo considerados significativos quando maiores do que o desvio padrão.

$$\text{Efeito} = \frac{2 \sum (E^+ + E^-)}{N} \quad \text{Equação 7}$$

TABELA 4. LIMITES SUPERIORES E INFERIORES DE CADA VARIÁVEL DOS PLANEJAMENTOS FATORIAIS.

Limites	Variáveis			
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Umidade	[H ₃ PO ₄]
Limite inferior (-)	5	180 (190)	8,4	9,5
Ponto central (0)	7,5	195 (200)	19	14,25
Limite superior (+)	10	210	29,5	19

3.17 Determinação dos compostos fenólicos na fração solúvel por CLAE

Os compostos fenólicos liberados na fração solúvel após o pré-tratamento foram identificados e quantificados por CLAE utilizando uma coluna de fase reversa C18 de 150 mm em um cromatógrafo Shimadzu LC10AD, utilizando eluição gradiente, sendo a fase móvel (FM) A uma solução de ácido fórmico 2 % (v/v) e a fase móvel B metanol puro. Foi utilizado uma rampa de 3 estágios, no início com 97 % da FM A e 3 % da FM B por 5 min, seguido de 20 % de A e 80 % de B por 10 min e por último, 5 % de A e 95 % de B por 5 min. Ao final da análise, a coluna foi regenerada por 3 min apenas com a FM A. O tempo total da análise cromatográfica foi de 23 min. A temperatura do forno da coluna foi operada a 30 °C e o detector seletivo de arranjo de diodos (DAD). Onze analitos foram monitoradas nestas frações, sendo que os ácidos 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, *p*-coumárico e ferúlico corresponderam a 65-70 % dos picos detectados por CLAE. A calibração para quantificação foi externa.

3.18 Hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados

Os substratos pré-tratados foram hidrolisados sob apenas uma condição para avaliar as suas respectivas acessibilidades químicas, empregando enzimas da Novozymes (Novozymes Latin America, Araucária, PR). Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata em um tubo plástico de 50 mL a 50 °C, com agitação a aproximadamente 25 rpm (rotações por minuto) em uma incubadora rotacional. A concentração de sólidos totais (ST) foi de 8 % e o pH do substrato foi ajustado para 5 usando uma solução de NaOH 50% (m/v). Para evitar que o pH do meio reacional diminuísse durante o processo, uma solução tampão de ácido cítrico de 1 mol/L pH 5 foi adicionada à mistura. Ao final do tempo de hidrólise de 72 h, alíquotas foram retiradas e analisadas por CLAE empregando o mesmo sistema descrito anteriormente para análise dos hidrolisados de Klason. A hidrólise foi realizada com a enzima comercial Cellic CTec 2 da Novozymes. A dosagem enzimática utilizada foi de 2,5 mg de enzima por grama de bagaço seco.

3.19 Modelagem matemática para seleção das melhores condições

Uma regressão linear múltipla foi concebida como uma regressão de mínimos quadrados para n variáveis. O cálculo da matriz (Figura 16) apresenta y como função de resposta, x como as variáveis correlacionadas (por exemplo, tempo, temperatura e concentração de ácido) e β (na equação) ou b (no cálculo da matriz) como coeficientes. O termo independente e ou ε foi negligenciado neste modelo, pois sua influência sobre a função de resposta não foi significativa.

$$y = \beta_0 + x_1\beta_1 + x_2\beta_2 + x_3\beta_3 + \dots + x_k\beta_k + \varepsilon$$

$$\begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ \dots \\ y_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{21} & \dots & x_{k1} \\ 1 & x_{12} & x_{22} & \dots & x_{k2} \\ 1 & x_{13} & x_{23} & \dots & x_{k3} \\ 1 & x_{14} & x_{24} & \dots & x_{k4} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & x_{1n} & x_{2n} & \dots & x_{kn} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ \dots \\ b_k \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e_1 \\ e_2 \\ e_3 \\ e_4 \\ \dots \\ e_n \end{pmatrix}$$

FIGURA 16. MATRIZ UTILIZADA PARA CÁLCULOS DA MODELAGEM QUADRÁTICA.

O coeficiente de cálculo vetorial foi feito pela seguinte expressão:

$$\mathbf{b} = (\mathbf{X}^T \cdot \mathbf{X})^{-1} \cdot (\mathbf{X}^T \cdot \mathbf{y}) \quad \text{Equação 8}$$

onde b é o coeficiente vetorial, \underline{X} é as variáveis da matriz e y é o vetor da função resposta.

Duas funções resposta foram modeladas neste estudo: a recuperação de glucose, a qual expressa o balanço de massas da glucose na fração insolúvel (FI) derivada do pré-tratamento, e os equivalentes de glucose liberados pela hidrólise enzimática (EqGlc HE) dos substratos pré-tratados, não lavados e lavados exaustivamente com água. Estas funções resposta foram ajustadas em um modelo quadrático utilizando a Equação 8. Esta equação também foi fonte para gerar as superfícies de resposta para as duas funções mencionadas acima (recuperação de glucose e rendimento de EqGlc HE).

$$\text{FR} = \alpha_0 \cdot \text{tempo} + \alpha_1 \cdot \text{temperatura} + \alpha_2 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] + \alpha_3 \cdot \text{tempo}^2 + \alpha_4 \cdot \text{temperatura}^2 + \alpha_5 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]^2 + \alpha_6 \cdot \text{tempo} \cdot \text{temperatura} + \alpha_7 \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] + \alpha_8 \cdot \text{temperatura} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] + \alpha_9 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]$$

Equação 9

Para validar o modelo quadrático de cada função de resposta, uma regressão linear foi calculada envolvendo os valores experimentais e as estimativas teóricas oriundas do modelo. A correlação linear foi considerada forte quando o coeficiente de Pearson (P) correspondente foi acima de 0,7 ($0,7 \leq P \leq 1,0$), moderada quando P ficou entre 0,3 e 0,7 ($0,3 \leq P \leq 0,7$) e fraca quando P ficou abaixo de 0,3.

3.20 Pré-tratamento nas condições do experimento selecionado

Para análise das modificações químicas que a estrutura da biomassa sofre com a explosão a vapor nas condições do experimento selecionado, um novo pré-tratamento foi realizado utilizando 3240,0 g de palha seca impregnada com 9,5 mg/g H_3PO_4 por 10 min a 180 °C. Como a capacidade do reator é de aproximadamente 1200 g de material, 3 (três) explosões consecutivas foram realizadas e as frações combinadas para análise química e cálculo do balanço de massas. O pré-tratamento foi realizado em maior quantidade com a finalidade de investigar a reprodutibilidade do substrato obtido nestas condições, sendo que seu rendimento foi realizado segundo o item 3.14 e seus subitens.

3.20.1 Determinação dos compostos fenólicos na fração solúvel por CG-EM

Os compostos fenólicos liberados durante o pré-tratamento sob condições selecionadas foram extraídos da FS com diclorometano, secos com sulfato de sódio anidro, filtrado em uma membrana de 0,45 μm e em seguida analisados por CG-EM, no mesmo sistema cromatográfico descrito no item 3.10.

3.20.2 Caracterização do substrato

A caracterização do substrato foi realizada segundo as metodologias descritas nos itens 3.2, 3.3, 3.5, 3.7 a 3.12, inclusive todos os subitens do 3.12, e 3.13.

3.20.3 Hidrólise enzimática do substrato

A hidrólise enzimática do substrato lavado foi realizada nas mesmas condições do item 3.18.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização da palha de cana-de-açúcar

A palha de cana-de-açúcar foi caracterizada em relação a sua composição e propriedades químicas e os componentes macromoleculares foram analisados a fim de investigar sua natureza estrutural, utilizando técnicas como cromatografia e espectrometria.

4.1.1 Cinzas

O teor de cinzas da palha *in natura* (PIN) correspondeu a 6,23 %, sendo este inferior ao valor de 11,7 % encontrado por Almeida (2008). Este resultado foi provavelmente devido ao fato de que, neste trabalho, a palha foi lavada com água antes da caracterização química (inclusive da determinação de cinzas) para remover poeira e outros contaminantes do solo, procedimento este que pode ter removido parte da sílica presente na superfície das folhas. Possivelmente, estes altos teores de cinzas na palha estão diretamente relacionados à estratégia de colheita, que acaba por gerar um grande acúmulo de inorgânicos na biomassa vegetal. Altos teores de cinzas podem ser problemáticos para o pré-tratamento a vapor, pois, além de diminuir a disponibilidade de matéria-prima para a fermentação, acarreta em um aumento na capacidade tamponante da mesma, levando a uma neutralização parcial dos ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa. Além disso, também pode causar maior abrasão e corrosão dos equipamentos.

A caracterização dos compostos inorgânicos (Tabela 5) presentes nas cinzas da palha foi realizada por fluorescência de raios-X (FRX), usando o material obtido por calcinação a 900 °C. Nestas condições, o porcentual de cinzas da palha foi de 5,23 %, ou seja, um pouco abaixo do valor obtido em mufla pelo método gravimétrico. O balanço mássico dos óxidos detectados por FRX correspondeu a 94,3 % do total das cinzas, ficando abaixo da análise quantitativa usualmente obtida com esta técnica. Este resultado foi atribuído à presença de enxofre, o qual foi passível de detecção apenas qualitativamente, uma vez que o mesmo se perde facilmente no processo de obtenção das pastilhas utilizadas no ensaio.

TABELA 5. ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, EXPRESSO EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS.

Oxido	Este trabalho (%)	Literatura ² (%)
CaO	14,68±0,05	5,76
MgO	4,55±0,04	5,27
SiO ₂	51,17±0,25	52,62
Al ₂ O ₃	6,62±0,05	15,80
Fe ₂ O ₃	5,76±0,02	3,93
Na ₂ O	0,18±0,01	0,12
K ₂ O	6,22±0,01	7,80
SrO	0,10±0,00	nd
TiO ₂	1,97±0,01	nd
MnO	0,37±0,00	nd
P ₂ O ₅	2,02±0,01	nd
Perda ¹	0,64±0,00	0,57
Total	94,28	91,87

¹ Perda inerente ao fogo (perda ao fogo)

² Samaniego, 2007

Alguns dos óxidos presentes na biomassa também foram detectados apenas qualitativamente, pois estavam abaixo do limite de detecção (1000 ppm), sendo eles CuO, Nb₂O₅, ZnO, ZrO₂ e Rb₂O. O óxido predominante foi o SiO₂, com um teor de 51,17 %, o que está de acordo com os valores de 52,62 % citados por Samaniego (2007). Outros óxidos também se apresentaram em altos teores, porém, em proporções menores quando comparadas à do SiO₂.

O alto teor de CaO, MgO e K₂O (óxidos básicos) fornece informações importantes sobre a capacidade tamponante da fração inorgânica da biomassa da cana, com prováveis consequências sobre a susceptibilidade à explosão a vapor em função da neutralização parcial dos ácidos responsáveis pela hidrólise das hemiceluloses. A palha estudada apresentou teor de CaO três vezes superior ao relatado na literatura, enquanto que esta medida foi semelhante para os outros óxidos. O alto teor de Al₂O₃ (6,62 %) foi provavelmente devido à contaminação por solo, sendo este bastante inferior ao encontrado por Samaniego (2007), que foi de 15,80 %. Já os óxidos de Fe₂O₃ e TiO₂ são provavelmente devidos à contaminações oriundas do processo de colheita, separação e corte das diferentes frações da biomassa da cana. Vale aqui ressaltar que a composição inorgânica da palha depende das formas de

cultivo, colheita e estocagem, os quais podem influenciar na composição dos minerais presentes na biomassa.

4.1.2 Extraíveis

Para a caracterização química dos componentes de baixa massa molar presentes na palha, uma extração sequencial foi realizada com cinco solventes em ordem crescente de polaridade e os extraíveis obtidos em cada solvente foram quantificados gravimetricamente (Figura 17), resultando em um porcentual total de extraíveis de 7,03 %. Uma maior quantidade de extraíveis foi obtida na etapa de extração com água, confirmando estudos anteriores realizados por Pitarelo (2007). A grande quantidade de material solúvel em água foi atribuído à presença de metabólitos secundários e carboidratos solúveis que são essenciais para o crescimento da planta.

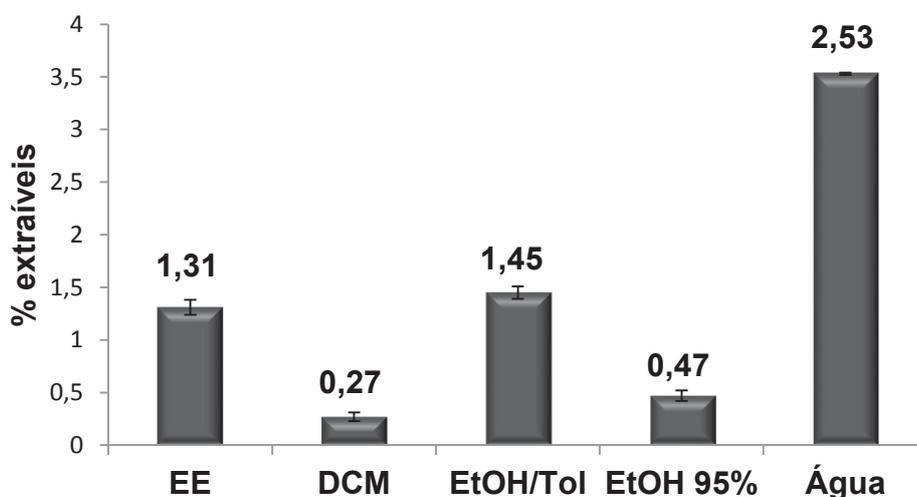


FIGURA 17. PORCENTUAL DOS COMPOSTOS EXTRAÍVEIS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM ÉTER ETÍLICO (EE), DICLOROMETANO (DCM), ETANOL/TOLUENTO 1:2 (ETOH/TOL), ETANOL (ETOH 95%) E ÁGUA QUENTE.

A identificação dos grupos funcionais presentes nas estruturas dos extraíveis, para caracterização preliminar de sua composição química, foi realizada através de análises por espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF).

Os espectros de IVTF dos extraíveis obtidos em EE, DCM, etanol:tolueno (EtOH/Tol 1:2, v/v), etanol 95 % e água estão apresentados na Figura 18. A similaridade dos espectros dos extraíveis com EE, DCM e EtOH/Tol foi muito marcante, sugerindo que uma extração única com um desses solventes seria suficiente para remover a totalidade dos extraíveis da palha de cana. Os espectros dessas três frações revelaram também que compostos oxigenados estão sempre presentes nestes extratos, em quantidades variáveis.

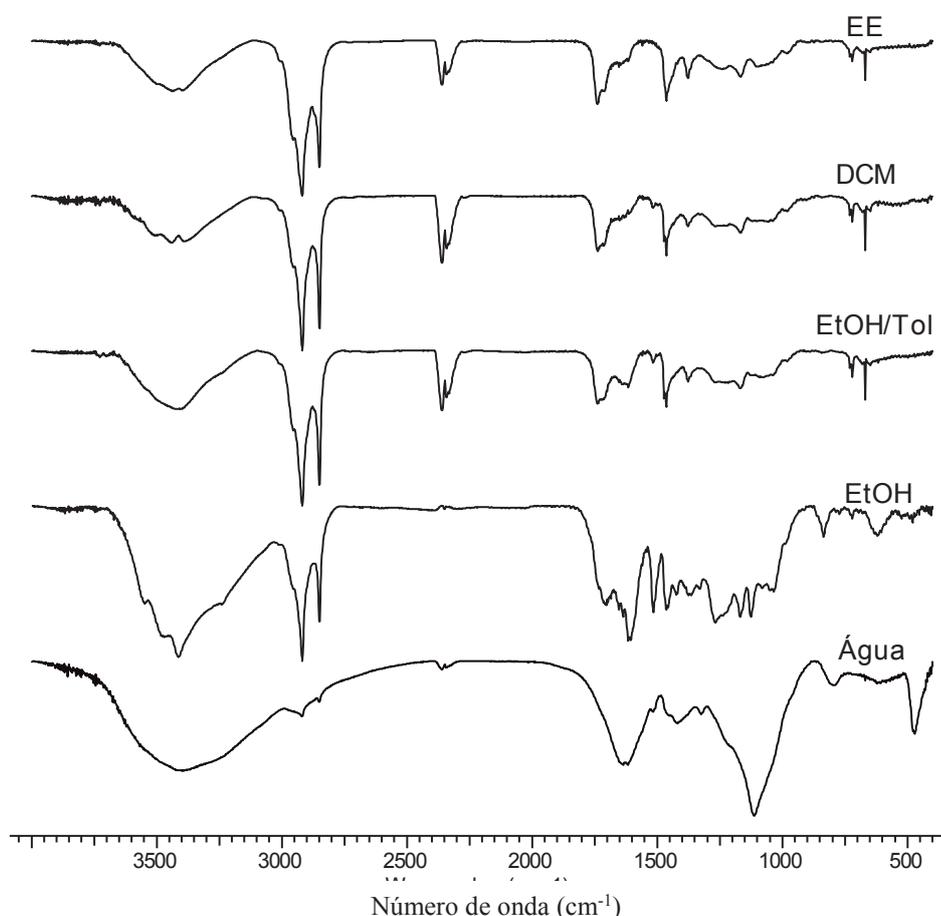


FIGURA 18. ESPECTROS DE IVTF DOS EXTRAÍVEIS DA PALHA, OBTIDOS EM CADA UM DOS SOLVENTES UTILIZADOS.

Em geral, os extraíveis obtidos com éter etílico apresentaram um espectro de IVTF típico de compostos orgânicos alifáticos de baixa polaridade. Essa conclusão é resultado da presença de deformações axiais em 2920 e 2850 cm^{-1} de CH ligados em CH_3 e CH_2 , respectivamente, assim como da deformação angular de CH em CH_2 em 1463 cm^{-1} . Outras evidências nos espectros de IVTF, incluindo a baixa intensidade das vibrações de estiramento de grupos OH associados, sugerem que tais extraíveis

são compostos principalmente por lipídios, ácidos graxos, terpenos e ceras. No espectro dos extraíveis em DCM, vibrações do anel aromático foram inicialmente observadas em 1540 cm^{-1} e estas se tornaram relativamente predominantes no espectro dos extraíveis obtidos com EtOH:Tol, juntamente com outras bandas características de compostos fenólicos, esteróis e outros compostos oxigenados. A região de $2900\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à vibração do estiramento de OH associados, enquanto que a banda em 1168 cm^{-1} corresponde à vibração do estiramento de O-C-O em acetais, sendo sua maior parte pertencente às ligações glicosídicas dos polissacarídeos da cana. Essas bandas são predominantes nos espectros de IVTF das últimas duas famílias de extraíveis, particularmente nos extraíveis com água, cuja hidrofiliabilidade e perfil de IVTF foram típicos de carboidratos hidrossolúveis como a pectina. Já as bandas em 2350 cm^{-1} e 690 cm^{-1} nos espectros dos extraíveis com EE, DCM e EtOH/Tol se devem a presença de CO_2 por contaminação no preparo das pastilhas.

4.1.3 Lignina, carboidratos e demais componentes da biomassa

Através da análise da lignina de Klason, foi possível determinar tanto a lignina insolúvel como a solúvel em meio ácido da palha de cana, sendo que a somatória destas representa o teor de lignina total. Além disto, através dos hidrolisados ácidos derivados desta análise, quando caracterizados por CLAE, revelaram a presença dos principais monômeros constituintes de polissacarídeos, como glucose (celulose), xilose e arabinose (hemiceluloses), assim como ácido acético, que se encontra presente nas hemiceluloses como grupamento acetila. As análises por CLAE também foram úteis para quantificar o hidroximetilfurfural (HMF) e o furfural presentes nos hidrolisados ácidos de Klason. Esses subprodutos de desidratação foram convertidos a pentoses e hexoses aplicando-se um fator de conversão e as quantidades resultantes foram adicionadas aos valores totais de celulose e hemiceluloses, respectivamente. O hidroximetilfurfural é proveniente da glucose e o furfural, da arabinose e da xilose. Porém, uma maior parte deste último deve ser proveniente da arabinose, por esse resíduo ser mais susceptível à reações de hidrólise e desidratação do que a xilose.

Os valores obtidos para cada constituinte a partir da análise da lignina de Klason foram calculados em relação à massa inicial seca de palha *in natura*. No

entanto, da totalidade desta massa, 6,23 % corresponde as cinzas, 7,02 % aos extraíveis e 3,72 % às proteínas. Para obter a composição química da palha de cana, que se encontra registrada na Tabela 6 em comparação com dados obtidos anteriormente para o bagaço de cana (CANE BIOFUEL, 2010), os teores de anidroglicose, de anidroxilose, de anidroarabinose, do grupo acetila e da lignina (solúvel e insolúvel) foram ajustados para a massa inicial (100 %) descontado dos teores de cinzas, extraíveis e proteínas. Em ambos os casos, a caracterização foi feita empregando os mesmos procedimentos analíticos.

TABELA 6. PORCENTUAL MÁSSICO DOS COMPONENTES DE AMOSTRAS SECAS E LIVRES DE EXTRAÍVEIS DA PALHA E DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Componente	Palha (%)	Bagaço⁴ (%)
Anidroglicose ¹	35,75±0,10	37,96±0,13
Anidroxilose ²	23,89±0,29	18,89±0,06
Anidroarabinose ²	2,57±0,02	3,34±0,02
Grupo acetila ²	2,23±0,01	3,49±0,02
Lignina solúvel ³	0,71±0,03	0,23±0,04
Lignina insolúvel ³	16,84±0,22	20,57±0,26
Cinzas	6,23±0,20	6,53±0,20
Extraíveis em solvente orgânico	3,50±0,06	2,85±0,03
Extraíveis em água	3,52±0,06	1,13±0,05
Proteínas	3,72±0,11	1,22±0,05
Total	98,96	96,21

¹ Presente como componente das β -(1-4)-D-glucanas (celulose);

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses);

³ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído.

⁴ CaneBioFuel (2010)

Analisando os resultados disponíveis para a palha e o bagaço de cana, percebe-se que os teores de anidroglicose são semelhantes entre si, sendo de 35,75 % para a palha e de 37,96 % para o bagaço. A palha apresentou maior porcentagem de anidroxilose, sendo de 23,89 % para a palha e de 18,89 % para o bagaço, ao passo que, para a lignina insolúvel em meio ácido, a palha apresentou teor inferior de 16,84 %, contra 20,57% do bagaço. O teor superior de hemiceluloses na palha indica que os hidrolisados hemicelulósicos derivados do pré-tratamento a vapor provavelmente apresentarão uma maior concentração de furfural, que é um dos inibidores do

processo fermentativo de produção de etanol. Por outro lado, o teor de grupos acetila revela que as hemiceluloses da palha são menos acetiladas que as do bagaço.

Samaniego (2007) relatou teores de 41,42 % de celulose (anidrogucose), 32,65 % de hemiceluloses (soma dos percentuais de anidroxilose, anidroarabinose e grupo acetila) e 22,72 % de lignina total na palha de cana, revelando uma ligeira diferença em relação aos teores obtidos neste trabalho. No entanto, vale aqui ressaltar que os valores da literatura não foram ajustados para os demais componentes (extraíveis, cinzas e proteínas) presentes na palha de cana, como foi realizado na Tabela 6.

O teor inferior de lignina na palha pode ser considerado interessante para o processo de produção de etanol de segunda geração, já que esta macromolécula apresenta íntima relação estrutural com polissacarídeos da parede celular. Isso revela que as fibras da palha são menos lignificadas que as do bagaço e que, por isto, poderão apresentar maior susceptibilidade aos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

4.1.4 Caracterização dos carboidratos

Através da extração oxidativa da lignina da palha livre de extraíveis com clorito de sódio, obteve-se a holocelulose (fibras composta de celulose e hemiceluloses), sendo que esta foi tratada com hidróxido de potássio (primeiramente a 5 % e, em seguida, a 24 %) para obtenção das seguintes frações: α -celulose (celulose insolúvel em álcali) e hemiceluloses A e B. O rendimento da extração foi de 77,7 % de holocelulose (livre de lignina).

A extração da holocelulose e seu fracionamento foram importantes para determinar os teores de hemicelulose A e B presentes na palha. Na Tabela 7 encontra-se o percentual de cada fração derivada da holocelulose, revelando que a hemicelulose A está presente em um teor três vezes superior ao da hemicelulose B.

O clorito de sódio é relatado como um agente oxidante seletivo para a deslignificação de diferentes tipos de biomassa, porém, a Tabela 8, que contém os percentuais mássicos dos constituintes da holocelulose e de suas frações, revela que uma pequena parte da lignina permaneceu nos materiais deslignificados (holocelulose e α -celulose) após o tratamento com clorito de sódio. Uma maior concentração de agente oxidante ou um tempo maior de reação poderia promover uma remoção mais

eficiente da lignina, no entanto, isto poderia levar a uma degradação indesejada dos carboidratos constituintes da biomassa. No entanto, mesmo utilizando as quantidades determinadas na metodologia, ocorreram modificações nas estruturas dos carboidratos que foram detectadas através das análises por difração de raios-X e por cromatografia de permeação em gel e estes resultados serão discutidos a seguir.

TABELA 7. PORCENTUAL DA HOLOCELULOSE E DE SUAS FRAÇÕES EXPRESSOS EM RELAÇÃO À PALHA SECA E LIVRE DE EXTRAÍVEIS.

Componente	(%)
Holocelulose	77,71±0,29
Frações derivadas da holocelulose:	
Hemicelulose A	29,89±1,87
Hemicelulose B	10,25±1,11
α-Celulose	37,53±1,15
Total	77,67

TABELA 8. PORCENTUAL MÁSSICO DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE, DA α-CELULOSE E DAS HEMICELULOSES A E B.

Componente	Holocelulose	α-Celulose	Hemicelulose A	Hemicelulose B
Anidrogucose	49,26±0,21	88,71±0,58	3,53±0,47	4,50±0,06
Anidroxilose	26,05±0,07	2,34±0,10	60,24±0,55	36,77±0,19
Anidroarabinose	4,45±0,01	0,41±0,01	10,06±0,89	4,21±0,06
Grupos acetila	2,67±0,06	-	10,21±0,8	27,22±0,10
Lignina insolúvel	2,13±0,08	5,01±2,66	nd	nd
Lignina solúvel	0,23±0,02	0,62±0,03	nd	nd
Total	84,79	97,09	85,91	73,38

A análise da α-celulose demonstrou que, apesar de todo o grupo acetila ter sido removido das fibras da holocelulose, a extração com álcali não removeu totalmente as hemiceluloses, gerando uma α-celulose com 2,34% de anidroxilose e 0,41% de anidroarabinose. O aumento no teor de lignina na α-celulose é resultado da remoção das hemiceluloses, causando um aumento proporcional de lignina nas fibras celulósicas insolúvel em álcali.

A Tabela 8 também revela que ambas as frações hemicelulósicas isoladas da palha contêm glucose em sua estrutura primária. No entanto, a presença de glucose

nos hidrolisados também pode ter resultado da extração parcial de fragmentos de celulose durante o processo. Por outro lado, analisando comparativamente os dados da Tabela 8, percebe-se que o balanço total de hidrólise foi relativamente baixo para as hemiceluloses A e B. Este resultado está particularmente associado à incapacidade do sistema cromatográfico em resolver e quantificar adequadamente as unidades de ácido 4-O-metilglucurônico, presentes tanto na holocelulose quanto nas duas frações hemicelulósicas. Neste sentido, a hemicelulose B aparenta conter uma quantidade maior destas unidades, além de um percentual superior de anidroxilose e anidroarabinose e de um grau de acetilação muito maior do que aquele observado para a hemicelulose A. Porém, apesar de apresentar coerência com o processo de extração destas frações, esse resultado pode ter sido fruto da contaminação da hemicelulose B com ácido acético, utilizado em excesso na etapa de precipitação das hemiceluloses em etanol.

As análises por DRX (Figura 19) da palha *in natura* livre de extraíveis e da holocelulose dela derivada mostraram um perfil típico de celulose do tipo I, enquanto que a estrutura da α -celulose foi comprometida pela extração alcalina das hemiceluloses A e B. A Figura 19 também indica que o tratamento alcalino promoveu a desorganização das cadeias paralelas da celulose I, sendo que, após neutralização por lavagem exaustiva com água, ocorreu a reorganização das cadeias em um empacotamento antiparalelo típico da celulose II, em processo usualmente conhecido como mercerização.

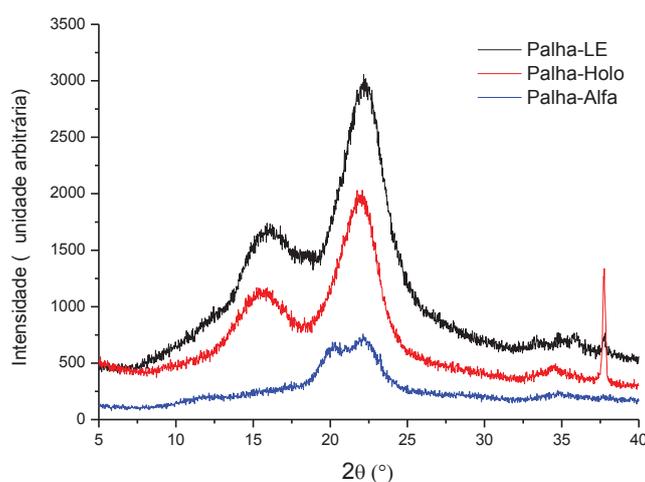


FIGURA 19. PERFIL DE DRX DA PALHA *IN NATURA* LIVRE DE EXTRAÍVEIS (PALHA-LE) E DA SUA HOLOCELULOSE (PALHA-HOLO) E α -CELULOSE.

Almeida (2009) realizou um estudo de mercerização da celulose de sisal através do tratamento alcalino com uma solução de NaOH 20 % (m/v) e, como resultado, relatou um perfil de DRX similar ao obtido neste trabalho para a α -celulose da palha de cana (Figura 20).

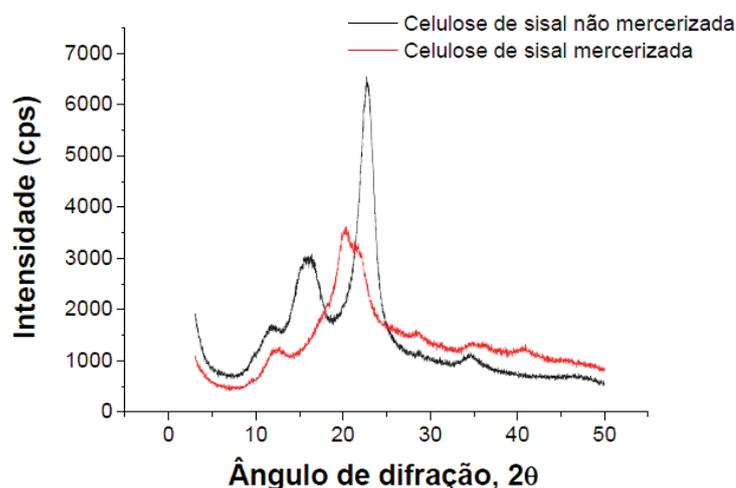


FIGURA 20. PERFIL DE DRX DA CELULOSE DE SISAL ANTES E APÓS MERCERIZAÇÃO COM NaOH 20 % (M/V) (ALMEIDA, 2009)

A extração oxidativa da lignina com clorito de sódio, seguido da extração alcalina das hemiceluloses com hidróxido de potássio, causou modificações nos índices de cristalinidade (ICr) das frações polissacarídicas da palha (Tabela 9), o que caracteriza uma intervenção do presente procedimento de extração na organização supramolecular da celulose.

TABELA 9. ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Fração	Palha (ICr, %)
Material livre de extraíveis	64,1
Holocelulose	74,9
Frações derivadas da holocelulose:	
Hemicelulose A	Amorfo
Hemicelulose B	Amorfo
α -Celulose	58,7

A Figura 21 mostra o perfil de DRX para as hemiceluloses A e B da palha e revela que estas duas frações apresentam perfil típico de uma estrutura amorfa.

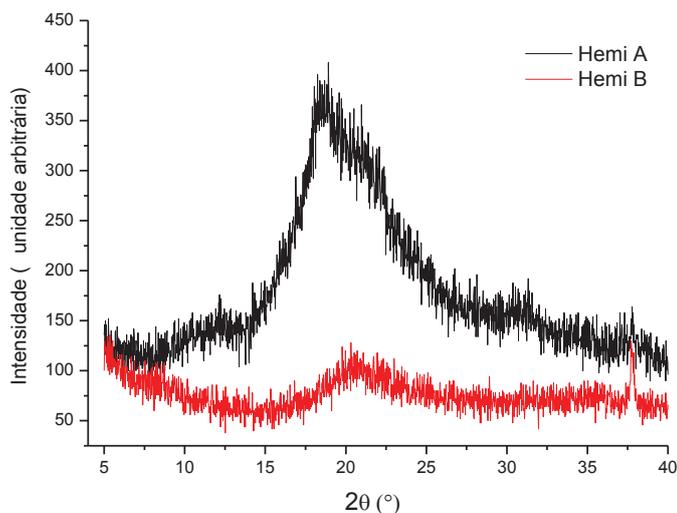


FIGURA 21. PERFIL DE DRX DAS HEMICELULOSES A E B DA PALHA.

O tratamento da biomassa com um agente oxidante foi capaz de promover a reorganização da estrutura da celulose, provavelmente devido ao processo ter quebrado as associações existentes entre os polissacarídeos. Desta forma, as cadeias de celulose se reorganizaram de tal maneira que promoveram o aumento no índice de cristalinidade da holocelulose. Por outro lado, o tratamento alcalino é capaz de promover a abertura das cadeias de celulose que irão se reorganizar em uma nova forma estrutural, podendo apresentar maior ou menor cristalinidade, dependendo do novo arranjo estrutural formado. A diminuição do índice de cristalinidade da α -celulose em aproximadamente 14 %, comparada ao da holocelulose, revelou que a extração alcalina das hemiceluloses causou uma modificação no arranjo estrutural da celulose de forma a promover uma estrutura com menor organização, diminuindo sua cristalinidade.

A análise por cromatografia de permeação em gel (CPG) indicou que o processo oxidativo de deslignificação causou uma redução de 50 % no grau de polimerização das fibras da palha *in natura* (Tabela 10). Analisando o GP das frações finais obtidas após a extração alcalina, é interessante observar que o GP das hemiceluloses A e B se mostraram similares entre si, ao passo que a α -celulose apresentou um GP sendo o dobro destas. Já a polidispersividade, que determina a homogeneidade dos fragmentos medidos na suspensão, foi similar em quase todas as frações, apresentando uma medida maior para a α -celulose, fruto do maior número de etapas empregadas para o isolamento desta fração.

TABELA 10. GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E POLIDISPERSIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, DETERMINADOS POR CPG.

Fração	Palha				
	MM _M ¹	GP _M ²	MM _N ³	GP _N ⁴	PD ⁵
<i>In natura</i>	1.139.966	2.196	1.012.931	1.952	1,12
	1.039.877	2.004	928.461	1.789	
	1.107.865	2.135	989.165	1.906	
Média	1.095.903±51.106	2.112±98	976.852±43.560	1.882±84	
Holo-celulose	665.411	1.282	301.484	581	1,36
	659.398	1.271	299.769	578	
	663.564	1.279	300.879	580	
Média	662.791±3.080	1.277±6	300.711±870	579±2	
Hemi-celulose A	201.459	388	195.011	376	1,10
	210.483	406	203.758	393	
	202.708	391	167.527	323	
Média	204.883±4.889	395±9	188.765±18.906	364±36	
Hemi-celulose B	215.912	416	193.157	372	1,12
	206.462	398	187.057	360	
	210.800	406	197.398	380	
Média	211.058±4.730	407±9	192.537±5.198	371±10	
α-celulose	413.159	796	161.364	311	2,52
	413.155	796	161.362	310	
	392.914	757	154.686	298	
Média	406.409±11.687	783±23	159.137±3.855	306±7	

¹ MM_M, massa molar média

² GP_M, grau de polimerização baseado na MM_M

³ MM_N, número molar médio

⁴ GP_N, grau de polimerização baseado na MM_N

⁵ PD, polidispersividade (PD = GP_M/GP_N)

As razões molares dos monossacarídeos da palha de cana e suas frações (Tabela 11) foram calculadas a partir das análises por CLAE das Tabelas 6 e 8. Esta tabela revela que a remoção da lignina, ao contrário do esperado, hidrolisou parte da xilose, fato devido à diminuição da razão molar entre este monossacarídeo e a glucose. Já a razão molar das hemiceluloses revela que a hemicelulose A possui mais unidades arabinose ao longo da sua cadeia, sendo, portanto, mais ramificada do que a hemicelulose B. Por sua vez, a α-celulose é constituída basicamente por glucose.

TABELA 11. RAZÃO MOLAR DOS MONOSSACARÍDEOS PRESENTES NA PALHA *IN NATURA* E NAS FRAÇÕES DELA DERIVADAS (AnGlc:AnXyl:AnAra).

Palha	AnGlc (%)	AnXyl (%)	AnAra (%)	AnGlc:AnXyl:AnAra
Palha <i>in natura</i>	35,75	23,89	2,57	1:0,67:0,07
Holocelulose	49,26	26,05	4,45	1:0,53:0,09
Frações derivadas da holocelulose				
Hemicelulose A	3,53	60,24	10,06	1:17,07:2,85
Hemicelulose B	4,50	36,77	4,21	1:8,17:0,94
α -Celulose	88,71	2,34	0,41	1:0,03:0,00

4.1.5 Caracterização da lignina

O rendimento da lignina extraída com dioxano:HCl foi de 68,95 %, calculado em relação ao teor de lignina de Klason na palha *in natura*. A composição química da lignina e das fibras deslignificadas foi obtida a partir da metodologia de Klason, cujos resultados estão apresentados na Tabela 12. Os dados obtidos revelam que, mesmo após a extração, 7,96 % de lignina total ainda permaneceram nas fibras, justificando parcialmente o rendimento de 68,95 %. As fibras deslignificadas apresentaram-se ricas em glucose e grande parte das hemiceluloses foi removida junto com a lignina. As condições de extração da lignina, que envolvem a presença de um ácido mineral e calor, justificam esse resultado. Nestas análises, apenas a anidroxilose foi quantificada (10,12 %), sendo que a anidroarabinose e os grupos acetila, se presentes, encontraram-se em níveis inferiores ao limite de detecção pelo método utilizado.

A composição química da palha *in natura* livre de extraíveis revelou uma razão AnXyl:AnAra de 6:1. Após a extração por acidólise, a composição química da lignina dioxano revelou uma razão de praticamente 1:1. Isto indica que a anidroarabinose está mais intimamente associada com a lignina do que a xilose, provavelmente devido as unidades de arabinose serem ramificações das cadeias de xilose, estando mais acessíveis para formar ligações com a estrutura da lignina. Sendo assim, a xilose foi facilmente hidrolisada e removida, enquanto que a arabinose permaneceu associada à estrutura da lignina, após a extração com dioxano:HCl.

TABELA 12. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA E DAS FIBRAS RESULTANTES DA EXTRAÇÃO COM DIOXANO:HCl, A PARTIR DA PALHA LIVRE DE EXTRAÍVEIS.

Componente	Fibra deslignificada	Lignina
Anidroglucose	81,87±0,28	nd
Anidroxilose	10,12±0,19	0,35±0,04
Anidroarabinose	nd	0,41±0,06
Grupos Acetila	nd	nd
Lignina insolúvel	6,70±1,26	83,97±1,14
Lignina solúvel	1,26±0,07	1,34±0,33
Total	99,95	86,30

A análise da composição química da lignina indicou que, com a técnica utilizada, foi possível obter uma lignina com baixa contaminação por carboidratos, o que é ideal para a sua caracterização química. Somado a isto, o rendimento de extração (68,95 %) foi bastante satisfatório quando comparado com dados encontrados na literatura. Por exemplo, utilizando a mesma técnica, Nadji *et al.* (2009) obtiveram um rendimento de 50,1 % para esparto (ou alfa) e Oliveira *et al.* (2009), de apenas 37 % para caule de banana.

A Figura 22 mostra o perfil de IVTF da lignina dioxano da palha *in natura* antes e depois da acetilação. Esta figura revela que a metodologia utilizada foi eficiente na acetilação das hidroxilas da estrutura da lignina, fato atribuído devido à ausência do estiramento de OH no espectro da lignina dioxano acetilada (região de 3400 cm⁻¹) e pelo aumento na intensidade da banda em 1720-1750 cm⁻¹ atribuído a C=O não conjugadas. As bandas em 1425, 1460, 1510 e 1600 cm⁻¹ foram relativas às vibrações de anéis aromáticos. Já a banda em 1128 cm⁻¹ foi atribuída a C-O de estrutura siringila, enquanto que as bandas em 1030 e 1260 cm⁻¹, foram atribuídas a C-H e C-O, respectivamente, de unidades guaiacila (SALIBA; RODRIGUEZ, 2001). Por outro lado, a banda em 830 cm⁻¹ foi atribuída às ligações C-H de unidades *p*-hidroxilbenzil (H) de ligninas do tipo HGS, cuja ocorrência é típica em gramíneas como a cana-de-açúcar (FAIX; GRÜNWARD, 1992). A lignina dioxano acetilada foi utilizada para realizar as análises de RMN de ¹H e de cromatografia de permeação em gel. As demais análises foram realizadas a partir da lignina dioxano sem acetilar.

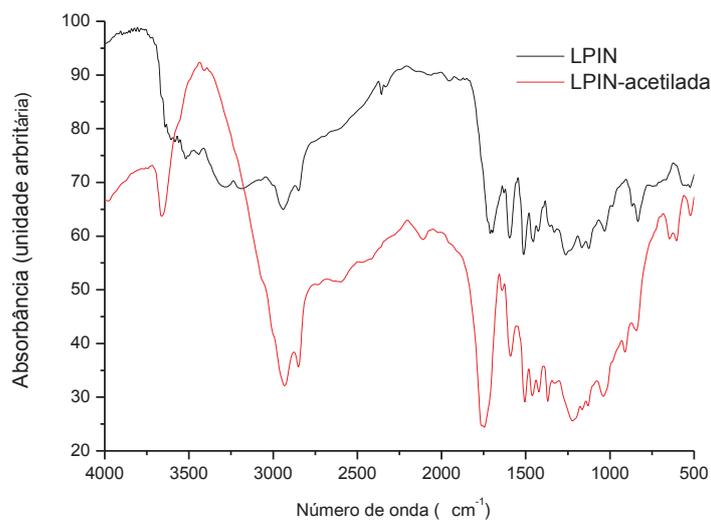


FIGURA 22 . PERFIL DE IVTF DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA *IN NATURA* ANTES (LPIN) E DEPOIS DE ACETILADA (LPIN-ACETILADA).

A partir da lignina dioxano, uma sequência de análises foi realizada no intuito de caracterizar quimicamente a sua estrutura. As Figuras **23** e **24** trazem o espectro de RMN de ¹³C da lignina dioxano e de ¹H da lignina dioxano acetilada.

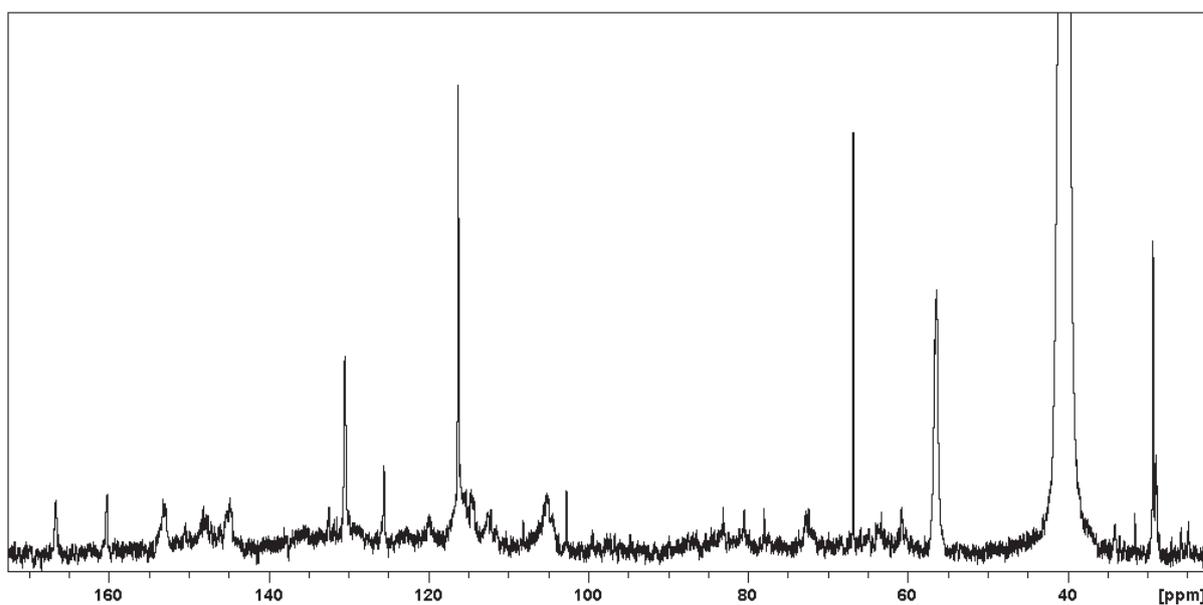


FIGURA 23. ESPECTRO DE RMN DE ¹³C 400 MHz DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA EM DMSO-d₆.

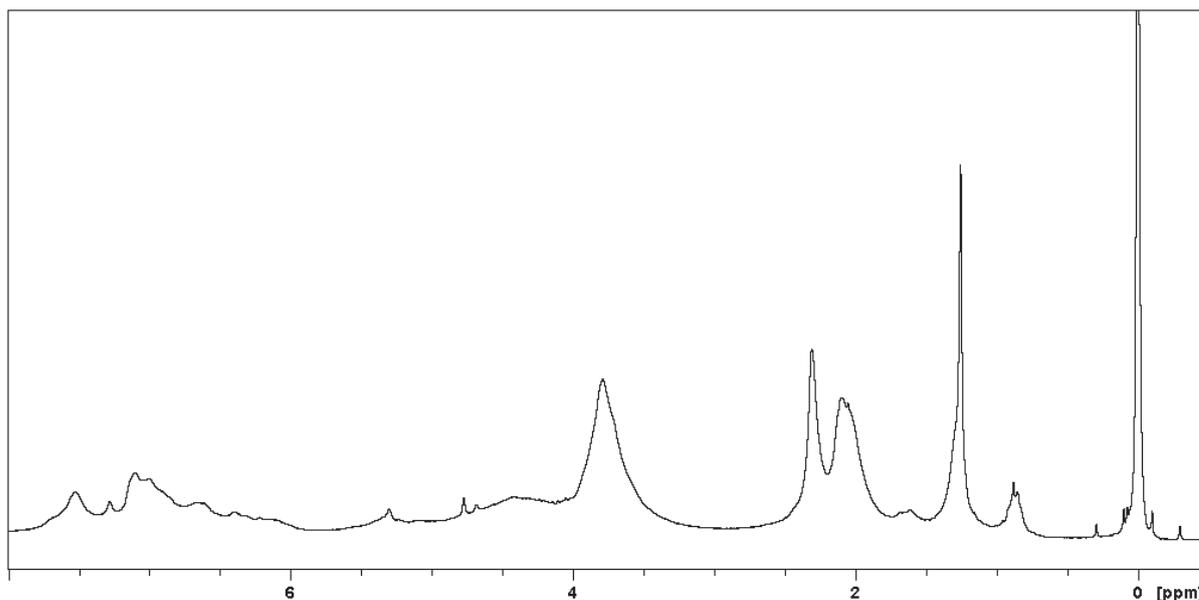


FIGURA 24. ESPECTRO DE RMN DE ^1H 400 MHz DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA EM CDCl_3 .

A Tabela 13 revela que a porcentagem de 14,6 % de grupos metoxilas, determinados a partir do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 23), foi bem coerente com o teor encontrado a partir do espectro de RMN de ^1H (Figura 24), que foi de 14,9 %. Estes dados revelam que a lignina da palha de cana possui mais metoxilas do que as palhas de milho e de soja, onde Saliba *et al.* (2001) encontrou teores de 6,67 e 1,79 %, respectivamente.

TABELA 13. PORCENTUAL DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA ESTRUTURA QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO.

Componente	Lignina dioxano (%)
Hidroxilas fenólicas	1,05±0,04
Hidroxilas alifáticas	5,47±0,28
Hidroxilas totais ¹	6,52
Grupamentos ácidos	0,25±0,04
Carbonilas	0,15±0,01
Carbonos aromáticos totais ²	85,4
Grupos metoxilas ²	14,6 (14,9) ³

¹ Somatório de hidroxilas fenólicas e alifáticas

² Relação entre a integração do deslocamento químico de OCH_3 entre 55,7-55,9 ppm e a região de aromáticos totais (100-162 ppm).

³ Integração da região 3,5-4,0 ppm do espectro de RMN de ^1H .

Os sinais mais intensos no espectro de RMN de ^1H da lignina acetilada foram os referentes aos acetatos alifáticos (2,05 ppm), aos acetatos aromáticos (2,31 ppm) e aos grupamentos metoxilas (3,78 ppm). Por outro lado, a diferença de intensidade entre os sinais em 6,64 (H-Ar em unidades siringila) e 6,99 ppm (H-Ar em unidades guaiacila) (DENCE; LIN, 1992) indicam que a lignina da palha possui mais unidades guaiacila do que siringila em sua estrutura. Este dado é comprovado pelo aparecimento de um intenso sinal em 116,4 ppm no espectro RMN de ^{13}C , referente a C-5 em unidades guaiacila, revelando que a lignina da palha realmente apresenta um alto teor de unidades guaiacila. A lignina predominantemente guaiacilica é uma lignina mais ramificada e condensada, que apresenta uma maior associação com polissacarídeos como as xilanas. Estudos realizados recentemente em nosso grupo de pesquisa revelaram que a lignina do bagaço de cana, em comparação com a palha, possui maior quantidade de unidades siringila em sua estrutura. Ao contrário da lignina do tipo guaiacila, a presença de unidades siringila resulta em uma lignina mais linear e menos condensada, com menor interação com os polissacarídeos. Estas informações são de suma importância para o processo de bioconversão a etanol, pois a extensão da interação da lignina com os polissacarídeos irá definir a susceptibilidade da biomassa ao pré-tratamento.

A Tabela **13** revela ainda que a lignina da palha possui 6,52 % de hidroxilas totais, sendo que as hidroxilas alifáticas estão presentes num percentual superior em cinco vezes do que as hidroxilas fenólicas. Dados encontrados na literatura para o bagaço de cana relatam um teor de 1,9 % para hidroxilas fenólicas (FAIX *et al*, 1992), demonstrando que a palha apresenta teor relativamente inferior (1,05%).

A análise por CPG do material per-acetilado (Tabela **14**) demonstrou que a lignina da palha possui uma média mássica de massa molar aparente (MMA_M) de 9.351 e número molar médio (MMA_N) de 2.688, resultando em uma polidispersividade de 3,58.

A termodegradação da lignina dioxano (Figura **25**) é um processo lento em relação à celulose e as hemiceluloses, que são degradadas em uma estreita faixa de temperatura. A ampla faixa de temperatura para a degradação da lignina (200-450 °C) pode ser explicada pelo fato de que esta macromolécula apresenta uma estrutura complexa composta por uma diversidade de ligações químicas e grupos funcionais, como anéis aromáticos, carbonilas, éteres arílicos, metoxilas e hidroxilas fenólicas e alifáticas. Ligações mais frágeis, particularmente aquelas envolvendo grupos

funcionais oxigenados, são quebradas em temperaturas mais baixas, enquanto que, em temperaturas mais elevadas (>400 °C), reações de decomposição e de condensação dos anéis aromáticos são possíveis através de mecanismos de pirólise (DOMINGUÉZ *et al.*, 2008).

TABELA 14. MASSA MOLAR APARENTE E POLIDISPERSIVIDADE DA LIGNINA DIOXANO ACETILADA, OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL.

Componente	Lignina Dioxano (Da)
MMA _M (massa molar média aparente)	9.351±397,50
MMA _N (número molar médio aparente)	2.688±185,29
Polidispersividade (MMA _M /MMA _N)	3,48±0,10

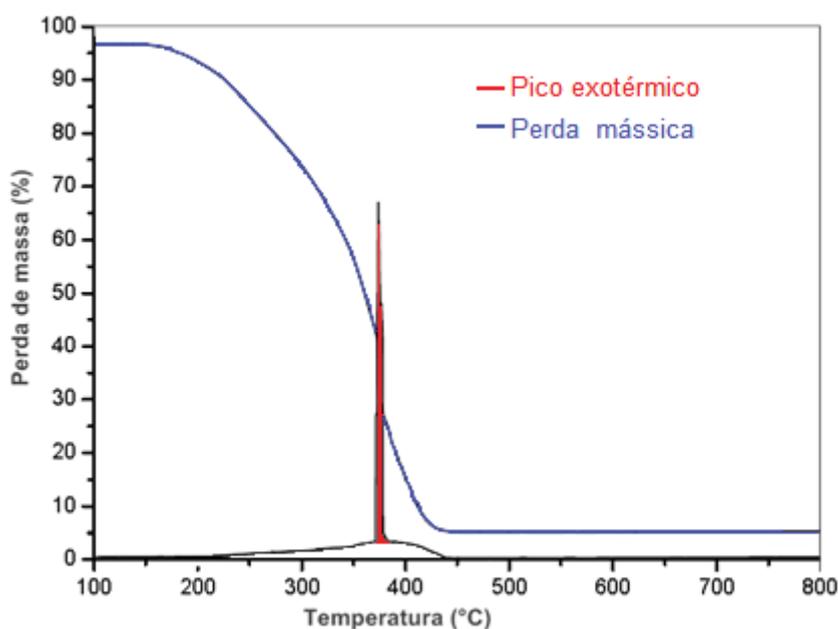


FIGURA 25. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA.

A faixa de degradação da lignina da palha de cana foi de aproximadamente 200 a 420 °C. Depois de atingida a temperatura final de combustão, o resíduo remanescente correspondeu a 2-3 % de material, que representa o teor de material fixo residual de natureza inorgânica (cinzas). Zhang (2008) relatou que a lignina da palha de trigo possui uma temperatura inicial de degradação de 266,2 °C, utilizando atmosfera de oxigênio, sendo que o resíduo obtido depois de atingido a temperatura

de 550 °C correspondeu a 10,1 % do material de origem. Além disso, a lignina da palha apresentou um único pico exotérmico em aproximadamente 380 °C, indicando que a lignina não apresentava contaminação por carboidratos.

4.2 Explosão a vapor

O pré-tratamento promoveu uma quebra substancial da estrutura lignocelulósica, liberando diferentes tipos de unidades, tanto mono como oligossacarídicas, além de outros subprodutos de hidrólise e desidratação.

Os pré-tratamentos realizados sob condições mais brandas resultaram em uma maior quantidade de oligômeros na fração solúvel (proveniente da hidrólise parcial das hemiceluloses), não sendo possível quantificá-los através de cromatografia a líquido. Portanto, para a quantificação cromatográfica e fechamento do balanço de massas de cada constituinte, uma etapa adicional de pós-hidrólise com ácido sulfúrico diluído (1 mol/L) foi realizada de modo a converter todos os carboidratos em suas formas monoméricas.

A Figura **26** permite observar os cromatogramas obtidos antes e depois da etapa de pós-hidrólise, com base nos detectores de índice de refração (RID) e de absorção no ultravioleta (UV).

Os picos existentes na faixa de 6 a 8 min dos cromatogramas da fração solúvel não hidrolisada (Figura **26A**) correspondem aos oligossacarídeos gerados no pré-tratamento. Por outro lado, a Figura **26B** apresenta o cromatograma da fração solúvel pós-hidrolisada, onde é possível observar o desaparecimento dos picos desta região, demonstrando que os oligossacarídeos foram quase que totalmente hidrolisados, causando um aumento relativo dos picos de glucose, xilose, arabinose e ácido acético. Já o cromatograma obtido por espectrometria de absorção no ultravioleta, antes da pós-hidrólise (Figura **26C**), revela a presença de hidroximetilfurfural e furfural na fração solúvel derivada do pré-tratamento. Com a etapa adicional de hidrólise dos oligômeros, o teor destes subprodutos de desidratação diminuiu, sendo um pouco mais acentuado no teor de HMF, como pode ser observado pelo cromatograma da Figura **26D**, indicando perdas por degradação durante a pós-hidrólise.

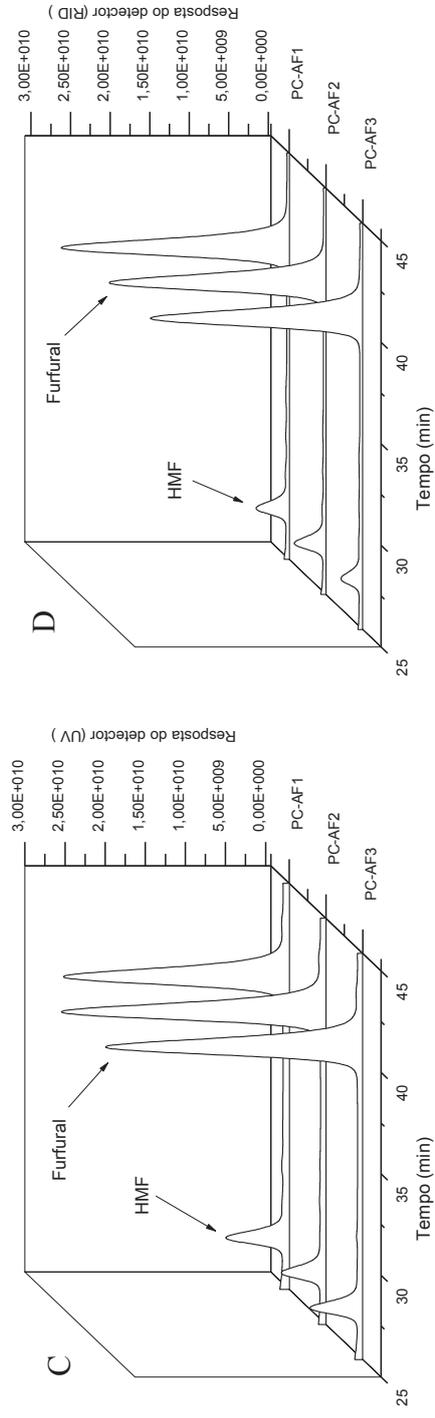
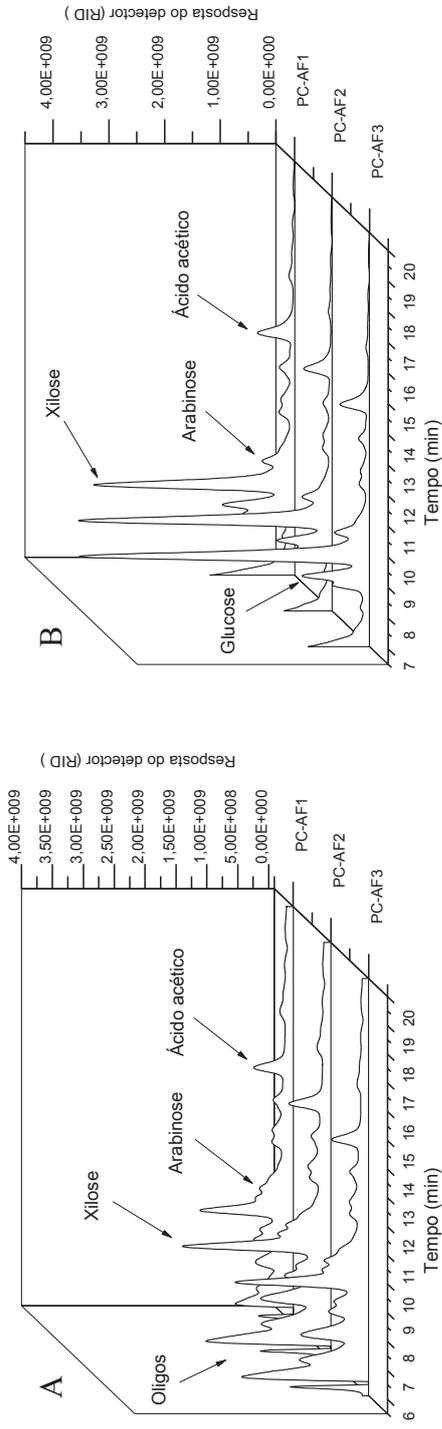


FIGURA 26. CROMATOGRAMAS DAS ANÁLISES DAS AMOSTRAS DO PONTO CENTRAL PC-AF ANTES (A E C) E DEPOIS (B E D) DA PÓS-HIDRÓLISE. (A E B) – DETECTOR DE REFRAÇÃO. (C E D) – DETECTOR DE ULTRAVIOLETA.

4.2.1 Planejamento A – Auto-hidrólise

O planejamento fatorial de auto-hidrólise (Planejamento A) foi utilizado para investigar o efeito do tempo de permanência no reator, da temperatura e da umidade da palha sobre o rendimento das frações solúvel e insolúvel derivadas do pré-tratamento. Os dados obtidos para o rendimento de sólidos totais (ST) após o pré-tratamento, tanto para a fração insolúvel (FI) como para a fração solúvel (FS) (Tabela 15), revelam que o rendimento de ST-FI diminuiu com o aumento da severidade, ao passo que o rendimento de ST-FS aumentou proporcionalmente, devido à solubilização de parte das hemiceluloses no hidrolisado.

TABELA 15. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES DO PLANEJAMENTO A.

Exp.	Condições t (min), T (°C), umidade (%)	Rendimento (%)		
		ST-FI	ST-FS	Total
AH-1	5, 190, 8,4	83,4	13,2	96,7
AH-2	10, 190, 8,4	80,3	11,0	91,4
AH-3	5, 210, 8,4	76,5	16,1	92,6
AH-4	10, 210, 8,4	67,7	20,4	88,1
Média PC-AH (7,5, 200, 19)		79,5±0,9	15,9±1,0	95,3±0,3
AH-8	5, 190, 29,5	75,6	18,4	94,0
AH-9	10, 190, 29,5	78,4	18,2	96,6
AH-10	5, 210, 29,5	63,3	21,8	95,1
AH-11	10, 210, 29,5	67,9	24,4	92,2

O pré-tratamento realizado sob condições mais brandas (AH-1) apresentou os melhores rendimentos da FI e rendimento total, sendo estes de 83,4 e 96,7 %, respectivamente, ao passo que o experimento AH11, de condições mais severas, apresentou o maior rendimento da FS (24,4 %).

A Tabela 16 fornece a composição química da FI do material pré-tratado sem catálise ácida, paralelamente aos resultados derivados da palha *in natura* (PIN). Os pré-tratamentos mais severos promoveram uma maior solubilização das hemiceluloses, sendo quase totalmente removidas das fibras nos pré-tratamento AH-4 e AH-11. No geral, devido a esta remoção, os teores de anidroglicose, lignina e cinzas aumentaram em relação ao teor inicial na palha *in natura* (PIN).

TABELA 16. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO DO PLANEJAMENTO A.

Exp.	Composição Química FI (%)				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Lignina	Cinzas
PIN ¹	35,75±0,10	23,89±0,29	2,57±0,02	17,55±0,18	6,23±0,20
AH-1	42,65±0,14	19,12±0,05	2,14±0,01	27,44±0,34	4,03±0,17
AH-2	44,47±0,76	15,29±0,40	2,84±0,01	29,22±0,15	6,17±0,28
AH-3	48,81±0,33	6,76±0,23	0,99±0,01	33,95±0,50	7,51±0,20
AH-4	47,56±0,35	1,74±0,08	nd	40,28±0,11	8,42±0,14
Média PC-AH	44,49±1,65	11,50±1,51	1,28±0,10	30,91±0,86	8,01±0,90
AH-8	42,66±0,22	18,83±0,18	1,87±0,22	30,60±0,36	6,35±0,26
AH-9	47,05±0,17	13,89±0,27	1,41±0,17	27,35±0,31	6,17±0,27
AH-10	49,20±0,04	5,07±0,33	0,96±0,03	34,34±0,60	8,43±0,25
AH-11	46,35±0,17	1,84±0,01	nd	36,65±0,06	13,16±0,27

¹ Composição química da palha *in natura*

² Média da triplicata do ponto central do planejamento de auto-hidrólise

As Tabelas **17** e **18** apresentam a recuperação dos principais componentes presentes em cada uma das frações, FI e FS, respectivamente. Com o aumento da drasticidade do pré-tratamento, os índices de recuperação de anidroxilose e de anidroarabinose na FI diminuíram consideravelmente, iniciando em 66,78 % no experimento AH-1 até atingir 5,23 % no AH-11 e em 69,48 % até sua remoção total (ou a níveis não detectáveis), respectivamente, ao passo que os índices de recuperação da FS se comportaram de maneira inversa. Nesta fração, a recuperação dos componentes das hemiceluloses (anidroxilose, anidroarabinose e grupo acetila) foi maior conforme aumentou a severidade do pré-tratamento.

O fechamento do balanço de massas dos componentes da biomassa, envolvendo ambas as frações FS e FI, encontra-se representado na Tabela **19**. Esta tabela confirma que, com o aumento da severidade do pré-tratamento, a recuperação dos componentes diminuiu, mostrando que condições mais brandas tendem a ser mais interessantes para a produção de bioetanol, uma vez que a perda de glucose no processo acarretará em menor rendimento de conversão a este biocombustível. No entanto, substratos com menor teor de hemiceluloses podem indicar uma celulose mais acessível à hidrólise enzimática.

TABELA 17. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FI DE CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO A.

Exp.	FI			
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Lignina
AH-1	89,54	66,78	69,48	130,46
AH-2	95,93	51,41	88,77	133,75
AH-3	92,35	23,28	31,70	159,18
AH-4	90,18	5,38	nd	169,39
Média PC-AH	95,83±1,52	44,27±2,10	46,10±2,66	163,89±23,45
AH-8	90,09	59,58	55,00	131,79
AH-9	83,23	45,60	43,03	122,24
AH-10	87,09	13,43	23,64	123,82
AH-11	88,00	5,23	nd	141,74

TABELA 18. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FS DE CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO A.

Exp.	FS			
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila
AH-1	1,08	4,00	11,49	7,80
AH-2	0,83	7,15	8,95	69,28
AH-3	1,77	45,90	36,13	64,08
AH-4	1,13	64,24	65,60	68,89
Média PC-AH	1,34±0,25	12,36±1,88	16,75±3,23	7,81±4,53
AH-8	0,94	4,07	10,87	11,73
AH-9	1,30	19,50	11,26	24,60
AH-10	1,83	62,29	38,99	72,40
AH-11	1,12	64,40	51,63	74,50

O alto balanço de massas para a lignina indica possíveis reações de condensação sobre a sua estrutura, não apenas dos compostos fenólicos liberados pela hidrólise desta, mas também subprodutos de degradação dos açúcares gerados durante o pré-tratamento, como hidroximetilfurfural, furfural e seus derivados (CHUA; WAYAN, 1979a, 1979b, citado por SILVA, 1995). No entanto, erros experimentais nos procedimentos de análise gravimétrica não podem ser descartados, apesar da

obtenção de desvios-padrão relativamente favoráveis em todas as determinações realizadas neste estudo.

TABELA 19. BALANÇO DE MASSAS DOS CONSTITUINTES DA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA).

Exp.	Balanço de Massas (%) – Recuperação da FS+FI				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila	Lignina
AH-1	90,62	70,78	80,97	87,83	130,46
AH-2	96,76	58,57	97,72	69,28	133,75
AH-3	94,11	68,18	67,83	64,08	159,18
AH-4	91,31	69,62	65,60	68,89	169,39
Média PC-AH	97,17±1,63	56,63±2,26	62,85±2,12	83,12±4,63	163,89±23,45
AH-8	91,04	63,65	65,87	85,79	131,79
AH-9	84,53	65,10	54,30	89,87	122,24
AH-10	88,92	75,72	62,63	72,40	123,82
AH-11	89,12	69,63	51,63	74,50	141,74

A partir do balanço de massas descrito acima, foi possível calcular os efeitos para o planejamento A, sendo cada variável analisada separadamente, bem como em relação às interações de dois e três fatores, conforme descrito na Tabela 20.

Os efeitos calculados em relação ao rendimento de sólidos totais (FS, FI, FS+FI) revelaram que a temperatura foi a variável independente que apresentou maior efeito, influenciando tanto de forma positiva como negativa os rendimentos das frações. Por exemplo, o aumento da temperatura causou um decréscimo de 10,58 pontos percentuais (pp) na recuperação de FI e um aumento de 5,48 pp na recuperação de FS. Já os efeitos da interação de t x U aumentaram em 4,83 e 4,90 pp a recuperação de FI e FI+FS, respectivamente, ao passo que a interação t x T aumentou em 2,33 a recuperação da FS, sendo este efeito o mais significativo para esta fração. Vale ressaltar que a interação de três fatores foi significativa para os rendimentos de FI e de FS+FI (1,88 e 0,95 pp, respectivamente), demonstrando uma grande interatividade entre as variáveis para a definição da melhor condição de pré-tratamento.

TABELA 20. EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO DA FS, FI E TOTAL E PARA O BALANÇO DE MASSAS (FI+FS) DO PLANEJAMENTO A.

Planejamento A						
Efeito $2\Sigma (E^+ + E^-)/N$	Recuperação de ST			Balanço de massas		
	FI	FS	FI+FS	AnGlc	AnXyl	AnAra
	0,81 ¹	1,03 ¹	0,23 ¹	1,63 ¹	2,26 ¹	4,63 ¹
<i>Efeito principal</i>						
Tempo (t)	-1,13	1,13	0,00	-0,74	-3,85	-2,01
Temperatura (T)	-10,58	5,48	-5,10	0,13	6,26	-12,79
Umidade (U)	-5,68	5,53	-0,15	-4,80	1,74	-19,42
<i>Interação de 2 fatores</i>						
t x T	-0,98	2,33	1,35	-0,56	1,53	-4,60
t x U	4,83	0,08	4,90	-2,41	1,53	-9,27
T x U	-0,83	-0,68	-1,50	1,11	2,03	9,84
<i>Interação de 3 fatores</i>						
t x T x U	1,88	-0,93	0,95	3,91	-5,30	4,89

¹ Desvio padrão da triplicata do ponto central do planejamento

Por sua vez, a arabinose foi o carboidrato constituinte da biomassa que sofreu maiores perdas durante o pré-tratamento. Como exemplo, a temperatura e a umidade da palha causaram os efeitos mais negativos sobre o balanço de massas deste componente, diminuindo sua recuperação em 12,79 e 19,42 pp, respectivamente. A interação de dois fatores também teve grande influência sobre a recuperação da arabinose, sendo que apenas a interação da T x U foi positiva em 9,84 pp. No entanto, os efeitos mais importantes para os três principais carboidratos da biomassa (glucose, xilose e arabinose) foram os decorrentes da interação de três fatores, que foi negativo para a xilose (-5,30 pp) e positivo para a glucose e para a arabinose, aumentando as suas recuperações em 3,91 e 4,89 pp, respectivamente.

Sendo assim, os efeitos mostraram que a interação de três fatores foi significativo para quase todos os casos, com uma única exceção para a recuperação de sólidos totais na fração solúvel. Devido a isto, a interpretação dos efeitos primários e das demais interações entre eles não pôde ser realizada em maiores detalhes.

Wang *et al.* (2010) estudaram os efeitos da explosão a vapor na composição do junco para melhorar a produção de metano e relataram que o efeito da pressão de vapor e a umidade foram mais significativos que o tempo de pré-tratamento. Ewanick

e Bura (2011) relataram, para estudos de explosão a vapor do bagaço de cana catalisado com SO_2 , que a umidade teve grande impacto no rendimento final de produção de etanol, onde uma maior umidade resultou em um aumento no rendimento de etanol. No entanto, isto não se aplica para a palha de cana. Apesar do processo de secagem da amostra colapsar a estrutura da parede celular ao remover a água, a análise da composição química da fração insolúvel revela que a umidade não influenciou na solubilização das hemiceluloses. Isto provavelmente se deve à porosidade da palha que, quando pré-tratada a alta pressão de vapor, permitiu a permeação da água ao longo das fibras. Neste sentido, apesar da umidade ter exercido forte influência na recuperação de sólidos totais e no balanço de massas dos constituintes (Tabela 20), principalmente da arabinose, estes efeitos não repercutiram sob a composição química da fração insolúvel. Os experimentos com condições iguais de temperatura e tempo, diferindo apenas na umidade, apresentaram composição química muito semelhante (principalmente quanto à solubilização das hemiceluloses). Este fato, para efeito de hidrólise enzimática, é mais importante do que a recuperação de sólidos totais e dos constituintes, uma vez que a hidrólise das hemiceluloses está diretamente relacionada ao aumento da acessibilidade da celulose às enzimas.

4.2.2 Planejamento B - Catálise fosfórica

O planejamento B teve como finalidade avaliar o efeito do aumento da concentração de ácido fosfórico, juntamente com a temperatura e o tempo de permanência da biomassa no reator, sobre a recuperação dos principais componentes da biomassa da palha de cana. Os dados da Tabela 21 revelam que o aumento do tempo de residência no reator resulta em uma maior perda de material durante o processo, conforme demonstra a recuperação de sólidos totais nas frações solúvel (ST-FS) e insolúvel (ST-FI). Da mesma forma, o aumento da temperatura e da concentração de ácido fosfórico causou efeito análogo sobre o rendimento destas duas frações. No entanto, esperava-se que o rendimento da FS aumentasse proporcionalmente à diminuição do rendimento da FI, pois o uso de um catalisador ácido e o aumento da severidade do pré-tratamento favorecem a solubilização dos componentes macromoleculares da biomassa e a formação de subprodutos de desidratação dos carboidratos. Desta forma, a baixa recuperação de sólidos totais na fração solúvel deve ter sido fruto de problemas operacionais durante a realização dos

experimentos, tais como a ocorrência de perdas mecânicas e por volatilização de compostos de baixa massa molar, já que o reator não dispõe de um sistema de condensação eficiente. Além disso, parte da perda do material pode ser atribuída a finos não detectados a olho nu durante a filtração para separação das frações (solúvel e insolúvel); no entanto, esta possibilidade não deve corresponder a mais do que 2 % do total dos rendimentos de recuperação.

TABELA 21. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES.

Exp.	Condições t (min), T (°C), [H ₃ PO ₄] (mg/g)	Rendimento (%)		
		ST-FI	ST-FS	Total
AF-1	5, 180, 9,5	81,2	19,6	100,8
AF-2	10, 180, 9,5	71,3	26,7	98,0
AF-3	5, 210, 9,5	67,7	27,3	95,0
AF-4	10, 210, 9,5	50,7	11,7	62,4
Média PC-AF	7,5, 195, 14,25	68,5±8,3	21,1±4,6	89,6±4,0
AF-8	5, 180, 19	76,9	21,0	97,9
AF-9	10, 180, 19	62,6	22,9	85,5
AF-10	5, 210, 19	60,6	10,9	71,5
AF-11	10, 210, 19	51,4	9,9	61,3

O experimento que apresentou o melhor rendimento da FI foi o AF-1 (5 min, 180°C, 9,5 mg H₃PO₄), que correspondeu a um valor de 81,2 % em sólidos totais. Já para a FS, o melhor experimento foi o AF-3, que gerou um rendimento de 27,3 % em sólidos totais. Apesar da triplicata do ponto central (PC-AF) não ter apresentado uma boa repetibilidade em relação ao rendimento da FI (desvio padrão de 8,3 %), o desvio padrão para a composição química destes substratos não foi tão significativo (Tabela 22), indicando que o tratamento da biomassa na triplicata foi satisfatório e que o alto desvio padrão da recuperação de FI deve ter sido decorrente de perdas na recuperação dos substratos no reator.

TABELA 22. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.

Exp.	Composição Química FI (%)				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Lignina	Cinzas
PIN ¹	35,8±0,1	23,9±0,3	2,6±0,02	17,6±0,2	6,2±0,20
AF-1	41,9±1,0	13,1±0,2	1,0±0,02	32,2±1,9	9,9±0,1
AF-2	43,0±0,8	6,7±0,1	0,4±0,03	34,3±0,3	13,7±0,1
AF-3	49,6±0,4	2,5±0,02	nd	38,0±0,6	7,9±0,1
AF-4	44,1±0,5	1,2±0,03	nd	40,8±1,2	12,0±0,01
Média PC-AF	47,2±3,7	7,5±3,2	nd	34,7±2,2	8,4±2,5
AF-8	44,4±0,5	11,0±0,1	0,9±0,03	32,1±0,4	9,7±0,1
AF-9	47,1±0,1	6,0±0,03	0,4±0,02	34,2±0,3	10,3±0,02
AF-10	48,4±0,1	1,6±0,03	nd	37,9±0,7	10,1±0,1
AF-11	48,4±0,2	1,9±0,02	nd	39,7±0,1	7,9±0,04

¹ PIN – Composição química da palha *in natura*.

A composição química da FI (Tabela 22) revela ainda que o teor de cinzas, após o pré-tratamento, aumentou paralelamente à remoção das hemiceluloses. De forma análoga, os teores de anidroglicose e de lignina também aumentaram após o pré-tratamento, ao passo que os teores de anidroxilose e anidroarabinose diminuíram até situações em que não puderam ser quantificados. Portanto, o pré-tratamento promoveu a solubilização das hemiceluloses (fração da biomassa mais susceptível à hidrólise), que foi maior quanto mais drásticas foram as condições utilizadas nos experimentos.

Na Figura 27 encontram-se os cromatogramas dos carboidratos da análise de Klason da PIN e da fração insolúvel da palha pré-tratada (FI), tomando como exemplo o ponto central PC-AF. Pela análise dos cromatogramas, é possível observar uma diminuição considerável dos picos de xilose, arabinose e ácido acético após o pré-tratamento, ao passo que, para a glicose, a intensidade do pico aumentou. Isto está de acordo com a proposta de que o pré-tratamento promova a solubilização das hemiceluloses, tornando a celulose mais susceptível à hidrólise enzimática. No entanto, o aumento do pico da glicose não foi tão expressivo quanto se esperava pela diminuição dos picos dos outros componentes, indicando que parte da celulose pode

ter sido hidrolisada durante o pré-tratamento. De fato, esta tendência foi confirmada pelo aumento da concentração de hidroximetilfurfural nas frações solúveis em água, particularmente nas situações em que a severidade do processo foi maior.

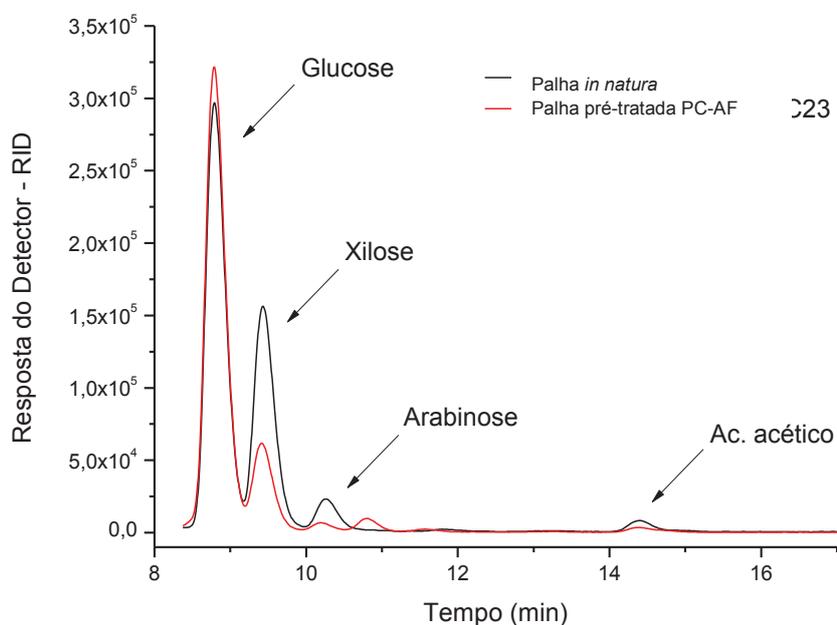


FIGURA 27. COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DA ANÁLISE DA LIGNINA DE KLASON DA PALHA *IN NATURA* E DA PALHA PRÉ-TRATADA (PC-AF).

A partir da determinação da composição química das frações insolúveis e solúveis do pré-tratamento, foi possível calcular a recuperação de cada um dos principais constituintes da biomassa da palha de cana, conforme os dados das Tabelas 23 e 24. Estas tabelas revelam que, de forma análoga ao planejamento A (auto-hidrólise), o aumento da severidade do pré-tratamento gerou um aumento na recuperação de xilose, arabinose e ácido acético na fração solúvel, ao passo que, para a fração insolúvel, esta resposta diminuiu consideravelmente, indo de 39,16 a 2,54 % para a xilose e de 26,94 % até sua remoção total (ou até níveis não detectáveis) para a arabinose. O rendimento de glucose na FI também caiu com o aumento da severidade, revelando que parte de sua estrutura (provavelmente a região amorfa) foi hidrolisada durante o pré-tratamento.

TABELA 23. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA A FRAÇÃO INSOLÚVEL DE CADA EXPERIMENTO REALIZADO.

Exp.	Fração insolúvel			
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Lignina
AF-1	94,01	39,16	26,94	131,35
AF-2	85,66	19,86	11,00	139,36
AF-3	88,37	7,52	nd	153,46
AF-4	72,49	2,47	nd	117,50
Média PC-AF	87,29±1,13	26,22±3,98	nd	134,80±8,80
AF-8	95,41	35,24	26,45	140,60
AF-9	82,54	15,69	9,00	121,87
AF-10	82,08	4,00	nd	130,80
AF-11	72,27	2,54	nd	116,31

TABELA 24. RECUPERAÇÃO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FRAÇÃO SOLÚVEL DE CADA EXPERIMENTO REALIZADO.

Exp.	Fração insolúvel			
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila
AF-1	2,37	49,77	52,63	69,67
AF-2	4,34	60,96	65,59	64,41
AF-3	5,01	68,70	71,70	68,00
AF-4	6,06	69,21	66,40	53,87
Média PC-AF	5,76±0,10	44,93±3,91	77,47±1,10	62,40±1,06
AF-8	2,79	45,38	48,90	75,47
AF-9	3,51	56,78	60,13	83,14
AF-10	3,54	67,49	66,21	77,36
AF-11	3,75	61,53	64,22	78,17

A Tabela **25** contém o fechamento do balanço de massas dos principais constituintes da biomassa e os resultados confirmam as observações realizadas anteriormente. Com o aumento da severidade do pré-tratamento, a recuperação dos carboidratos da biomassa diminuiu. Estas perdas estão diretamente relacionadas à formação de subprodutos de desidratação das hexoses e das pentoses, como o HMF e o furfural, respectivamente, os quais são inibidores das leveduras utilizadas no processo de fermentação. Apesar disto, vale ressaltar que condições mais severas podem levar a substratos mais acessíveis às enzimas, resultando em uma taxa de

conversão maior do que a de substratos tratados em condições mais brandas, apesar da menor formação de subprodutos.

TABELA 25. BALANÇO DE MASSAS DE CADA COMPONENTE PRESENTE NA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA) EM RELAÇÃO À MASSA SECA INICIAL EMPREGADA NO REATOR.

Exp.	Balanço de Massas (%) – Recuperação da FI+FS				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila	Lignina
AF-1	96,37	88,93	79,57	69,67	131,35
AF-2	89,99	80,82	76,59	64,41	139,36
AF-3	93,38	76,22	71,70	68,00	153,46
AF-4	78,55	71,68	66,40	53,87	117,50
Média PC-AF	93,06±1,18	71,15±0,40	77,47±1,10	62,40±1,06	134,80±8,80
AF-8	98,20	80,61	75,36	75,47	140,60
AF-9	86,05	72,46	69,13	83,14	121,87
AF-10	85,62	71,50	66,21	77,36	130,80
AF-11	76,02	64,06	64,22	78,17	116,31

Sabe-se que a escolha das melhores condições de pré-tratamento dependem da avaliação da susceptibilidade à hidrólise enzimática dos substratos pré-tratados, o que será discutido em outra seção deste documento. De qualquer forma, com base nos dados apresentados até então, pode-se concluir que o experimento AF-8 (5 min, 180 °C, 19 mg H₃PO₄) foi o que apresentou a maior recuperação de glucose nas frações solúvel e insolúvel, com um total de 98,2 % em relação ao teor presente originalmente na biomassa não tratada (PIN).

A partir dos dados obtidos para a recuperação de sólidos totais e do balanço de massas, foi possível calcular os efeitos que caracterizaram as variáveis do planejamento B, sendo discriminados na Tabela 26.

Os efeitos das variáveis independentes (tempo, temperatura e [H₃PO₄]) mostraram grande influência tanto na recuperação de sólidos totais quanto no balanço de massas. No entanto, o tempo e a temperatura apresentaram efeitos bastante significativo para a recuperação de ST-FS e ST-FI, diminuindo o rendimento destas frações em 12,60 e 15,40 pontos percentuais (pp), respectivamente. A interação de dois fatores foi mais influente para a recuperação de sólidos totais, principalmente na interação de t x T para FS e para FI+FS, diminuindo-as em 6,40 e 6,90 pp

respectivamente. De forma análoga ao planejamento A, a interação de três fatores foi a mais importante, sendo significativa para tanto para recuperação de sólidos totais, aumentando o rendimento de FS e FI+FS em 4,95 e 8,00 pp, respectivamente, assim como para o balanço de massas dos três constituintes analisados. A interação de t x T x C aumentou em 2,75 e 1,64 pp a recuperação total de glucose e arabinose, respectivamente, e diminuiu em 0,72 pp a recuperação de xilose.

TABELA 26. EFEITOS CALCULADOS EM PONTOS PERCENTUAIS PARA OS RENDIMENTOS DE RECUPERAÇÃO DA FS, FI E TOTAL E PARA O BALANÇO DE MASSAS DO PLANEJAMENTO B.

Planejamento B						
Efeito $2\sum (E^+ + E^-)/N$	Recuperação de ST			Balanço de massas		
	FI	FS	FI+FS	AnGlc	AnXyl	AnAra
	8,29 ¹	4,63 ¹	3,99 ¹	1,18 ¹	0,40 ¹	1,10 ¹
<i>Efeito principal</i>						
Tempo (t)	-12,60	-1,90	-14,50	-10,74	-7,06	-4,13
Temperatura (T)	-15,40	-7,60	-23,00	-9,26	-9,84	-8,03
Umidade (U)	-4,85	-5,15	-10,00	-3,10	-7,26	-4,84
<i>Interação de 2 fatores</i>						
t x T	-0,50	-6,40	-6,90	-1,48	1,07	0,48
t x U	0,85	2,35	3,20	-0,14	-0,74	0,02
T x U	1,65	-3,95	-2,30	-2,04	1,09	1,00
<i>Interação de 3 fatores</i>						
t x T x U	3,05	4,95	8,00	2,75	-0,72	1,64

¹ Desvio padrão da triplicata do ponto central do planejamento

Apesar dos efeitos calculados para o balanço de massas dos principais componentes da biomassa indicarem que a interação de três fatores foi significativa para os três componentes analisados, os efeitos mais significativos foram os principais, decorrentes das variáveis isoladas, aonde todos diminuíram a recuperação de cada componente no pré-tratamento, com destaque para a temperatura, que diminuiu em 9,26, 9,84 e 8,03 pp a recuperação de glucose, xilose e arabinose, respectivamente. Neste sentido, a análise dos efeitos revelou que temperaturas mais baixas são preferíveis para a recuperação dos principais carboidratos constituintes da biomassa da palha.

Zimbardi *et al.* (2007) estudaram o efeito da concentração de ácido sulfúrico diluído no pré-tratamento da palha de milho por explosão a vapor, utilizando uma faixa de 0-3 % de ácido, e relataram que o efeito da carga de ácido teve grande influência na solubilização e na concentração de monômeros. Já Chen *et al.* (2011) utilizaram uma concentração de ácido sulfúrico de 1 a 15 % para pré-tratar palha de arroz e concluíram que a melhor concentração foi a de 3 %, pois concentrações maiores se mostraram indesejáveis por baixar o rendimento de glucose e xilose durante o processo.

A análise dos resultados do Planejamento B, a luz dos dados de composição química das FI oriundas da palha pré-tratada a vapor mediante catálise fosfórica, revela que o efeito da concentração de ácido não foi tão influente quanto o esperado para esta variável, particularmente se comparado com outros estudos envolvendo pré-tratamento com ácidos fortes como o ácido sulfúrico. Os dados revelam que o aumento da concentração de ácido fosfórico não resultou em diferenças significativas na solubilização das hemiceluloses, indicando que as hemiceluloses residuais são mais resistentes à hidrólise ácida e o aumento da severidade do pré-tratamento, nas condições empregadas neste estudo, não foi suficiente para removê-las do material pré-tratado. Por outro lado, a diminuição do rendimento de carboidratos na FS, paralelamente ao aumento da concentração de ácido fosfórico, reflete perdas devidas à formação de subprodutos de desidratação como furfural, ácidos orgânicos e hidroximetilfurfural.

4.2.3 Planejamento C

Os dados do planejamento A (auto-hidrólise) demonstraram que a umidade exerceu influência sobre os rendimentos obtidos a partir do pré-tratamento a vapor da palha de cana. No entanto, a análise da composição química dos substratos gerados nas mesmas condições de tempo e temperatura, a partir de amostras com diferentes teores de umidade (8,4 e 29,5 %), não evidenciou diferenças significativas quanto à solubilização das hemiceluloses e a recuperação de glucose. Portanto, a umidade da matéria-prima não parece ser fator determinante para o sucesso do pré-tratamento e hidrólise enzimática da palha de cana.

Dando continuidade aos estudos de otimização do processo, os experimentos de auto-hidrólise da palha com 29,5 % de umidade foram utilizados como limite inferior

dos experimentos de catálise fosfórica (planejamento B), ou seja, como experimentos em que a concentração de ácido foi igual a zero, expandindo a base de dados e definindo um novo conjunto de experimentos. Um ponto central foi então realizado em triplicata para que fosse possível desenvolver um modelo quadrático com potencial para produzir superfícies de resposta que permitissem determinar as melhores condições de pré-tratamento, dentre aquelas investigadas neste estudo. O ponto central foi concebido para ser realizado nas condições de 7,5 min, 200 °C e 4,75 mg ácido/g de palha seca. No entanto, por problemas de ajuste no sistema operacional do reator, a temperatura registrada para o pré-tratamento neste ponto central foi de 195 °C. Naturalmente, esta diferença foi considerada nos procedimentos de modelagem quadrática dos dados experimentais. O novo conjunto de experimentos formado foi denominado Planejamento C.

Os dados obtidos para o novo ponto central (denominado PC-AHAF), em relação ao rendimento de sólidos totais, foram de $61,74 \pm 2,52$ para a FI, de $22,26 \pm 3,00$ para a FS e de $84,44 \pm 3,15$ para a recuperação total (FI+FS). Já os teores de anidrogucose, anidroxilose, lignina e cinzas na FI foram de $47,68 \pm 1,17$; $3,05 \pm 0,63$; $35,77 \pm 1,38$ e $11,43 \pm 0,42$, respectivamente, sendo que a anidroarabinose não foi detectada nos hidrolisados de Klason do material pré-tratado. Por fim, o balanço de massas de cada constituinte no ponto central foi de $87,47 \pm 1,04$ % para a anidrogucose, $76,62 \pm 0,69$ % para a anidroxilose, $69,94 \pm 1,17$ % para a anidroarabinose, $71,03 \pm 1,22$ % para o grupo acetila e $126,82 \pm 8,76$ % para a lignina.

A escolha do experimento com condições de produzir o melhor substrato foi realizada através de uma modelagem matemática do planejamento C, em relação ao balanço de massas da recuperação de glucose na fração FI e à taxa de liberação de equivalentes de glucose via hidrólise enzimática (apresentado posteriormente), revelando assim o potencial do substrato em gerar açúcares fermentescíveis para fermentação a etanol.

O modelo quadrático revelou que a recuperação de glucose na FI apresentou uma forte correlação com as três variáveis do pré-tratamento: tempo, temperatura e concentração de ácido fosfórico, cuja regressão linear, com os coeficientes α calculados, estão apresentados na Equação 10. O intervalo de recuperação de glucose, de 72,27 a 95,21 %, apresentou um elevado coeficiente de Pearson de 0,904 para a regressão linear múltipla (Figura 28), sendo considerado forte evidência para demonstrar a validade da modelagem quadrática derivada da Equação 10.

$$\text{FR} = - 8,4698 \cdot \text{tempo} + 1,2293 \cdot \text{temperatura} + 2,3931 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] + 0,1289 \cdot \text{tempo}^2 - 0,0037 \cdot \text{temperatura}^2 - 0,0030 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]^2 + 0,0282 \cdot \text{tempo} \cdot \text{temperatura} + 0,3049 \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] - 0,0093 \cdot \text{temperatura} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] - 0,0020 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]$$

Equação 10

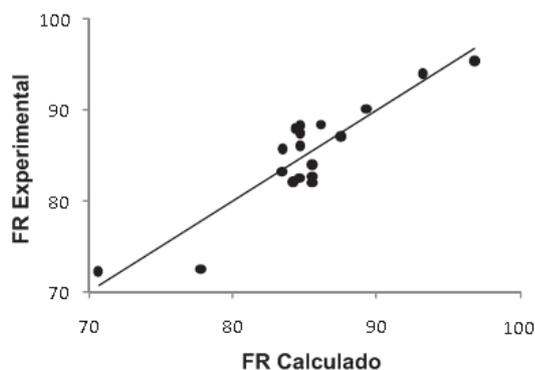


FIGURA 28. REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA PARA A RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE APÓS O PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR DA PALHA.

A partir dos dados obtidos para a recuperação de glicose, superfícies de resposta (Figura 29) foram construídas empregando a Equação 10. A análise destas superfícies permitiu prever as condições de pré-tratamento que resultaram na melhor recuperação de glicose na fração FI.

A Figura 29A mostra que menores tempos de pré-tratamento são melhores em qualquer condição de temperatura e de concentração de ácido para obter uma maior recuperação de anidroglicose, ao passo que a Figura 29B indica que menores temperaturas são desejáveis, com exceção para a auto-hidrólise e tempo de 10 min, indicando que a temperatura de 195 °C fornece o melhor rendimento. Já a Figura 29C mostra tendências opostas, pois quando utilizadas maiores temperaturas, a auto-hidrólise é favorável, ao passo que menores temperaturas requerem maior concentração de ácido fosfórico. No entanto, a utilização da última combinação resulta em melhor recuperação de glicose. Isto está associado ao fato da força ácida e da temperatura estarem diretamente relacionadas à hidrólise da celulose.

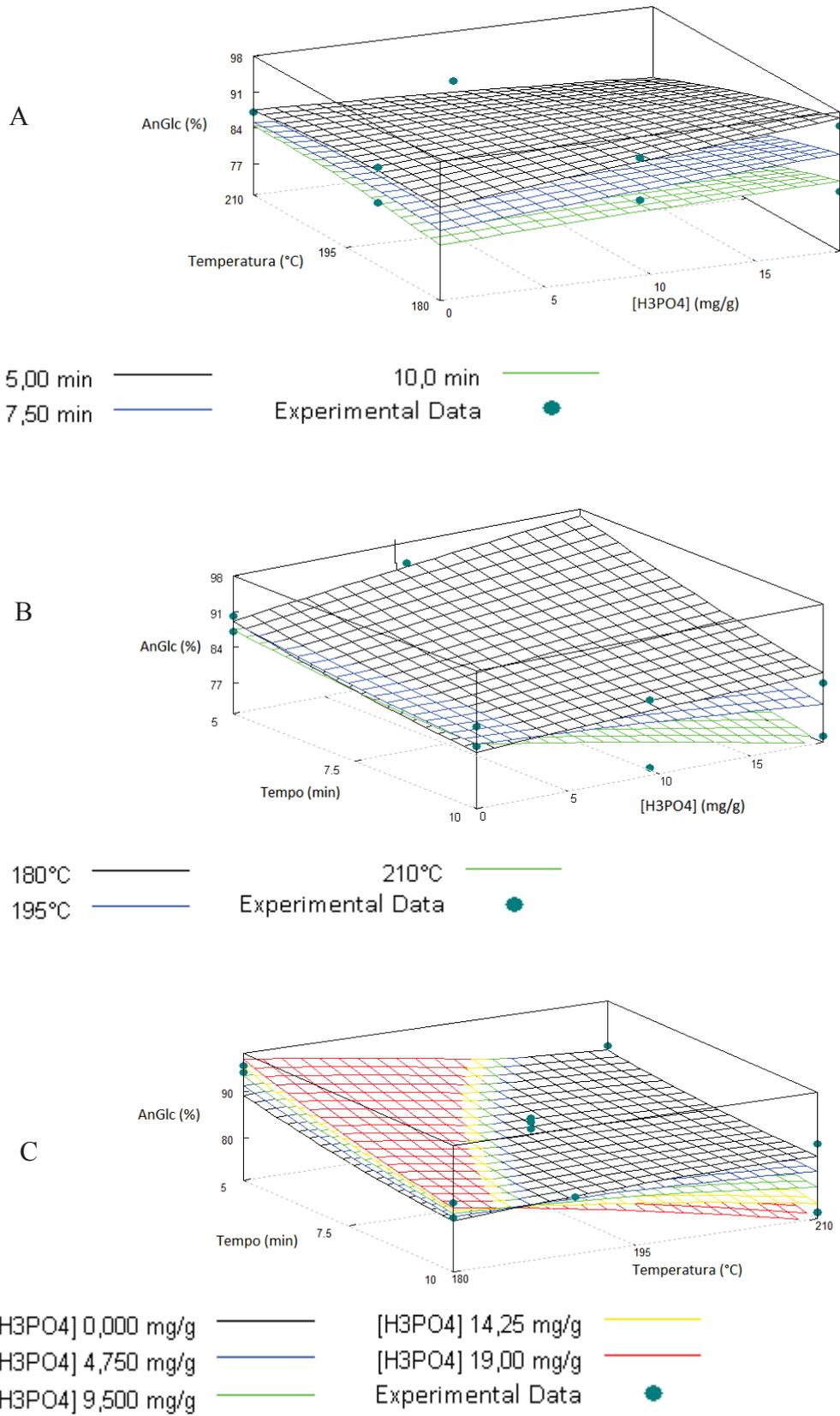


FIGURA 29. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA RELACIONANDO A RECUPERAÇÃO DE ANIDROGLUCOSE NA FI DEPOIS DO PRÉ-TRATAMENTO.

Altas temperaturas combinada com altas concentrações de ácido levaram à hidrólise e à desidratação da celulose, diminuindo a recuperação de glucose e aumentando a concentração de hidroximetilfurfural em FS. Em suma, as superfícies indicam que as condições ótimas para a recuperação de glucose seriam 5 min, 180 °C e 19 mg/g de ácido. Por outro lado, devido à proximidade das superfícies da Figura **29C**, concentrações intermediárias de ácidos também foram atraentes, além de promoverem menor produção de compostos fenólicos e de subprodutos de desidratação dos carboidratos, quando comparado a pré-tratamentos com maior severidade.

A degradação da lignina durante o pré-tratamento gera subprodutos (compostos fenólicos) que podem ser inibidores para as enzimas utilizadas na hidrólise enzimática. Para avaliar seus efeitos sobre as enzimas, os compostos fenólicos presentes nas frações solúveis do pré-tratamento foram quantificados por CLAE utilizando coluna de fase reversa (C18). No entanto, apenas a soma dos 4 (quatro) compostos fenólicos majoritários (que corresponderam entre 65-70 %) foram apresentados na Tabela **27**, sendo eles os fenólicos 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, *p*-coumárico e ferúlico.

A Tabela **27** revela que a formação de compostos fenólicos aumentou conforme aumentou a drasticidade do pré-tratamento, principalmente nos experimentos de auto-hidrólise (experimentos AH-8-11). No entanto, um dado interessante é a queda nesta formação quando se utilizou maior tempo de residência no reator (10 min) e maiores temperaturas (210 °C), indicando possíveis reações de condensação ou perdas por volatilização ou degradação.

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados nos experimentos do planejamento C a fim de obter dados sobre a acessibilidade química dos substratos. A hidrólise enzimática foi realizada sob duas condições: diretamente nos substratos após o pré-tratamento (substratos não lavados) e nos substratos lavados com água (Tabela **27**). Os objetivos desta análise foram os de identificar os substratos que ofereceram a melhor taxa de conversão da celulose, além de determinar o efeito dos possíveis inibidores presentes na fração solúvel do pré-tratamento sobre as enzimas celulolíticas (diferença ente os substratos não lavados e lavados). Desta forma, a lavagem aquosa dos substratos removeu os compostos liberados durante o pré-tratamento, tais como compostos fenólicos, ácidos orgânicos de baixa massa molar

(fórmico e acético), carboidratos (pentoses e hexoses), furfural e hidroximetilfurfural. As FI não lavadas foram identificadas como FI-NL e as FI lavadas, como FI-L.

TABELA 27. TEOR DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS NA FS, BALANÇO DE MASSAS DE GLUCOSE APÓS O PRÉ-TRATAMENTO E TAXA DE CONVERSÃO DE CELULOSE NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

Exp.	Condições t (min), T (°C), [H ₃ PO ₄] (mg/g)	Compostos fenólicos ¹ (mg/g)	AnGlc ² (%)	EqGlc HE ³ (%)	
				Não lavado	Lavado
AH-8	5, 190, 0	2,82	90,09	32,05	33,20
AH-9	10, 190, 0	4,66	83,23	46,35	53,77
AH-10	5, 210, 0	7,56	87,09	63,71	63,65
AH-11	10, 210, 0	1,94	88,00	56,26	64,03
PC-AHAF	7,5, 195, 4,75	6,67±1,05	82,89±1,0 1	66,59±2,2 3	54,87±4,56
AF-1	5, 180, 9,5	5,55	94,01	43,99	43,46
AF-2	10, 180, 9,5	7,24	85,66	62,48	53,68
AF-3	5, 210, 9,5	6,34	88,37	51,72	49,54
AF-4	10, 210, 9,5	6,22	72,49	75,48	47,45
PC-AF	7,5, 195, 14,25	4,01±1,22	87,29±1,1 3	59,58±7,8 9	57,98±7,14
AF-8	5, 180, 19	6,09	95,41	47,72	42,28
AF-9	10, 180, 19	6,42	82,54	67,24	61,36
AF-10	5, 210, 19	7,33	82,08	62,05	46,62
AF-11	10, 210, 19	3,87	72,27	75,41	44,51

¹ Soma de 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico;

² Recuperação de glucose na fração insolúvel tratada a vapor, expresso em anidroglicose (AnGlc);

³ Equivalente de glucose liberado na hidrólise enzimática, também referido como conversão da celulose, após 72 h de reação.

Os dados da hidrólise enzimática (Tabela 27) dos pré-tratamentos com e sem catálise fosfórica apresentaram tendências diferentes em relação aos substratos lavados e não lavados. Nos experimentos de auto-hidrólise, os substratos lavados atingiram maiores rendimentos de hidrólise enzimática em comparação com substratos não lavados, ou seja, os primeiros liberaram maiores porcentuais de equivalentes de glucose via hidrólise enzimática (EqGlc HE). Em contrapartida, nos experimentos com catálise fosfórica, os substratos não lavados apresentaram melhor taxa de conversão enzimática, indicando que o pré-tratamento não gerou uma inibição significativa sobre as enzimas.

A presença de açúcares livres (pentoses e hexoses), presentes na FS oriunda do pré-tratamento, foi determinada por CLAE e devidamente descontada da quantidade de açúcares liberada dos substratos não lavados por hidrólise enzimática (EqGlc EH). No entanto, sabe-se que os hidrolisados do pré-tratamento, mesmo na presença de ácido fosfórico, ainda contêm uma quantidade razoável de oligossacarídeos que não puderam ser quantificados por CLAE. Como estes oligossacarídeos podem ser facilmente hidrolisados pela ação sinérgica das enzimas presentes no meio, os substratos não lavados, que contêm glucose na forma de oligossacarídeos, apresentaram maior conversão do que os substratos lavados, ao passo que nestes substratos os oligômeros foram removidos na etapa de lavagem com água. Por outro lado, o melhor resultado de hidrólise nos substratos não-lavados também podem indicar que, sob determinadas condições, a presença do hidrolisado ácido aumentou a atividade das enzimas, induzindo a uma melhor hidrólise da celulose cristalina por razões que ainda não foram esclarecidas.

A partir dos resultados da conversão de celulose em glucose, foi realizada a modelagem quadrática para identificar as melhores condições de pré-tratamento. Este novo modelo quadrático revelou que a hidrólise enzimática da fração FI-NL foi caracterizada por uma forte correlação entre as três principais variáveis do pré-tratamento (tempo, temperatura e $[H_3PO_4]$), sendo que a taxa de EqGlc HE (equivalentes de glucose liberados na hidrólise enzimática) para esta fração ficou entre de 32,05 a 75,48 % e o coeficiente de Pearson obtido pela regressão linear foi de 0,854 (Figura 30), cujo valor é considerado forte para a modelagem quadrática derivada da Equação 11. De forma semelhante, o modelo quadrático para a FI-L (Equação 12) também foi caracterizado por uma forte correlação entre as principais variáveis do processo (Figura 31), sendo que a taxa de EqGlc HE variou de 33,20 a 64,03 % com um coeficiente de Pearson de 0,880. Com base nestes dados, fica claro que os substratos não lavados apresentaram melhor conversão de celulose em glucose via hidrólise enzimática do que os substratos lavados exaustivamente com água.

$$FR = 52,2250 \cdot \text{tempo} - 2,2042 \cdot \text{temperatura} + 17,6707 \cdot [H_3PO_4] - 1,2750 \cdot \text{tempo}^2 + 0,0105 \cdot \text{temperatura}^2 - 0,0353 \cdot [H_3PO_4]^2 - 0,1589 \cdot \text{tempo} \cdot \text{temperatura} - 1,6706 \cdot \text{tempo} \cdot [H_3PO_4] - 0,0878 \cdot \text{temperatura} \cdot [H_3PO_4] + 0,0091 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo} \cdot [H_3PO_4]$$

Equação 11

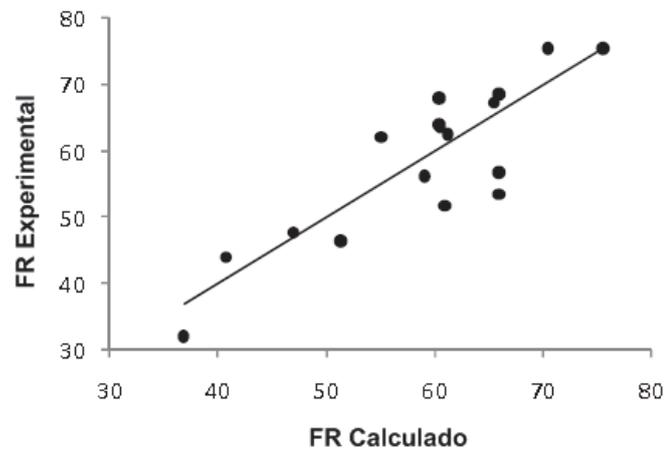


FIGURA 30. ANÁLISE DA MODELAGEM QUADRÁTICA EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS A VAPOR.

$$\text{FR} = 52,4806 \cdot \text{tempo} - 2,2355 \cdot \text{temperatura} + 12,0209 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] - 1,5813 \cdot \text{tempo}^2 + 0,0102 \cdot \text{temperatura}^2 + 0,0151 \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]^2 - 0,1357 \cdot \text{tempo} \cdot \text{temperatura} - 0,2314 \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] - 0,0612 \cdot \text{temperatura} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4] + 0,0009 \cdot \text{temperatura} \cdot \text{tempo} \cdot [\text{H}_3\text{PO}_4]$$

Equação 12

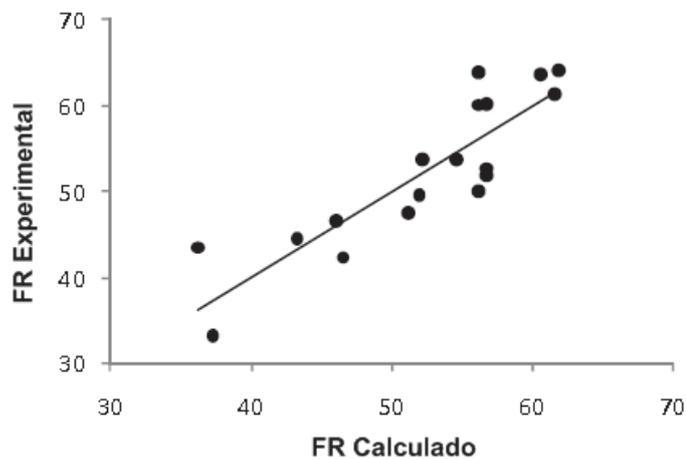


FIGURA 31. ANÁLISE DA MODELAGEM QUADRÁTICA EM RELAÇÃO À QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE SUBSTRATOS PRÉ-TRATADOS A VAPOR E LAVADOS COM ÁGUA.

As Equações 11 e 12 foram utilizadas para construir as superfícies de resposta mostradas nas Figuras 32 e 33, respectivamente. Estas superfícies de

resposta foram úteis para prever as condições de pré-tratamentos que resultaram na melhor conversão de glucose na hidrólise enzimática da FI derivada do pré-tratamento, ou seja, um indicativo das condições de pré-tratamento que foram mais efetivas para a hidrólise enzimática da celulose.

A análise das superfícies das Figuras **32A** e **33A** revelam que o pré-tratamento a 210 °C por 7,5 min promoveu melhor conversão tanto no material não lavado como no lavado. No entanto, para o material não lavado, o pré-tratamento a 180 °C por 10 min também gerou boa conversão. Já as Figuras **32B** e **33B** indicam que maiores temperaturas e maior tempo de pré-tratamento são preferíveis. Porém, a proximidade das superfícies da Figura **32B** (substrato não lavado) com 10 min revela que menores temperaturas geram conversões semelhantes, ao passo que a Figura **33B** (substrato lavado) revela que para auto-hidrólise maiores temperaturas são desejáveis enquanto que, para a catálise fosfórica, esta tendência se reverte considerando 10 min de pré-tratamento. Finalmente, a proximidade das superfícies das Figuras **32C** e **33C** confirma a hipótese de que concentrações intermediárias de ácido são mais interessantes, enquanto que a auto-hidrólise novamente requer temperatura de 210 °C.

Neste sentido, devido aos problemas inerentes ao emprego de temperaturas da ordem de 210 °C, a catálise fosfórica se desdobra como uma opção mais atraente do que a auto-hidrólise por produzir substratos mais susceptíveis à hidrólise enzimática sob menores temperaturas de pré-tratamento (180 °C). Paralelamente, concentrações intermediárias de ácido parecem ser suficientes para este mesmo fim e o tempo de pré-tratamento ideal tende a ser o ponto mais alto da escala investigada neste estudo (10 min). Portanto, a palha impregnada com 9,5 mg/g de ácido e pré-tratada a 180 °C por 10 min levou a um substrato com boa taxa de conversão tanto para substratos não lavados quanto para os lavados com água.

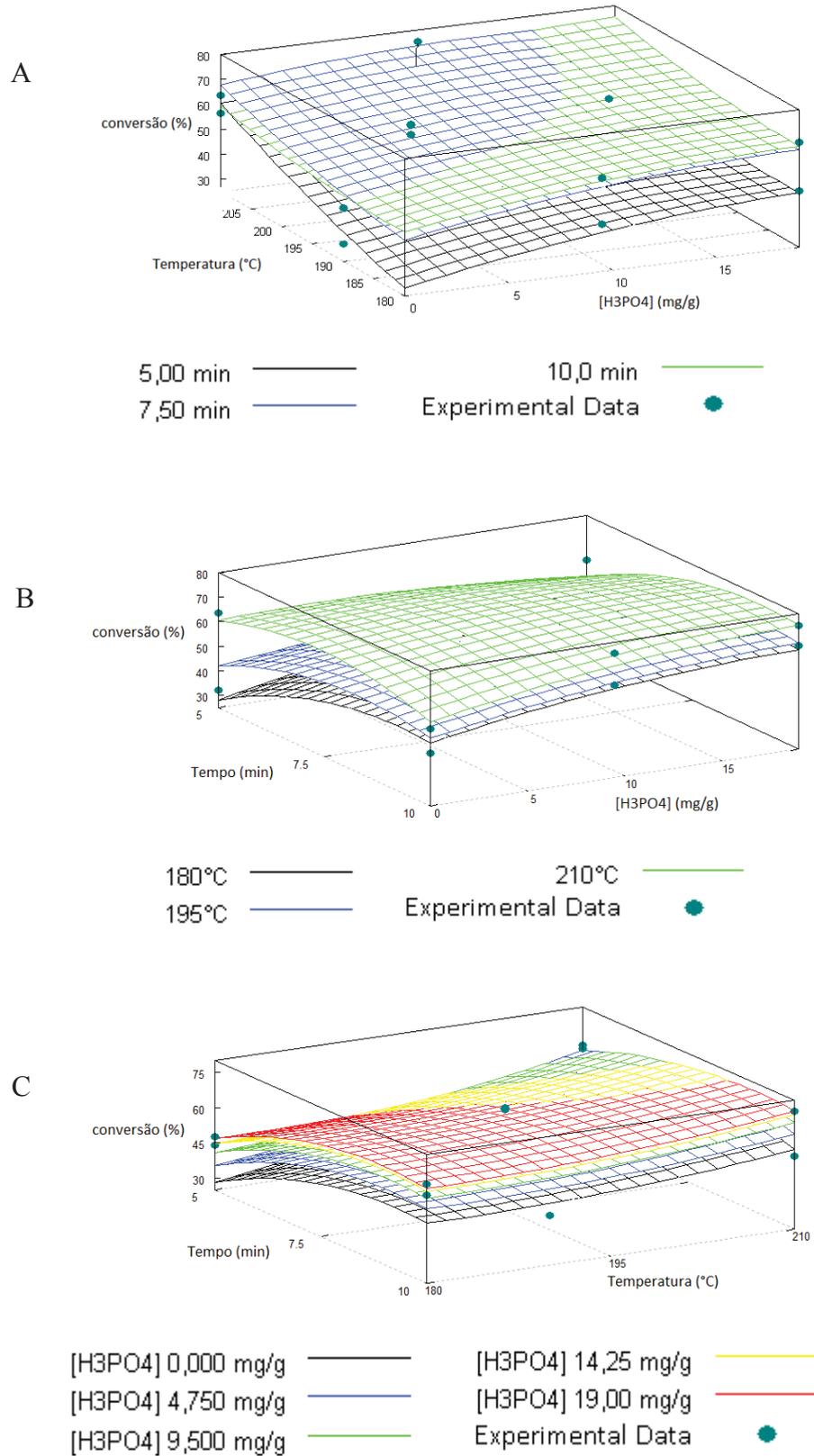


FIGURA 32. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DERIVADA DA APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO 11 SOBRE A QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA COMO RESULTADO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA PRÉ-TRATADA E NÃO LAVADA.

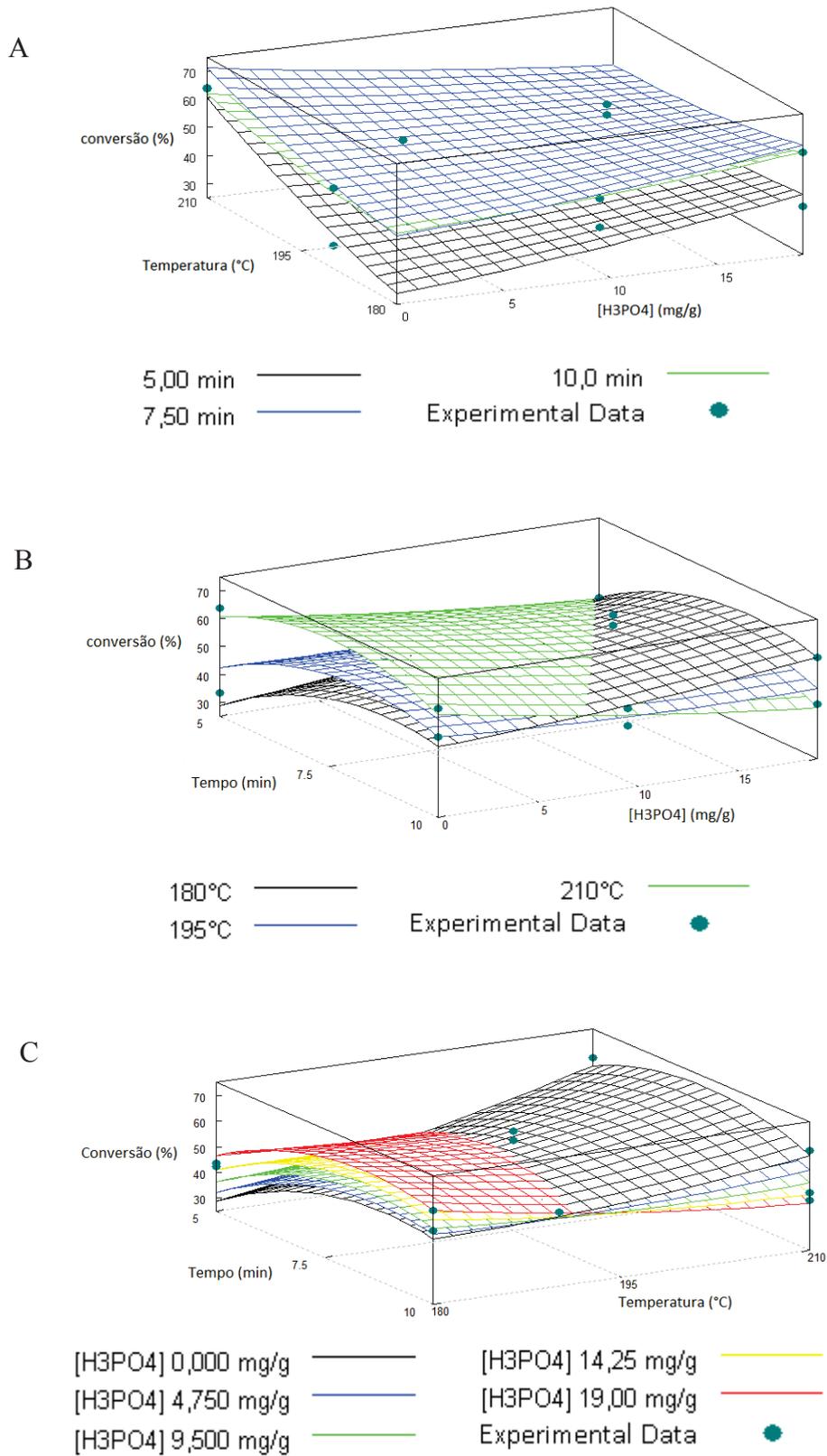


FIGURA 33. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DERIVADA DA APLICAÇÃO DA EQUAÇÃO 12 SOBRE A QUANTIDADE DE GLUCOSE LIBERADA COMO RESULTADO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA PRÉ-TRATADA E LAVADA COM ÁGUA.

4.2.4 Definição do experimento com as melhores condições

A palha de cana foi pré-tratada com sucesso por explosão a vapor, cujo foco principal era produzir substratos altamente acessíveis para a hidrólise enzimática com as melhores recuperações possíveis de açúcares fermentescíveis para a fermentação (principalmente glucose). Além disso, a interpretação estatística e a modelagem matemática da combinação dos modelos fatoriais consolidaram os dados obtidos e indicou um roteiro para possíveis trabalhos futuros.

Os dados obtidos para a hidrólise enzimática dos substratos não lavados e lavados mostrou que a concentração de carboidratos (pentoses e hexoses), liberados por hidrólise ácida durante o pré-tratamento, permaneceu em níveis não inibitórios para a atividade da enzima utilizada, Cellic CTec 2, assim como outras substâncias (compostos furânicos e ácidos orgânicos) também não estavam presentes em teores proibitivos para o ensaio. Neste sentido, a remoção destes compostos por lavagem aquosa pode não ser necessária para a produção de etanol a partir de palha de cana. Além disso, a etapa de lavagem do substrato está na contramão dos esforços da pesquisa em buscar a integração dos processos, como, por exemplo, no desenvolvimento de micro-organismos capazes de fermentar hexoses e pentoses simultaneamente (co-fermentação).

A catálise fosfórica apresentou algumas vantagens frente à auto-hidrólise, como trabalhar com condições intermediárias de severidade apresentando bons rendimentos e boa recuperação de xilose na fração solúvel, além de aumentar a susceptibilidade da celulose à sacarificação enzimática. Desta forma, para uma melhor recuperação de glucose após o pré-tratamento, a condição ideal foi definida como sendo o uso de palha impregnada com 9,5 mg/g de ácido fosfórico e pré-tratada a 180 °C por 10 min. Neste sentido, o experimento AF-2 (180 °C, 10 min, 9,5 mg/g de H₃PO₄) foi selecionado como sendo a melhor condição para o pré-tratamento a vapor da palha de cana.

4.3 Pré-tratamento da palha nas condições selecionadas

Um novo experimento, baseado nas condições de pré-tratamento do experimento AF-2 (doravante denominado AF-2*), foi realizado utilizando uma

quantidade maior de palha no reator a fim de investigar a reprodutibilidade dos resultados obtidos anteriormente em menor escala. Este substrato foi caracterizado quimicamente para investigar as modificações químicas que a estrutura lignocelulósica da palha sofre após o pré-tratamento de explosão a vapor e adicionalmente um novo ensaio de hidrólise enzimática foi realizado para avaliar a taxa de conversão de glucose em diferentes tempos de reação.

4.3.1 Recuperação de sólidos totais e balanço de massas

A recuperação de sólidos totais na fração insolúvel (ST-FI), na fração solúvel (ST-FS) e a somatória destas (ST-FI+ST-FS) estão apresentados na Tabela 28, ao passo que a Tabela 29 apresenta a composição química da fração insolúvel, sempre em comparação com os resultados obtidos no experimento AF-2.

TABELA 28. RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES INSOLÚVEIS (ST-FI), SOLÚVEIS (ST-FS) E DO TOTAL (ST-FI+ST-FS), EXPRESSOS EM SÓLIDOS TOTAIS PRESENTES EM CADA UMA DAS FRAÇÕES.

Exp.	Massa (g)	Condições	Recuperação (%)		
			ST-FI	ST-FS	Total
AF-2	386,9	10 min, 180°C, 9,5 mg H ₃ PO ₄	71,3	26,7	98,0
AF-2*	3240,0		64,7	21,3	86,0

TABELA 29. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA FRAÇÃO INSOLÚVEL APÓS O PRÉ-TRATAMENTO.

Composição química da fração insolúvel (%)						
Exp.	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila	Lignina	Cinzas
PIN	35,75±0,10	23,89±0,29	2,57±0,02	2,23±0,01	17,55±0,18	6,23±0,20
AF-2	42,95±0,76	6,65±0,10	0,40±0,03	nd	34,30±0,29	13,69±0,10
AF-2*	46,69±0,94	4,75±0,07	0,12±0,03	nd	35,86±0,07	9,43±0,88

A Tabela 28 revela que ocorreram perdas na recuperação do substrato do experimento AF-2* durante o procedimento de explosão a vapor, em comparação com o experimento AF-2. Isto levou a uma queda de 10 % na recuperação total de sólidos

totais após o pré-tratamento, provavelmente devidas a dificuldades na recuperação física das frações FI e FS. Como o novo pré-tratamento foi realizado com o dobro de carga no reator, isto também poderia ter resultado em substratos com diferente composição química. No entanto, apesar das pequenas diferenças na solubilização das hemiceluloses e no teor de anidroglicose (Tabela 29), as composições químicas dos dois experimentos foram consideradas similares. Sendo assim, o pré-tratamento foi considerado satisfatório para reproduzir o resultado obtido no experimento AF-2.

A Tabela 30 contém o balanço de massas dos principais constituintes de FI e FS. Tais dados revelam que a recuperação das pentoses no experimento AF-2* foi ainda menor que no experimento AF-2, indicando prováveis perdas da fração líquida durante o pré-tratamento e uma eventual heterogeneidade da palha de cana, revelada quando maiores quantidades desta biomassa foram utilizadas no pré-tratamento.

TABELA 30. RECUPERAÇÃO DOS CONSTITUINTES DA BIOMASSA NA FI E FS DOS EXPERIMENTOS AF-2 E AF-2*.

Exp.	Massa (g)	FI (%)				FS (%)			Grupo acetila
		AnGlc	AnXyl	AnAra	Lignina	AnGlc	AnXyl	AnAra	
AF-2	386,9	85,66	19,86	11,00	139,36	4,34	60,96	65,59	64,41
AF-2*	3240,0	84,31	12,83	1,82	131,92	3,85	41,16	34,49	62,31

O alto balanço de massas obtido para a lignina, após pré-tratamento sob as condições pré-selecionadas (Tabela 31), levou à realização de análises complementares nas palhas nativa e pré-tratada para diferenciar os seus respectivos teores em ésteres e éteres dos ácidos ferúlico e coumárico. A princípio, a forma éster destes ácidos hidroxicinâmicos, liberadas da lignocelulose por hidrólise alcalina suave, corresponde à unidades livres (não eterificadas) ligadas diretamente na estrutura das hemiceluloses, tipicamente através de enlace covalente com a arabinose (Figura 34), ligações estas conhecidas como pontes de ácidos fenólicos. Por outro lado, a forma éter corresponde à totalidade destes ácidos que se encontra envolvido na estrutura da lignina, formando ligações aril-éter do tipo β -O-4. No entanto, algumas unidades estão ligadas tanto aos carboidratos (ligação éster) como a lignina (ligação éter).

TABELA 31. BALANÇO DE MASSAS DE CADA COMPONENTE PRESENTE NA BIOMASSA APÓS O PRÉ-TRATAMENTO (COM E SEM CATÁLISE FOSFÓRICA).

Exp.	Balanço de massas (FI+FS) (%) – Recuperação na FI+FS				
	AnGlc	AnXyl	AnAra	Grupo acetila	Lignina
AF-2	90,00	80,82	76,59	64,41	139,36
AF-2*	88,16	53,99	36,31	62,31	131,92

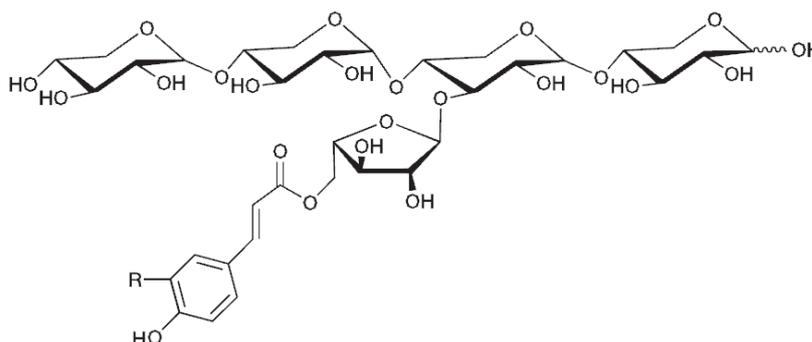


FIGURA 34. ÁCIDOS FERÚLICO E COUMÁRICO LIGADOS À ARABINOSE EM UMA CADEIA DE ARABINOXILANA (R = H, OCH₃).

A Figura 35 mostra os dados obtidos na análise, indicando que a forma éster dos dois compostos fenólicos quantificados diminuiu após o pré-tratamento. Estes resultados significam que parte das pontes de ácidos fenólicos (ferúlico e *p*-coumárico) resistiu ao pré-tratamento, provavelmente devido ao fato de participarem da estruturas pouco acessíveis que se encontravam fortemente associadas às fibras. Por outro lado, a Figura 35 ainda revela que a forma éter diminuiu mais significativamente após o pré-tratamento, sendo que esta queda é decorrente da quebra das ligações aril-éter da estrutura da lignina, liberando compostos fenólicos no meio. Como a concentração destas unidades foi bastante significativa nas palhas nativa e pré-tratada, é possível que os altos rendimentos de lignina após o pré-tratamento tenham sido parcialmente devidos à condensação destes compostos fenólicos entre si e sobre a estrutura da lignina presente no substrato, possivelmente através de outras ligações que não as do tipo aril-éter. No entanto, como já discutido anteriormente, outra hipótese para a obtenção de taxas de recuperação de lignina superiores a 100% é a condensação dos compostos de degradação dos açúcares

sobre a estrutura da lignina, além de eventuais erros experimentais nos procedimentos de análise gravimétrica.

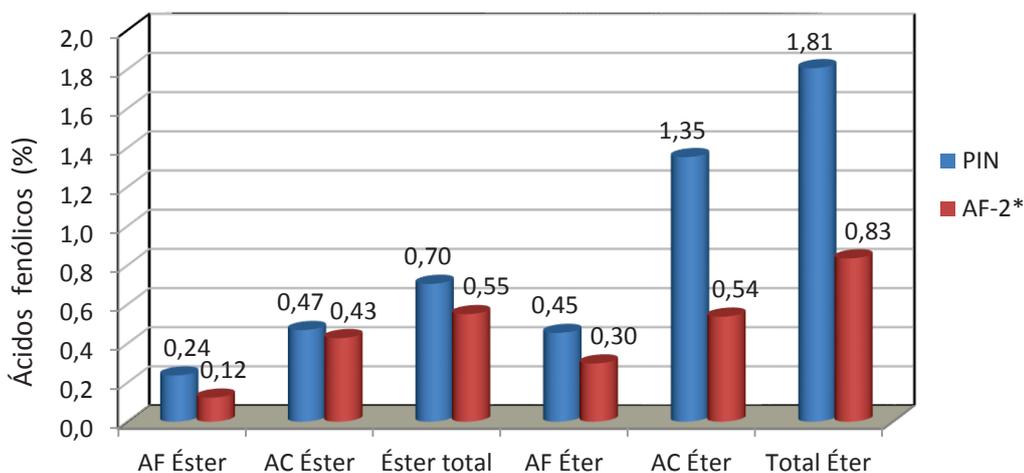


FIGURA 35. TEORES DOS ÉSTERES E ÉTERES DOS ÁCIDOS FERÚLICO (AF) E COUMÁRICO (AC) NA PALHA *IN NATURA* (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*), EXPRESSOS EM RELAÇÃO À MASSA SECA DO MATERIAL DE ORIGEM.

4.3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos liberados no experimento AF-2* foram identificados por CG-EM pelo interesse que despertam para as etapas de hidrólise e, particularmente, de fermentação (Tabela 32). No total, 11 (onze) monolignóis foram detectados (Figura 36), sendo que destes apenas três estão presentes na cadeia de biossíntese da lignina, sendo eles os ácidos *p*-coumárico, cafeico e ferúlico. Os demais compostos fenólicos (4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído e os ácidos gálico, *m*-coumárico, vanílico, *o*-coumárico e siringico) foram resultados de reações de hidrólise, de clivagem homolítica ou de oxidação de subestruturas da lignina.

Os quatro compostos fenólicos quantificados anteriormente por CLAE, como parte dos estudos de hidrólise enzimática, foram agora identificados e quantificados por CG-EM e totalizaram 5,49 mg/g, o que representa uma diferença significativa ao quantificado anteriormente (7,24 mg/g). Isto foi atribuído a necessidade de derivatização dos compostos fenólicos para a análise por CG-EM, que pode ter implicado em perdas. Apesar disto, as análises por CG-EM foram de suma importância para confirmar as estruturas dos compostos fenólicos presentes na fração solúvel.

TABELA 32. COMPOSTOS FENÓLICOS LIBERADOS NO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA NO EXPERIMENTO ÓTIMO.

Componentes fenólicos	T _R (min)	Principais fragmentos de EM (abundância)	AF-2* (mg/g)
4-hidroxibenzaldeído	4.54	121(99.9); 122(81.3); 65(48.2); 93(46.0); 39(43.2)	1,09±0,01
Ácido gálico	4.77	170(99.9); 153(89.8); 125(18.3); 135(8.7); 171(7.7)	0,56±0,01
Vanilina	5.34	151(99.9); 152(92.9); 81(30.5); 109(23.1); 123(18.5)	0,58±0,02
Ácido <i>m</i> -coumárico	7.31	122(99.9); 121(81.3); 65(48.2); 93(46.0); 39(43.2)	0,63±0,01
Ácido vanílico	7.59	168(99.9); 153(55.9); 97(27.5); 125(22.7); 151(14.2)	0,20±0,01
Siringaldeído	8.46	182(99.9); 181(50.5); 111(17.1); 167(15.4); 139(12.6)	1,00±0,01
Ácido <i>p</i> -coumárico	9.07	164(99.9); 147(59.7); 163(51.7); 119(24.2); 91(19.4)	2,61±0,01
Ácido <i>o</i> -coumárico	9.28	164(99.9); 147(59.7); 163(51.7); 119(24.2); 91(19.4)	0,70±0,01
Ácido siríngico	9.42	198(99.9); 183(29.4); 127(24.2); 109(16.5); 53(11.3)	0,06±0,01
Ácido cafeico	9.52	180(99.9); 134(40.2); 135(38.9); 163(30.5); 89(17.2)	0,98±0,01
Ácido ferúlico	9.72	194(99.9); 179(18.9); 133(13.5); 195(11.0); 177(0.85)	0,79±0,01
Total de componentes fenólicos			9,20

Os ácidos siríngico, vanílico e 4-hidroxibenzóico são resultados da hidrólise de ligações β -O-4 (enlace aril-éter) seguido por oxidação do carbono α do aldeído aromático, como o siringaldeído, a vanilina e o 4-hidroxibenzaldeído, respectivamente. A presença dos ácidos *o*-coumárico e *m*-coumárico foram inesperados, uma vez que estes ácidos hidroxicinâmicos não são comumente encontrados como parte da estrutura ou mesmo como resultado da degradação da lignina. Por outro lado, os ácidos *p*-coumárico e ferúlico são derivados de monolignóis típicos como, respectivamente, o *p*-coumaraldeído e o coniferaldeído, assim como o ácido sinápico

seria derivado do sinapaldeído. Entretanto, este último composto não foi detectado dentre os compostos fenólicos derivados da palha pré-tratada.

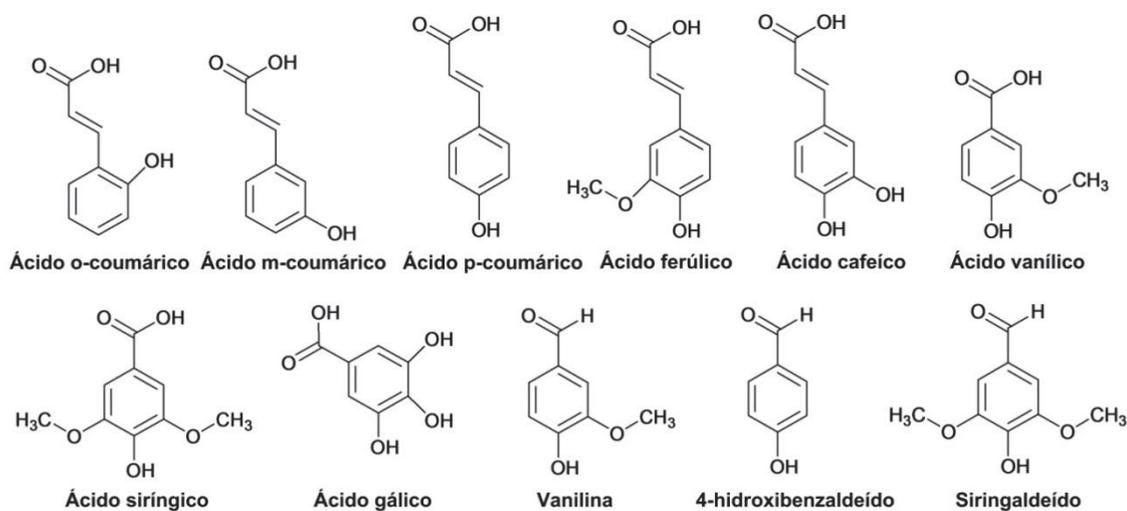


FIGURA 36. ESTRUTURA DOS COMPOSTOS FENÓLICOS IDENTIFICADOS NA FS DERIVADA DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA POR CG-EM.

Finalmente, o ácido gálico deve ser resultado da desmetoxilação do ácido siríngico. Outra possibilidade de sua formação estaria baseada no ataque nucleofílico de uma molécula de água na posição 4 do anel aromático de subestruturas coniferílicas desmetoxiladas.

4.4 Caracterização química do substrato

A partir do substrato obtido nas condições ótimas, uma série de análises foi realizada a fim de investigar os efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura e composição química da parede celular. O substrato selecionado foi caracterizado segundo as mesmas análises realizadas com a palha *in natura*, conforme descrito nas seções anteriores desta dissertação.

4.4.1 Cinzas

O teor de cinzas da palha pré-tratada (AF-2*), obtido por calcinação a 525 °C, foi de 9,43 %, revelando um aumento significativo em relação ao teor na palha *in*

natura (6,23 %). Este aumento foi parcialmente devido à remoção das hemiceluloses, que causou um aumento proporcional no teor de cinzas do material pré-tratado. No entanto, alterações na composição química destas cinzas revelaram particularidades inerentes ao pré-tratamento propriamente dito.

As cinzas obtidas na calcinação a 900 °C foram analisadas por fluorescência de raios-X a fim de se obter a nova composição inorgânica da biomassa pré-tratada (Tabela 33).

TABELA 33. ÓXIDOS PRESENTES NAS CINZAS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR, EXPRESSOS EM RELAÇÃO À MASSA TOTAL DE CINZAS, EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS OBTIDOS PARA A PIN.

Oxido	PIN (%)	AF-2* (%)
CaO	14,68±0,05	4,45±0,07
MgO	4,55±0,04	0,20±0,01
SiO ₂	51,17±0,25	50,10±0,28
Al ₂ O ₃	6,62±0,05	19,05±0,21
Fe ₂ O ₃	5,76±0,02	14,10±0,14
Na ₂ O	0,18±0,01	nd
K ₂ O	6,22±0,01	0,80±0,14
SrO	0,10±0,00	<0,10
TiO ₂	1,97±0,01	5,45±0,07
MnO	0,37±0,00	0,20±0,01
P ₂ O ₅	2,02±0,01	3,75±0,07
SO ₃	nd	0,30±0,01
Perda ¹	0,64±0,00	1,53±0,01
Total	94,28	99,93

¹ Perda inerente ao fogo (perda ao fogo)

A Tabela 33, que contém os teores dos principais óxidos presentes nas cinzas, comparativamente com os resultados obtidos para a palha *in natura*, revela uma diminuição considerável nos teores dos óxidos básicos (CaO, MgO e K₂O), fato devido à parcial neutralização destes componentes pelo ácido fosfórico diluído ou por ácidos orgânicos como o ácido acético, que é liberado das hemiceluloses pela hidrólise do grupo acetila presente em sua estrutura. Esta característica da biomassa foi referida neste trabalho como sua capacidade tamponante, a qual pode comprometer a eficiência da catálise ácida. Com a remoção destes óxidos, a presença relativa dos

demais aumentou, com exceção do SiO₂. Após o pré-tratamento, parte da sílica presente na palha é liberada das fibras, sendo parcialmente perdida durante o processo.

4.4.2 Carboidratos

Para a melhor caracterização dos polissacarídeos presentes no material pré-tratado, uma extração de holocelulose foi realizada, obtendo-se um percentual de 57,40 % ao passo que, para a palha *in natura*, este teor foi de 77,71 %. Tal decréscimo do teor de holocelulose no material pré-tratado é resultado da hidrólise parcial dos polissacarídeos presentes na palha durante o pré-tratamento, sendo que as fibras pré-tratadas são constituídas basicamente de 45 % de celulose, 35 % de lignina e apenas 4 % de hemiceluloses, ao passo que o teor inicial de hemiceluloses era de 23 %. Além disso, oligômeros formados durante o pré-tratamento, que remanesceram insolúveis nas fibras pré-tratadas, podem ter sido facilmente removidos durante o tratamento oxidativo para extração da lignina.

A Tabela 34 contém a composição química da holocelulose, sendo possível observar o aumento expressivo no teor de anidroglicose após a remoção das hemiceluloses durante o pré-tratamento. Desta forma, as extrações das hemiceluloses A e B não foram realizadas devido aos seus baixos teores nas fibras pré-tratadas e deslignificadas. Além disso, de forma análoga à palha *in natura*, nem toda a lignina presente na biomassa pode ser removida por extração oxidativa com clorito de sódio.

TABELA 34. PORCENTUAL MÁSSICO DOS CONSTITUINTES DA HOLOCELULOSE DA PALHA *IN NATURA* (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*).

Componente	PIN	AF-2*
Anidroglicose	49,26±0,21	79,27±0,39
Anidroxilose	26,05±0,07	2,45±0,52
Anidroarabinose	4,45±0,01	nd
Grupos acetila	2,67±0,06	nd
Lignina insolúvel	2,13±0,08	5,93±1,11
Lignina solúvel	0,23±0,02	1,35±0,15
Total	84,79	89,00

O efeito do pré-tratamento sobre o índice de cristalinidade da celulose (Tabela 35) foi determinado por difração de raios X (DRX) das fibras pré-tratadas e da fração holocelulósica delas derivadas (fibras parcialmente deslignificadas).

TABELA 35. ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR.

Fração	Palha (ICr, %)
Palha <i>in natura</i>	62,4
Holocelulose	74,9
Palha após o pré-tratamento	
Substrato AF-2*	78,3
Holocelulose AF-2*	78,0

A Tabela 35 revela que, após o pré-tratamento, o índice de cristalinidade da celulose pré-tratada aumentou em comparação com a palha *in natura*. Como discutido anteriormente para os carboidratos da palha de cana, tratamentos químicos podem promover uma reorganização estrutural da celulose nativa em outros arranjos cristalinos, com maior ou menor índice de cristalinidade. Já os índices de cristalinidade do material pré-tratado e de sua holocelulose foram semelhantes entre si, indicando que, após a extração das hemiceluloses durante o pré-tratamento, a celulose manteve a estrutura cristalina adquirida após o pré-tratamento a vapor. O aumento no índice de cristalinidade em caule de *Lespedeza crytobotrya* pré-tratadas a vapor foi anteriormente relatado por Wang (2009) e atribuído a uma deslocalização da celulose paracristalina e amorfa, previamente hidrolisada, para a região cristalina. Por outro lado, o aumento do índice de cristalinidade pode ter sido decorrente do preparo de amostras para análise, pois o DRX exige amostras secas cujos polissacarídeos podem sofrer modificações em sua estrutura durante a eliminação das moléculas de água, particularmente para oligômeros de menor massa molar (NAZHAD *et al.*, 1995).

A Figura 37 mostra o perfil das análises por DRX da palha *in natura* e do material pré-tratado, juntamente com suas respectivas holoceluloses. O perfil destas análises revela que o pré-tratamento não foi capaz de gerar estruturas supramoleculares diferentes. Além disso, a presença da lignina em algumas amostras, como na palha *in natura* e na palha pré-tratada, não comprometeu a realização das análises.

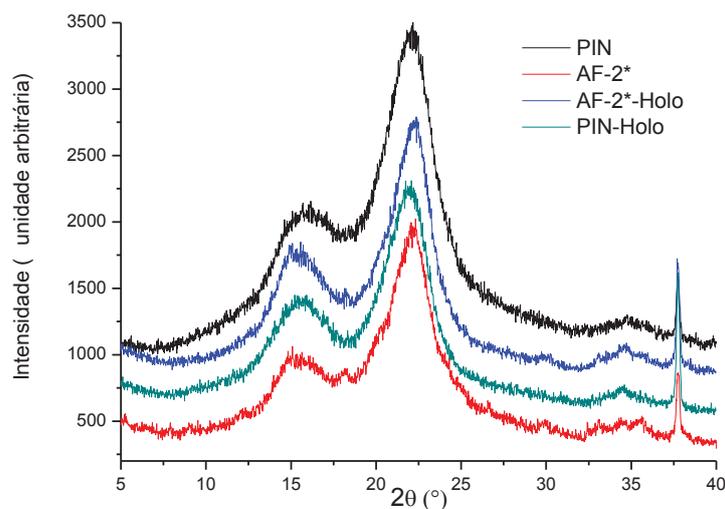


FIGURA 37. DIFRAÇÃO DE RAIOS X DA PALHA *IN NATURA* (PIN), DA PALHA PRÉ-TRATADA (EXPERIMENTO AF-2*) E DE SUAS RESPECTIVAS HOLOCELULOSES (PIN-HOLO E AF-2*-HOLO).

A determinação do grau de polimerização (GP) da celulose pré-tratada foi obtida por cromatografia de permeação em gel (CPG) de seus derivados tricarbamilados, preparados a partir do substrato AF-2* antes e depois da deslignificação com clorito de sódio (Tabela 36).

O pré-tratamento com catálise fosfórica teve grande influência no GP das fibras da palha, produzindo substratos com massas molares médias bastante inferiores em relação aos materiais de origem. O GP da palha pré-tratada não deslignificada apresentou um GP três vezes inferior quando comparado à palha *in natura*, ao passo que o GP da hemicelulose do substrato pré-tratado foi a metade da hemicelulose da palha *in natura*. No entanto, a remoção das hemiceluloses e a hidrólise parcial da lignina também podem ter provocado esta diminuição no GP das fibras após o pré-tratamento. Por outro lado, considerando que a hemicelulose da AF-2* é composta basicamente por celulose, é possível observar uma diminuição no seu GP quando comparado a α -celulose (obtida no processo de obtenção da hemicelulose e extração de suas frações) ao passo que a polidispersividade aumentou, indicando uma despolimerização da celulose o que torna suas fibras mais acessíveis à hidrólise enzimática.

TABELA 36. GRAU DE POLIMERIZAÇÃO E POLIDISPERSIVIDADE DOS POLISSACARÍDEOS DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR DETERMINADOS POR CPG, ANTES E DEPOIS DO PRÉ-TRATAMENTO A VAPOR.

Amostra	MM_M¹	GP_M²	MM_N³	GP_N⁴	PD⁵
PIN	1.095.903±51.106	2.112±98	976.852±43.560	1.882±84	1,12
	388.694	748	50.083	96	
	344.278	663	45.029	86	
AF-2*	367.811	708	53.768	103	7,28
	345.608	665	45.932	88	
	356.098	686	52.774	101	
Média	360.498±18.389	694±35	49.517±3.936	98±46	
Holocelulose PIN	662.791±3.080	1.277±6	300.711±870	579±2	2,20
α-Celulose PIN	406.409±11.687	783±23	159.137±3.855	306±7	2,52
	286.638	517	81.271	156	
	351.624	735	94.895	183	
Holocelulose AF-2*	359.125	692	82.449	158	3,88
	296.489	519	82.400	159	
	357.811	708	83.768	161	
Média	330.337±35.679	634±69	84.957±5.625	163±11	

¹ MM_M, massa molar média

² GP_M, grau de polimerização baseado na MM_M

³ MM_N, número molar médio

⁴ GP_N, grau de polimerização baseado na MM_N

⁵ PD, polidispersividade (PD = DP_M/DP_M)

A análise da polidispersividade da Tabela 36 mostra ainda que o pré-tratamento levou a um aumento expressivo nesta medida, indicando que a reologia e a distribuição em massas molares, após o pré-tratamento, é muito mais heterogênea do que aquela observada no material *in natura*.

A Figura 38 mostra a razão molar entre os três principais monossacarídeos da palha de cana, obtida da análise de seus derivados per-acetilados por CG-EM. Nestes dados, é possível observar a diferença na razão molar existente antes e após o pré-tratamento. A remoção das hemiceluloses fez aumentar a razão molar de anidroglicose em relação aos seus constituintes, passando de 13,73:9,19:1,00 (AnGlc:AnXyl:AnAra) para 16,71:4,22:1,00. É interessante observar que a razão molar AnXyl:AnAra da palha *in natura* era de 9,19:1 e que esta passou para 4,22:1,00 após

o pré-tratamento, indicando que a arabinose está mais fortemente associada as fibras de celulose do que a xilose.

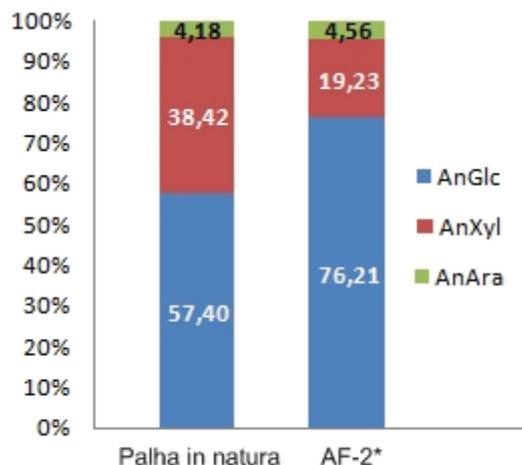


FIGURA 38. RAZÃO MOLAR DOS MONOSSACARÍDEOS DA PALHA *IN NATURA* E DO AF-2* QUANTIFICADOS POR CG-EM (DERIVADOS PER-ACETILADOS).

4.4.3 Lignina dioxano

A caracterização da lignina foi realizada a partir de sua extração por acidólise com dioxano:HCl 2 mol/L. A Tabela 37 mostra o rendimento da extração, assim como a composição química da lignina dioxano e das fibras resultantes após a deslignificação. O rendimento da extração da amostra AF-2* foi inferior à da palha *in natura* em aproximadamente 20 %, indicando a existência de diferenças estruturais entre estas ligninas, provavelmente devidas à condensação de compostos fenólicos e de compostos furânicos formados durante o pré-tratamento.

Diferentemente da lignina dioxano do material *in natura*, a lignina dioxano pré-tratada apresentou um teor de 0,78 % de anidroxilose ao passo que toda a arabinose foi removida durante o pré-tratamento. Como discutido anteriormente, a razão de 0,85:1 de AnXyl:AnAra na lignina dioxano, antes do pré-tratamento, indicou que a arabinose está mais associada à lignina do que a xilose. No entanto, o pré-tratamento foi severo o suficiente para quebrar esta associação, removendo a arabinose e deixando apenas uma pequena parcela de xilose associada ao complexo lignina-carboidrato remanescente, provavelmente devido a sua maior abundância na estrutura lignocelulósica. Além disso, a extração foi considerada eficiente por promover uma lignina dioxano com baixa contaminação de carboidratos, o que é

desejado para sua caracterização. Já as fibras deslignificadas do substrato AF-2*, devido ao baixo rendimento da extração da lignina no processo, apresentaram um teor maior de lignina insolúvel em meio ácido do que as fibras deslignificadas oriundas do material *in natura*.

TABELA 37. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO E DAS FIBRAS DESLIGNIFICADAS POR ACIDÓLISE DA PALHA *IN NATURA* E DO EXPERIMENTO AF-2*.

Componente	Composição da lignina dioxano (%)		Composição das fibras extraídas (%)	
	PIN	AF-2*	PIN	AF-2*
Anidroglicose	nd	1,91±0,01	78,86±0,28	72,90±0,35
Anidroxilose	0,35±0,04	0,78±0,01	9,75±0,19	1,99±0,10
Anidroarabinose	0,41±0,06	nd	nd	nd
Grupo acetila	nd	nd	nd	nd
Lignina solúvel em ácido	1,34±0,33	3,45±0,05	1,21±0,07	0,84±0,02
Lignina insolúvel em ácido	83,97±1,85	87,36±0,16	6,45±1,26	16,64±0,72
Cinzas	nd	nd	3,68±0,12	8,08±0,35
Total	86,30	93,50	91,01	99,95
Rendimento ¹	68,95±0,22	49,17±0,45	--	--

¹ Rendimento da lignina extraída com dioxano:HCl em relação ao teor de lignina de Klason do material de origem

A Tabela 38 contém o teor dos grupos funcionais medidos na estrutura das ligninas dioxano. O pré-tratamento promoveu a quebra das cadeias alifáticas das unidades hidroxicinâmicas da estrutura da lignina, principalmente pela cisão de ligações aril-éter, gerando compostos aromáticos α -carbonílicos na fração solúvel (FS) do pré-tratamento, tais como o 4-hidroxibenzaldeído. Em consequência desta quebra, um pequeno decréscimo foi detectado no teor de hidroxilas alifáticas destas macromoléculas. Já a diminuição significativa do teor de hidroxilas fenólicas é decorrente da hidrólise dos monolignóis terminais da estrutura da lignina, gerando fragmentos de menor massa molar, incluindo os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados, presentes na fração solúvel do pré-tratamento conforme demonstrado anteriormente. O aumento do teor de carbonilas também está relacionado à quebra das ligações da porção alifática dos ácidos hidroxicinâmicos. Esta quebra é resultado

de um ataque nucleofílico de uma molécula de água na ligação dupla da cadeia alifática, resultando em estruturas α -carbonílicas que permanecem ligadas à estrutura da lignina.

TABELA 38. GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NA ESTRUTURA QUÍMICA DA LIGNINA DIOXANO DA PALHA *IN NATURA* E PRÉ-TRATADA.

Componente	Lignina dioxano (%)	
	PIN	AF-2*
Hidroxilas fenólicas	1,05±0,04	0,36±0,04
Hidroxilas alifáticas	5,47±0,28	4,84±0,12
Hidroxilas totais ¹	6,52	5,20
Carbonilas	0,15±0,01	1,50±0,08
Grupos ácidos	0,25±0,04	0,18±0,03
Carbonos aromáticos	77,0(85,4)	89,1
Grupos metoxilas ²	14,9	11,3

¹ Somatório de hidroxilas fenólicas e alifáticas

² Integração da região 3,5-4,0 ppm do espectro de RMN de ¹H

A análise por RMN de ¹H das ligninas dioxano per-acetiladas revelou mudanças significativas em sua estrutura, quando comparados os resultados da palha *in natura* com os oriundos dos substratos pré-tratados (Figura 39). Através da intensidade dos deslocamentos químicos observados nos espectros, foi possível observar uma alteração significativa em três regiões, sendo elas atribuídas a H em carbono saturado não oxigenado (0,00-1,50 ppm), H em grupos metoxilas (3,50-3,90 ppm) e H aromáticos tanto em carbonilas α como na fração alquila de estruturas aromáticas (6,20-7,40 ppm). As diferenças de intensidade destes sinais na lignina pré-tratada (Tabela 39) estão relacionadas à sua desmetoxilação e despolimerização pela hidrólise das ligações aril-éter do tipo β -O-4, aumentando assim a presença de monolignóis e de compostos fenólicos na fração solúvel do pré-tratamento, conforme a identificação e quantificação relatadas no item 4.3.2.

O sinal em 6,20-7,40 ppm fornece uma medida direta da condensação da lignina, pois quanto menor a intensidade deste sinal, menor será a quantidade de H em estruturas aromáticas, indicando que tais posições estariam associadas a outras unidades, tanto em sua porção alifática, através de ligações do tipo β -5', β -2', α -2', β -6', como com a porção aromática, através de ligações do tipo 5-5', 2-O-4', 3-O-4'.

Neste sentido, a diminuição da intensidade deste sinal revela que a lignina da palha foi intensamente modificada pelo pré-tratamento, apresentando maior grau de condensação quando comparada à lignina da palha *in natura*. Outro dado que corrobora este fato é a diminuição dos grupos metoxilas, que é decorrente da eliminação de monolignóis metoxilados e do rearranjo e subsequente reação destas unidades com outras estruturas disponíveis no meio.

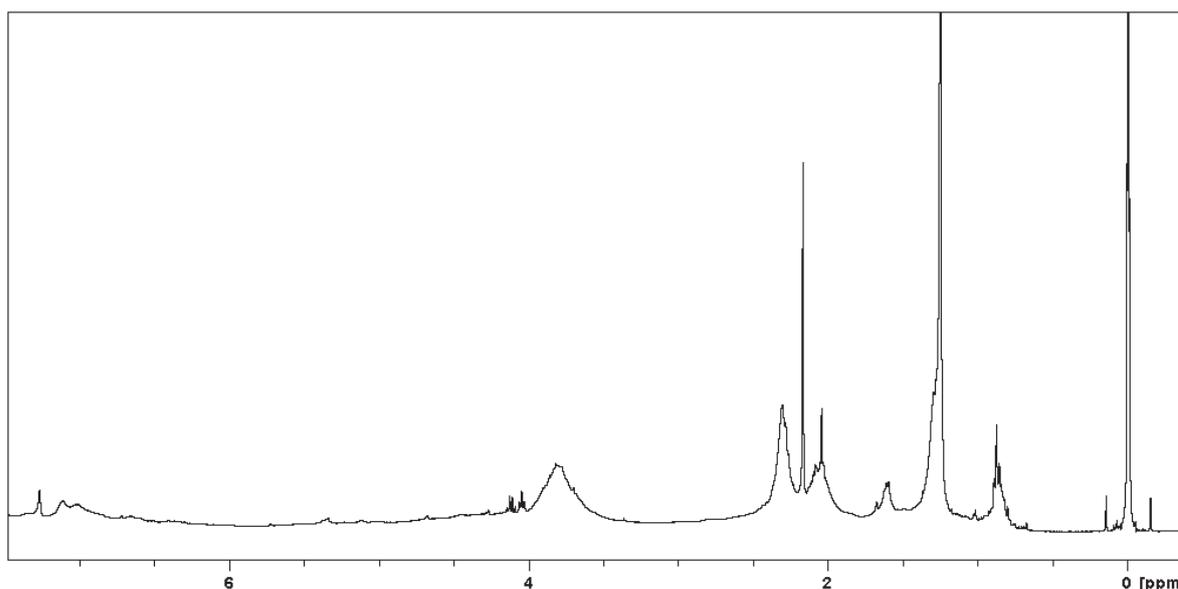


FIGURA 39. ESPECTRO DE RMN DE ^1H 400 MHZ DA LIGNINA DIOXANO ACETILADA DA PALHA EM CDCl_3 .

TABELA 39. DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H DAS LIGNINAS DIOXANO PER-ACETILADAS ORIUNDAS DAS PALHAS NATIVA (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*).

Atribuições	δ ppm/TMS ^{1,2}	% na lignina	
		PIN	AF-2*
H em carbono saturado não oxigenado	0,00-1,50	13,9	26,3
Acetato alifático	1,50-2,20	16,6	16,4
Acetato aromático	2,20-2,50	10,1	12,4
H em grupo metoxila	3,50-3,90	19,3	13,2
H β em β -O-4; β -5, β -1 e estruturas β - β	3,90-4,50	7,1	6,1
H β em β -O-4; H γ em Ar-CH=CH-CH ₂ OAc	4,50-5,20	5,8	5,0
H α de α OAc em estruturas β -O-4, β -5 e β -1	5,20-5,75	3,3	2,9
H-Ar em Ar-COR e Ar-R	6,20-7,90	23,9	17,9

¹ Dence e Lin, 1992.

² Chen, 1988.

O aumento de intensidade do sinal entre 0,00 e 1,50 ppm significa que a lignina da palha pré-tratada apresenta um teor de hidrogênios em cadeias laterais alifáticas saturadas superior ao da lignina da palha *in natura*, podendo ser atribuído a ocorrência de contaminações parciais com substâncias extraíveis como ceras e ácidos graxos. Na palha *in natura*, a extração da lignina é realizada a partir da biomassa livre de extraíveis, removendo estes interferentes.

O pré-tratamento não apresentou grande influência sobre a massa molar média da lignina, como pode ser observado nos resultados da Tabela 40. Este comportamento não era esperado uma vez que a hidrólise e despolimerização da estrutura da lignina, liberando compostos fenólicos no meio, provavelmente acarretariam em uma diminuição substancial em sua massa molar. Uma explicação para este fenômeno seria a condensação de compostos furânicos e ácidos orgânicos (inclusive compostos fenólicos) na estrutura da lignina, compensando sua perda de massa molar após a despolimerização. Por outro lado, a polidispersividade diminuiu, indicando uma maior homogeneidade entre os seus fragmentos molares quando comparado à lignina do material *in natura*.

TABELA 40. MASSA MOLAR APARENTE E POLIDISPERSIVIDADE DA LIGNINA DIOXANO ACETILADA DA PALHA *IN NATURA* (PIN) E PRÉ-TRATADA (AF-2*), OBTIDOS POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL.

Componente	Lignina Dioxano (Da)	
	PIN	AF-2*
MMA _M (massa molar média aparente)	9.351±398	10.204±186
MMA _N (número molar médio aparente)	2.688±185	3.437±307
Polidispersividade (MMA _M /MMA _N)	3,48±0,10	2,98±0,25

O perfil da análise termogravimétrica (ATG) da lignina dioxano pré-tratada (Figura 40) revelou que o material não apresentava contaminações por sais ou outros componentes inorgânicos, devido a presença de apenas um pico exotérmico, o que significa que o processo de purificação utilizado no procedimento de extração foi eficiente para remover tais contaminantes.

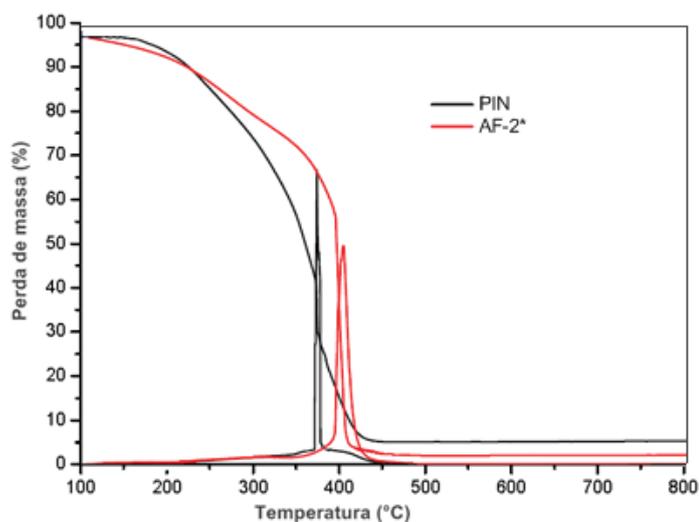


FIGURA 40. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA LIGNINA DIOXANO DERIVADA DA PALHA *IN NATURA* (PIN) E DA PALHA PRÉ-TRATADA SOB CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO PRÉ-SELECIONADAS (AF-2*).

A temperatura média de combustão da lignina da palha *in natura* foi de 374 °C, enquanto que a lignina da palha pré-tratada exigiu temperaturas de 405 °C. A presença de um único pico exotérmico revela que a lignina não possui contaminação por carboidratos, que é caracterizado por um pico exotérmico em torno de 300 °C. O aumento da temperatura de combustão da lignina pré-tratada revela que o pré-tratamento gerou modificações químicas na estrutura da lignina, tornando-a mais condensada, como indicaram as evidências do espectro de RMN de ^1H e a quantificação de grupos funcionais. Portanto, conclui-se que o pré-tratamento leva a um aumento no número de ligações estáveis entre carbonos alifáticos e aromáticos, como as ligações do tipo 5-5', β - β e β -4.

4.4.4 Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados com substratos derivados do experimento AF-2* após terem sido exaustivamente lavados com água. Esta medida foi feita para garantir que a susceptibilidade à hidrólise da celulose seria medida na ausência de quaisquer fatores negativos que poderiam advir do pré-tratamento, principalmente na forma de carboidratos e ácidos orgânicos. A Figura 41 demonstra que o pré-tratamento foi bastante eficiente, pois os substratos obtidos apresentaram boa conversão à glucose utilizando uma consistência média de sólidos

totais (8 %) e uma baixa carga enzimática de 2,5 mg enzima/g bagaço seco de Cellic CTec 2 da Novozymes. O percentual de celulose convertido neste ensaio foi de 66,5 %, ficando inclusive superior aos experimentos realizados anteriormente com substratos lavados (53,68 %) e não lavados (62,48 %), obtidos nas mesmas condições. O perfil de hidrólise enzimática do substrato AF-2* também revela que, com 48 h de reação, já foi possível atingir uma conversão de aproximadamente 60 %. Neste sentido, o substrato obtido nas condições selecionadas oferece uma alternativa promissora para produção de etanol de segunda geração.

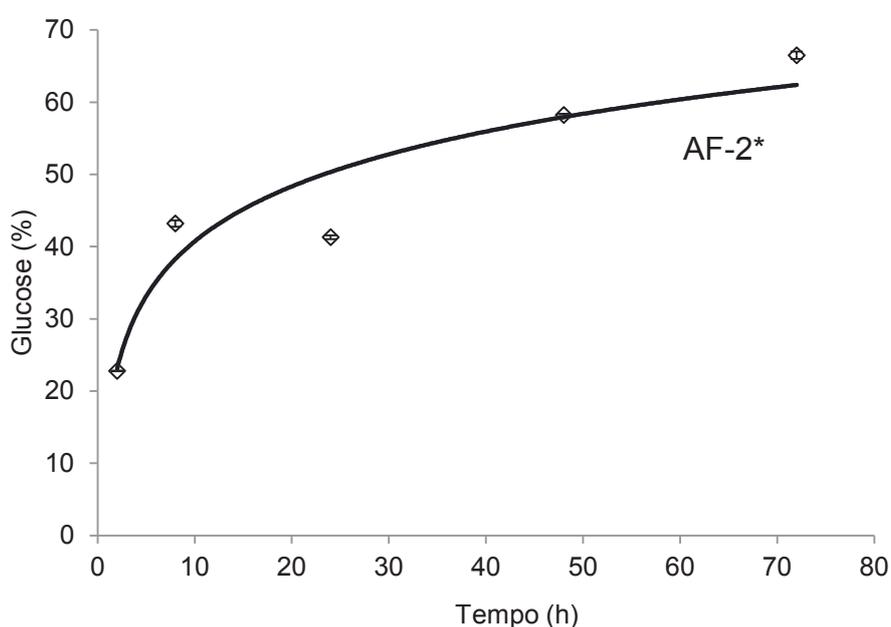


FIGURA 41. GLUCOSE LIBERADA DURANTE A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO SUBSTRATO LAVADO COM ÁGUA QUE FOI DERIVADO DO PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CANA SOB CONDIÇÕES PRÉ-SELECIONADAS.

5. Conclusão

A caracterização química da palha de cana-de-açúcar mostrou que esta biomassa pode ser uma boa alternativa para a produção de bioetanol, devido ao seu alto teor de glucose e baixo teor de lignina. No entanto, o fato da lignina da palha ser condensada e com maiores interações com os carboidratos, característico de ligninas ricas em unidades guaiacílicas, pode representar um problema para o pré-tratamento a vapor. Além disso, o alto teor de hemiceluloses da palha pode oferecer barreiras adicionais para etapas futuras de fermentação.

O pré-tratamento foi eficiente em remover as hemiceluloses das fibras lignocelulósicas, sendo que a catálise fosfórica apresentou vantagens frente à auto-hidrólise (pré-tratamento sem catalisador exógeno), pois, além de promover uma maior solubilização das hemiceluloses, aumentando assim a acessibilidade da celulose, apresentou uma boa recuperação de glucose após o pré-tratamento, fator importante para maximizar o rendimento na produção de bioetanol. Além disso, condições intermediárias de ácido apresentaram resultados semelhantes aos experimentos com maiores concentrações, indicando que condições mais brandas são desejáveis por produzirem menor teor de subprodutos inibidores da fermentação (compostos fenólicos).

A palha pré-tratada por explosão a vapor apresentou boa susceptibilidade à hidrólise enzimática, sendo que a catálise fosfórica foi eficiente em produzir substratos com altas taxas de conversão de celulose operando em temperaturas mais brandas que a auto-hidrólise. O bom desempenho dos substratos não lavados frente à hidrólise enzimática revelou que a fração hemicelulósica hidrolisada e outros compostos presentes na fração solúvel derivados do pré-tratamento não exerceram caráter inibitório sobre as enzimas. Além disso, os resultados de fermentação do projeto CaneBioFuel (FP7) mostraram que a palha pré-tratada sob a condição selecionada (9,5mg ácido/g palha seca, 10 min, 180°C) apresentou uma conversão em etanol de 90% dos açúcares fermentescíveis liberados na hidrólise enzimática.

Por fim, a caracterização do substrato obtido nas condições do experimento selecionado mostrou as modificações químicas resultantes do pré-tratamento. A explosão a vapor gerou uma celulose com maior índice de cristalinidade e menor grau de polimerização, ao passo que a lignina sofreu modificações em sua estrutura que a tornaram mais condensada.

Referências

- AGÊNCIA DE INFORMAÇÕES EMBRAPA – Cana de açúcar. http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_66_711_200516719.html, acessado em 17/03/09.
- AHMED, Z., BANU, H., RAHMAN, M. M., AKHTER, F., HAQUE, M. S., Microbial activity on the degradation of lignocellulosic polysaccharides. **Journal of Biological Sciences**, v. 1, p.993-997, 2001.
- AKELLA, A. K., SAINI, R. P., SHARMA, M. P., Social, economical and environmental impacts of renewable energy systems. **Renewable Energy**, v. 34, p.390-396, 2009.
- ALMEIDA, E. V. R., Valorização da celulose de sisal: uso na preparação de acetatos e filmes de acetatos de celulose/celulose e quitosana/celulose, **Dissertação de Mestrado**, São Carlos, SP, 2009.
- ALMEIDA, M. B. B., Bio-óleo a partir da pirólise rápida, térmica ou catalítica, da palha de cana-de-açúcar e seu co-processamento com gasóleo em craqueamento catalítico, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- ANGELIS-DIMAKIS, A., BIBERACHER, M., DOMINGUEZ, J., FIORESE, G., GADOCHA, S., GNANSOUNOU, E., GUARISO, G., KARTALIDIS, A., PANICHELLI, L., PINEDO, I., ROBBA, M., Methods and tools to evaluate the availability of renewable energy sources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p.1182-1200, 2011.
- BAK, J. S., KO, J. K., HAN, Y. H., LEE, B. C., CHOI, I.-G., KIM, K. H., Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1285-1290, 2009.
- 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, 2008, p.551-573.

- BASTOS, V. D. 2007. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. Pp. 5-38. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro.
- BINOD, P., SINDHU, R., SINGHANIA, R. R., VIKRAM, S., DEVI, L., NAGALAKSHMI, S., KURIEN, N., SUKUMARAN, R. K., PANDEY, A., Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, p.4767-4774, 2010.
- BLAKENEY, A. B., HARRIS, P. J., HENRY, R. J., STONE, B. A., A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. **Carbohydrate Research**, v. 113, p.291-299, 1983.
- BUABAN, B., INOUE, H., YANO, S., TANAPONGPIPAT, S., RUANGLEK, V., CHAMPREDA, V., PICHYANGKURA, R., RENGPIPAT, S., EURWILAICHITR, L., Bioethanol production from ball milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p.18-25, 2010.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v.28, 2008, p.237-259.
- CAMASSOLA, M., DILLON, A. J. P., 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.
- CANEBIOFUEL, <http://www.canebiofuel.org>, acessado em 21/09/10.
- 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, 2007, p.1003-1009.
- 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.
- CARA, C., RUIZ, E., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., CASTRO, E., Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. **Process Biochemistry**, v. 41, p.423-429, 2006.

- 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.
- CARRASCO, C., BAUDEL, H. M., SENDELIUS, J., MODIG, T., ROSLANDER, C., GALBE, M., HAHN-HÄGERDAL, B., ZACCHI, G., LIDÉN, G., SO₂-catalyzed steam pretreatment and fermentation of enzymatically hydrolyzed sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p.64-73, 2010.
- CASTRO, S. S., ABDALA, K., SILVA, A. A., BÔRGES, V. M. S., A expansão da cana-de-açúcar no cerrado e no estado de Goiás: elementos para uma análise espacial do processo. **Boletim Goiano de Geografia**, v. 30, p.171-191, 2010.
- CENTRO DE TECNOLOGIA CANASVIEIRA - <http://www.ctcanavieira.com.br/site/>, acessado em 08/10/2010.
- CHAPLIN, M., Arabinoxylan em <http://www.btinternet.com/~martin.chaplin/hyara.html> (último acesso em 29/01/2011).
- CHEN, W.-H., PEN, B.-L., YU, C.-T., HWANG, W.-S., Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p.2916-2924, 2011.
- CHENG, K.-K., CAI, B.-Y., ZHANG, J.-A., LING, H.-Z., ZHOU, Y.-J., GE, J.-P., XU, J.-M., Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p.105-109, 2008.
- CHRISTIERNIN, M., OHLSSON, A. B., BERGLUND, T., HENRIKSSON, G., Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p.777-785, 2005.
- CHUA, M. G. S.; WAYAN, M. Characterization of autohydrolysis aspen (*P. tremuloides*) lignins. Part 1. Composition and molecular weight distribution of extracted autohydrolysis lignin. **Canadian Journal of Chemistry**, v.57, p.1141-1149, 1979a.

- CHUA, M. G. S.; WAYAN, M. Characterization of autohydrolysis aspen (*P. remuloides*) lignins. Part 3 - Infrared and ultraviolet studies of extracted autohydrolysis lignin. **Canadian Journal of Chemistry**, v.57, p.2603-2611, 1979b.
- CHUNDAWAT, S. P. S., VISMEH, R., SHARMA, L. N., HUMPULA, J. F., DA COSTA SOUSA, L., CHAMBLISS, C. K., JONES, A. D., BALAN, V., DALE, B. E., Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments. **Bioresource Technology**, v. 101, p.8429-8438, 2010.
- EWANICK, S., BURA, R., The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, p.2651-2658, 2011.
- D'ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. *In*: Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica, 2^a. ed., vol.1, 1988. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo.
- DE ALEGRÍA MANCISIDOR, I. M., DÍAZ DE BASURTO URAGA, P., MARTÍNEZ DE ALEGRÍA MANCISIDOR, I., RUIZ DE ARBULO LÓPEZ, P., European Union's renewable energy sources and energy efficiency policy review: The Spanish perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p.100-114, 2009.
- DEMARTINI, J. D., WYMAN, C. E., Changes in composition and sugar release across the annual rings of *Populus* wood and implications on recalcitrance. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1352-1358, 2011.
- DEMIRBAS, A.; Progress and recent trends in biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.33, 2007, p.1-18.
- DEMIRBAS, A., Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**, v. 88, p.17-28, 2011.
- DEMIRBAS, M. F., BALAT, M., BALAT, H., Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p.1746-1760, 2009.
- DENCE, C. W.; LIN, S. Y. *Methods in Lignin Chemistry*. New York: Springer Verlag, 1992.

- DOHERTY, T. V., MORA-PALE, M., FOLEY, S. E., LINHARDT, R. J., DORDICK, J. S., Ionic liquid solvent properties as predictors of lignocellulose pretreatment efficacy. **Green Chemistry**, v. 12, p.1967-1975, 2010.
- DOMÍNGUEZ, J. C., OLIET, M., ALONSO, M. V., GILARRANZ, M. A., RODRÍGUEZ, F., Thermal stability and pyrolysis kinetics of organosolv lignins obtained from *Eucalyptus globulus*. **Industrial Crops and Products**, v. 27, p.150-156, 2008.
- DUTRA, R. M., SZKLO, A. S., Incentive policies for promoting wind power production in Brazil: Scenarios for the Alternative Energy Sources Incentive Program (PROINFA) under the New Brazilian electric power sector regulation. **Renewable Energy**, v. 33, p.65-76, 2008.
- EMMEL, A., MATHIAS, A. L., WYPYCH, F., RAMOS, L. P., Fractionation of *Eucalyptus grandis* chips by dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, p.105-115, 2003.
- FAPESP, **Revista de Pesquisa**. nº154 – dezembro de 2008.
- FAIX, O., GRÜNWARD, C., BEINHOFF, O., Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWLs) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, ¹H NMR and UV spectroscopy. **Holzforschung**, v. 46, p.425-432, 1992.
- FENGEL, D.; WEGENER, G., **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, T. V.; BOS, G. J. K.; ZEEMAN, G.; SANDERS, J. P. M.; LIER, J. B. Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p.2575-2579.
- FESTUCCI-BUSELLI, R. A., OTONI, W. C., JOSHI, C. P., Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p.1-13, 2007.
- FUKUSHIMA, R. S., HATFIELD, R. D., Composição fenólica de ligninas dioxano determinadas pela reação oxidativa com o nitrobenzeno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p.373-378, 2003.

- GAO, M., XU, F., LI, S., JI, X., CHEN, S., ZHANG, D., Effect of SC-CO₂ pretreatment in increasing rice straw biomass conversion. **Biosystems Engineering**, v. 106, p.470-475, 2010.
- GARRETT, R. H., GRISHAM, C. M., **Biochemistry**, 2a edição, Saunders, 1999.
- GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: método Klason modificado. **O Papel**, v. 47, 1986.
- GUERRA, A. A. Biodegradação de Madeira por *Ceriporiopsis subvermispora*: Caracterização dos polímeros residuais. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2002.
- HARUN, R., DANQUAH, M. K., Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v. 46, p.304-309, 2011.
- HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, 2009, p.10-18.
- HERNÁNDEZ-SALAS, J. M., VILLA-RAMÍREZ, M. S., VELOZ-RENDÓN, J. S., RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N., GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A., PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A., TREJO-ESTRADA, S. R., Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p.1238-1245, 2009.
- IBRAHIM, M. M., EL-ZAWAWY, W. K., ABDEL-FATTAH, Y. R., SOLIMAN, N. A., AGBLEVOR, F. A., Comparison of alkaline pulping with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p.720-726, 2011.
- JARDINE, J. G., DISPATO, I., PERES, M. R. 2009. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da árvore do conhecimento agroenergia. Pp. 32. **Embrapa**.
- JOHN, R. P., ANISHA, G. S., NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A., Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, p.186-193, 2011.
- JOYCE, J., DIXON, T., DINIZ DA COSTA, J. C., Characterization of Sugar Cane Waste Biomass Derived Chars from Pressurized Gasification. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 84, p.429-439, 2006.

- JUNG, H. G., DEETZ, D. A., Cell wall lignification and degradability. **Forage cell wall structure and digestibility**, v., p.315-346, 1993.
- KILICASLAN, I., SARAC, H. I., ÖZDEMİR, E., ERMİŞ, K., Sugar cane as an alternative energy source for Turkey. **Energy Conversion and Management**, v. 40, p.1-11, 1999.
- KLOCK, U.; MUÑOZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**, Fupef, 3ª edição, 01/2006.
- KORONEOS, C., SPACHOS, T., MOUSSIOPOULOS, N., Exergy analysis of renewable energy sources. **Renewable Energy**, v. 28, p.295-310, 2003.
- KRISHNA, S. H.; PRASANTHI, K.; CHOWDARY, G. V.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. **Process Biochemistry**, v.33, n.8, p.825-830, 1998.
- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M. J.; LYND, R. L. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to bioethanol. **Bioresource Technology**, v.81, 2002, p.33-44.
- LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M., **Principles of Biochemistry**, W. H. Freeman and Company, New York, 2008.
- LEITÃO, M. C. A., SILVA, M. L. A., JANUÁRIO, M. I. N., AZINHEIRA, H. G., Galacturonic acid in pectic substances of sunflower head residues: quantitative determination by HPLC. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p.165-169, 1995.
- LI, H.; KIM, N.-J.; JIANG, M.; KANG, J. W.; CHANG, H. N. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. **Bioresource Technology**, 2009.
- LI, X., KIM, T. H., NGHIEM, N. P., Bioethanol production from corn stover using aqueous ammonia pretreatment and two-phase simultaneous saccharification and fermentation (TPSSF). **Bioresource Technology**, v. 101, p.5910-5916, 2010.
- LIAO, W.; LIU, Y.; LIU, C.; WEN, Z.; CHEN, S. Acid hydrolysis of fibers dairy manure. **Bioresource Technology**, v.97, 2006, p.1687-1695.

- LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v.1, n.2, p.5-18, 2007.
- LIU, L., YE, X. P., WOMAC, A. R., SOKHANSANJ, S., Variability of biomass chemical composition and rapid analysis using FT-NIR techniques. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p.820-829, 2010.
- MA, F., YANG, N., XU, C., YU, H., WU, J., ZHANG, X., Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 101, p.9600-9604, 2010.
- MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; VASCONCELLOS, P. C. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: Uma abordagem estatística. **Química Nova**, v.30, n.3, p.577-581, 2007.
- MATHIAS, A. L. Produção de Vanilina a partir de Lenhina (lignina): Estudo cinético e do processo. **Tese de Doutorado**, Universidade do Porto, Porto, Portugal, 327p, 1993.
- MENEGUELLO, L. A. O setor sucroalcooleiro e a utilização da biomassa da cana-de-açúcar como fonte alternativa de energia. **Dissertação de Mestrado**, Centro Universitário de Araraquara, 2006.
- MONTE, J. R., BRIENZO, M., MILAGRES, A. M. F., Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Applied Energy**, v. 88, p.403-408, 2011.
- MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. Sociedade de Investigações Florestais, **Revista Árvore**, v.29, n.3, p.461-470, 2005.
- MORIYA, R. Y.; DUARTE, M. M. C.; MEDEIROS, M. B.; GONÇALVES, A. R. Obtenção de polpa etanol-água de palha de cana-de-açúcar e branqueamento enzimático da polpa obtida. *In*: X Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VI

Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

- 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, 2005, p.673-686.
- NADJI, H., DIOUF, P. N., BENABOURA, A., BEDARD, Y., RIEDL, B., STEVANOVIC, T., Comparative study of lignins isolated from Alfa grass (*Stipa tenacissima* L.). **Bioresource Technology**, v. 100, p.3585-3592, 2009.
- NAZHAD, M. M., RAMOS, L. P., PASZNER, L., SADDLER, J. N., Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p.68-74, 1995.
- NIKNAM, T., FIROUZI, B. B., A practical algorithm for distribution state estimation including renewable energy sources. **Renewable Energy**, v. 34, p.2309-2316, 2009.
- OGEDA, T. L., PETRI, D. F. S., Biomass enzymatic hydrolysis. **Química Nova**, v. 33, p.1549-1558, 2010.
- ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J.; ZACCHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v.98, 2007a, p.2503-2510.
- OLIVEIRA, L., EVTUGUIN, D., CORDEIRO, N., SILVESTRE, A. J. D., Structural characterization of stalk lignin from banana plant. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p.86-95, 2009.
- OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, p.312-331, 1996.
- PASKA, J., SALEK, M., SURMA, T., Current status and perspectives of renewable energy sources in Poland. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, p.142-154, 2009.
- PATERNIANI, J. E. S., SILVA, M. J. M., Desinfecção de efluentes com tratamento terciário utilizando energia solar (SODIS): Avaliação do uso do dispositivo para concentração dos raios solares. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, p.9-13, 2005.

- PICCOLO, C.; BEZZO, F. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. **Biomass and Bioenergy**, v.33, 2009, p.478-491.
- PITARELO, A. P. Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2007.
- PITARELO, A. P., SZCZERBOWSKI, D., ZANDONÁ FILHO, A., RAMOS, L. P., NDIAYE, P. M. 2010. Efeito da catálise fosfórica sobre o pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática do bagaço de cana. Pp. 163-182. **Dossiê de pesquisa: Fontes renováveis**. Copel.
- PUBVET, V.2, N.29, Jul 4, ISSN 1982-1263, 2008;
- RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. **Cetesb** (ed.). *In: Seminário Nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais*. São Paulo, SP, 2000.
- RAMOS, L. P., The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p.863-871, 2003.
- RAMOS, L. P.; BREUIL, C.; SANDDLER, J. N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.15, 1993, p.19-25.
- REDDING, A. P., WANG, Z., KESHWANI, D. R., CHENG, J. J., High temperature dilute acid pretreatment of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 102, p.1415-1424, 2011.
- ROCHA, G. J. D. M., MARTIN, C., SOARES, I. B., SOUTO MAIOR, A. M., BAUDEL, H. M., MORAES DE ABREU, C. A., Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p.663-670, 2011.
- RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, 2008, p.160-166.
- RYDHOLM, S. A.; **Pulping processes**, Interscience: New York, 1965, p.3.

- SAAD, M. B. W.; GONÇALVES, A. R. In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.
- SAAD, M. B. W., OLIVEIRA, L. R. M., CÂNDIDO, R. G., QUINTANA, G., ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p.220-225, 2008.
- SAKAGAMI, H., KUSHIDA, T., OIZUMI, T., NAKASHIMA, H., MAKINO, T., Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, p.91-105, 2010.
- SALIBA, E. O. S., RODRIGUEZ, N. M., MORAIS, S. A. L., PILÓ-VELOSO, D., Ligninas - Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, p.917-928, 2001.
- SAMANIEGO, M. R. P., Uso de biocombustível da pirólise rápida da palha de cana em um motor de ciclo Otto, **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- SAMAYAM, I. P., SCHALL, C. A., Saccharification of ionic liquid pretreated biomass with commercial enzyme mixtures. **Bioresource Technology**, v. 101, p.3561-3566, 2010.
- SANTANA, M. C. A., CAVALI, J. 2006. Fundamentos e avaliação comparativa de métodos para análise de lignina em forragens. Pp. 1-13. **Revista eletrônica de Veterinária**.
- SEGAL, L., CREELY, J. J., MARTIN, A. E., CONRAD, C. M., An empirical method for estimating the degree of cristallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, p.786-794, 1959.
- SILVA, A. M., SILVA, E. C., SILVA, C. O., A theoretical study of glucose mutatoration in aqueous solution. **Carbohydrate Research**, v.341, p.1029-1040, 2006.
- SILVA, F. T. Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana. **Tese de doutorado**, Unicamp, 1995.
- SILVA, R., HARAGUCHI, S. K., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A. F., Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, p.661-671, 2009.

- SILVA FILHO, E. C., O polissacarídeo natural celulose quimicamente modificado no uso da remoção de cátions e termoquímica da interação na interface sólido/líquido, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- SHEVCHENKO, S. M., CHANG, K., ROBINSON, J., SADDLER, J. N., Optimization of monosaccharide recovery by post-hydrolysis of the water-soluble hemicellulose component after steam explosion of softwood chips. **Bioresource Technology**, v. 72, p.207-211, 2000.
- SINGH, A., NIGAM, P. S., MURPHY, J. D., Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. **Bioresource Technology**, v. 102, p.10-16, 2011.
- SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2. Ed. California, USA: Academic Press. 1992.
- SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical composition of wood and pulps: Basic constituents and their distribution. *In*: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry, Pulping and Papermaking**. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- SOMERVILLE, C., Cellulose synthesis in higher plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 22, p.53-78, 2006.
- SRIROTH, K., PIYACHOMKWAN, K., WANLAPATIT, S., NIVITCHANYONG, S., The promise of a technology revolution in cassava bioethanol: From Thai practice to the world practice. **Fuel**, v. 89, p.1333-1338, 2010.
- STUDART-GUIMARÃES, C., LACORTE, C., BRASILEIRO, A. C. M., Transformação genética em espécies florestais. **Ciência Florestal**, v. 13, p.167-178, 2003
- SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocelullose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v.34, 2009, p.421-424.
- SUN, R., LAWATHER, J. M., BANKS, W. B., A tentative chemical structure of wheat straw lignin. **Industrial Crops and Products**, v. 6, p.1-8, 1997.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, 2002, p.1-11.

- TAPPI **Test Methods** (1994-1995). Technical Association Pulp and Paper Industry. USA: Atlanta, 1994.
- TANAHASHI, M., **Wood Residue**, 1990.
- VALTASAARI, L., SAARELA, K., Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbanilate derivate. **Paperi ja Puu**, v. 57, p.5-10, 1975.
- WANG, J., YUE, Z.-B., CHEN, T.-H., PENG, S.-C., YU, H.-Q., CHEN, H.-Z., Anaerobic digestibility and fiber composition of bulrush in response to steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 101, p.6610-6614, 2010.
- WANG, K., JIANG, J. X., XU, F., SUN, R. C., Influence of steaming pressure on steam explosion pretreatment of Lespedeza stalks (*Lespedeza crytobotrya*): Part 1. Characteristics of degraded cellulose. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p.1379-1388, 2009.
- WATANABE, I., NAKAMURA, T., SHIMA, J., Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 110, p.176-179, 2010.
- WRIGHT, W. E., Statistical evidence for exchange of oxygen isotopes in holocellulose during long-term storage. **Chemical Geology**, v. 252, p.102-108, 2008.
- ZENG, J., SINGH, D., CHEN, S., Biological pretreatment of wheat straw by *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with inorganic salts. **Bioresource Technology**, v. 102, p.3206-3214, 2011.
- 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.
- ZAKIS, G. F. **Functional analysis of lignins and their derivatives**. Atlanta: Tappi Press, 1994. 91 p.
- ZHANG, L.-H., LI, D., WANG, L.-J., WANG, T.-P., ZHANG, L., CHEN, X. D., MAO, Z.-H., Effect of steam explosion on biodegradation of lignin in wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 99, p.8512-8515, 2008.

- ZHANG, Q., TANG, L., ZHANG, J., MAO, Z., JIANG, L., Optimization of thermal-dilute sulfuric acid pretreatment for enhancement of methane production from cassava residues. **Bioresource Technology**, v. 102, p.3958-3965, 2011.
- ZHONG, W., ZHANG, Z., QIAO, W., FU, P., LIU, M., Comparison of chemical and biological pretreatment of corn straw for biogas production by anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 36, p.1875-1879, 2011.
- 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, 2008, p.3817-3828.
- ZIMBARDI, F., VIOLA, E., NANNA, F., LAROCCA, E., CARDINALE, M., BARISANO, D., Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p.195-206, 2007.