

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

RICARDO JUSTINO DA SILVA

**EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Caxias do Sul
2012

RICARDO JUSTINO DA SILVA

**EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção da aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia Química, sob a orientação acadêmica da Prof^a. Dr^a. Marli Camassola e coordenação da Prof^a. Dr^a. Anna Celia Silva Arruda.

Caxias do Sul
Período 2012/2

RICARDO JUSTINO DA SILVA

**EFEITO DE PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO NA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção da aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia Química da Universidade de Caxias do Sul.

Caxias do Sul, 09 de julho de 2012.

Banca examinadora

Prof.^a/Dr.^a Marli Camassola (UCS)
Orientadora

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (UCS)

Prof. MSc. Daniel Toss (UCS)

DEDICATÓRIA

*À minha família
que sempre me apoiou ao longo desta jornada
Aos professores e colegas
pelos ensinamentos e transformações na minha visão do mundo
Aos críticos
por alimentar a minha motivação pela excelência.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Caxias do Sul pela oportunidade.

Ao PROUNI – Programa Universidade para Todos pela bolsa integral de estudos.

À Prof^a. Dr^a. Marli Camassola pela orientação e por aceitar o desafio mesmo diante das adversidades.

Ao Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon pela compreensão e possibilitar a realização deste trabalho de conclusão de curso.

Aos meus colegas e amigos pelo convívio e enriquecimento do meu aprendizado.

Aos professores do Centro de Ciência Exatas da Universidade de Caxias do Sul pelos ensinamentos, em especial aos professores do curso de graduação em engenharia química.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso.

EPÍGRAFE

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.”

Albert Einstein

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos como fonte de energia renovável são uma alternativa para aumentar a matriz energética e diminuir os impactos ambientais causados pelos combustíveis fósseis. No Brasil, o resíduo do processamento da cana-de-açúcar pelo setor sucroalcooleiro tem grande potencial para se tornar matéria-prima para a produção de etanol. O setor gerou na safra de 2010/2011 cerca de 173 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar. Este resíduo é rico em celulose, biopolímero composto por moléculas de glicose, unidas por ligações β -1,4 glicosídicas, que podem ser convertidas a etanol por via fermentativa, porém um dos gargalos tecnológicos para a produção do etanol a partir de materiais lignocelulósicos em escala industrial é a necessidade de uma etapa de pré-tratamento que possibilite, de forma ótima, a ação enzimática no processo de hidrólise da celulose e hemicelulose para obtenção de açúcares fermentescíveis. O intuito deste trabalho foi avaliar o efeito do pré-tratamento hidrotérmico com aplicação de vapor saturado, sem descompressão explosiva e realizar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente por meio de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas pelo micro-organismo *P. echinulatum* linhagem 9A02S1, avaliando o rendimento em açúcares fermentescíveis e a eficiência do pré-tratamento para a obtenção destes. Para isto, foi realizado um planejamento experimental composto central rotacional (CCDR) para metodologia de superfície de resposta (MSR) para verificar o efeito da variável tempo, de 5 min a 25 min, e da variável temperatura, de 169°C a 211°C. A composição das biomassas obtidas após os pré-tratamentos foram avaliadas pelo método de Van Soest para determinação de fibras e morfologicamente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), já a composição da fase líquida resultante do pré-tratamento foi avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A hidrólise enzimática foi realizada com carga enzimática de 15 FPU/g de substrato, em condições ótimas, e com coletas periódicas totalizando 60h de hidrólise, os açúcares liberados foram quantificados pelo método DNS para açúcares redutores totais (ARTs) e por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest[®]. A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente por 8 min e 205°C apresentou rendimento em ARTs de 698,54±46,2 mg/g de biomassa seca hidrolisada após 36h de hidrólise chegando a um ganho de até 311,8% após 24h de hidrólise em relação ao bagaço não pré-tratado, obteve-se uma perda mássica de 14,97% do bagaço, decorrente do pré-tratamento hidrotérmico, e na fase líquida resultante deste pré-tratamento obteve-se uma concentração de 0,249 g/L de 5-HMF e 0,357g/L de furfural, apresentando 2,142 g/L de glicose e 3,931 g/L xilose, açúcares que podem ser recuperados. A eficiência do pré-tratamento depende, principalmente, do tempo de residência no reator e da temperatura deste, sendo a adequação destes parâmetros juntamente com a viabilidade e atratividade econômica um desafio.

Palavras-chave: Pré-tratamento Hidrotérmico. Bagaço de Cana-de-Açúcar. Hidrólise Enzimática.

ABSTRACT

The lignocellulosic materials as a source of renewable energy are an alternative to increase the energy matrix and reduce the environmental impacts caused by fossil fuels. In Brazil, the residue of the processing of sugar cane for sugar and ethanol sector has great potential to become raw material for ethanol production. The sector generated in the harvest of 2010/2011 about 173 million tons of sugar cane bagasse. This residue is rich in cellulose, biopolymers consisting of glucose molecules, linked by β -1,4 glycosidic bonds which can be converted to ethanol by fermentation, but one of the bottlenecks in the technology for producing ethanol from lignocellulose materials in industrial scale is a need for a pretreatment step to optimize the enzymatic hydrolysis process of the cellulose and hemicellulose to obtain fermentable sugars. The purpose of this study was to evaluate the effect of hydrothermal pretreatment with application of saturated steam, without explosive decompression and perform the hydrolysis of sugar cane bagasse pretreated hydrothermally using hemicellulolytic and cellulolytic enzymes produced by the fungus *Penicillium echinulatum* 9A02S1, evaluating the yield of fermentable sugars and efficiency of the pretreatment for obtaining these sugars. For this, it was performed an experimental planning CCRD (Central Composite Rotational Design) for response surface methodology (RSM) to determine the effect of the variable time of 5 min to 25 min, and the variable temperature of 169°C to 211°C. The biomass composition obtained after pretreatment were evaluated by the method of Van Soest for determination of fiber and the morphology by scanning electron microscopy (SEM), as the composition of the liquid phase resulting from the pre-treatment was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC). Enzymatic hydrolysis was performed with enzyme load of 15 FPU/g of substrate, at 50°C, with periodic samples collection until 60h. T released sugars were measured by the DNS method for reducing sugars (RS) and PAP kit of glucose Liquiform, Labtest[®]. The hydrolysis of sugar cane bagasse sugar pretreated hydrothermally for 8 min and 205°C showed quantities of ARTs 698.54±46.2 mg/g dry biomass hydrolyzed after 36 h of hydrolysis reaching a gain of up to 311.8% hydrolysis after 24 hours compared to non-pretreated bagasse. This pretreatment obtained a weight loss of 14.97% of mass, due to the hydrothermal pretreatment, and the liquid phase resulting from this pretreatment there was obtained a concentration of 0.249 g/L of 5-HMF and 0.357 g/L furfural, with 2.142 g/L glucose and 3.931 g/L xylose, sugars that can be recovered. The efficiency of the pretreatment depends mainly on the residence time in the reactor and the temperature thereof, and the suitability of these parameters along with the economic attractiveness and viability of a challenge.

Keywords: Hydrothermal pretreatment. Sugar Cane Bagasse. Enzymatic Hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Arquitetura da parede celular vegetal - Estrutura básica de lignocelulósicos	25
Figura 2 - Estrutura molecular parcial da celulose com representação das ligações de hidrogênio supramolecular	26
Figura 3 - Mecanismo de degradação da celulose catalisada por íons hidrônio, resultando em D-glicose.....	28
Figura 4 - Mecanismo de desidratação da D-glicose e frutose, resultando em 5-hidroximetilfurfural, e mecanismo de reidratação do 5-hidroximetilfurfural, resultando em ácido levulínico e ácido fórmico	29
Figura 5 - Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (a) D-glicose; (b) D-galactose; (c) L-arabinose; (d) D-xilose; (e) D-manose; (f) 4-O-metil-D-glucurônico e (g) ramnose	30
Figura 6 - Estrutura molecular parcial da hemicelulose proposta para gramíneas.....	31
Figura 7 - Mecanismo de degradação da xilana catalisada por íons hidrônio, resultando em D-xilose.....	32
Figura 8 - Mecanismo de degradação de arabinoxilanas catalisada por íons hidrônio, resultando em L-arabinose e xilana (suprimida do mecanismo).....	33
Figura 9 - Mecanismo de degradação da galactomanana catalisada por íons hidrônio, resultando em D-galactose	33
Figura 10 - Obtenção de 2-furaldeído (furfural): (a) Mecanismo de desidratação de pentoses (xilose e arabinose); (b) Degradação do 5-hidroximetilfurfural	34
Figura 11 - Ácidos urônicos formados: (a) α -D-glucurônico; (b) α -D-4-O-metilglucorônico e (c) α -D-galactorônico.....	35
Figura 12 - Alcoóis precursores das unidades fenolpropanóides: (a) álcool p-cumarílico (guaiacil); (b) álcool conifêrilico (p-hidroxifenol); (c) álcool sinapílico (sirigil).....	36
Figura 13 - Estrutura molecular parcial da lignina e possíveis ligações éster e éter da lignina com a celulose	37
Figura 14 - Mecanismo parcial de despolimerização e repolimerização de subunidades de lignina.....	37
Figura 15 - Sítios reativos das unidades precursoras da lignina	38

Figura 16 - Regiões de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e áreas de preservação ambiental	42
Figura 17 - Representação esquemática das alterações estruturais desejadas de um pré-tratamento eficiente sobre as microfibrilas do lignocelulósico.....	48
Figura 18 - Representação 3D esquemática de uma exoglucanase (CBH) e suas principais partes	61
Figura 19 - Representação da atuação das enzimas celulases sobre a matriz celulósica.....	64
Figura 20 - Representação da atuação das enzimas hemicelulases sobre a matriz hemicelulósica, sequência simplificada com ênfase na degradação da xilose	68
Figura 21 - MEV da linhagem S1M29 de <i>Penicillium echinulatum</i>	70
Figura 22 - Reações ocorridas na quantificação de ARTS pelo método DNS	70
Figura 23 - Detalhamento da unidade didática para pré-tratamento de material lignocelulósico	77
Figura 24 - Superfície de resposta para a perda mássica percentual de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.....	90
Figura 25 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento (<i>in natura</i>): a) x100; b) x1000; c) x100; d) x1000; e) x500.....	91
Figura 26 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000	92
Figura 27 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000	93
Figura 28 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 22 min a 205°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000	94
Figura 29 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 8 min a 175°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500	95
Figura 30 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 22 min a 175°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500	96
Figura 31 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 8 min a 205°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000	97
Figura 32 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 5 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500	98

Figura 33 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 25 min a 190°C: a) x500; b) x1000; c) x100; d) x1000	99
Figura 34 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 169°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000	100
Figura 35 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 211°C: a) x100; b) x500; c) x1000; d) x500	101
Figura 36 - Superfície de resposta para a perda mássica de celulose do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.....	109
Figura 37 - Superfície de resposta para a perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico	112
Figura 38 - Superfície de resposta para a perda mássica de lignina do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.....	115
Figura 39 - Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico	121
Figura 40 - Superfície de resposta para a concentração de xilose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico	124
Figura 41 - Superfície de resposta para a concentração de 5-HMF (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico	127
Figura 42 - Superfície de resposta para a concentração de furfural (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico	131
Figura 43 - Perfil de ART liberados por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico	132
Figura 44 - Perfil de glicose liberada (mg/g de biomassa seca) por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	135
Figura 45 - Composição do hidrolisado das amostras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> e pré-tratadas, em diferentes condições de tempo e temperatura, para 48h de hidrólise enzimática.....	137

Figura 46 - Perfil de ART liberados (mg/g de biomassa seca bruta) por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico.....	138
Figura 47 - Superfície de resposta para o rendimento global em ARTs obtido em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.	142
Figura 48 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 15 min (Experimento 1).....	151
Figura 49 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 15 min (Experimento 2).....	151
Figura 50 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 205°C por 22 min (Experimento 3).....	152
Figura 51 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 175°C por 8 min (Experimento 4).....	152
Figura 52 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 175°C por 22 min (Experimento 5).....	153
Figura 53 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 205°C por 8 min (Experimento 6).....	153
Figura 54 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 5 min (Experimento 7).....	154
Figura 55 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 25 min (Experimento 8).....	154
Figura 56 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 169°C por 15 min (Experimento 9).....	155
Figura 57 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 211°C por 15 min (Experimento 10).....	155

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental (CCDR)	75
Tabela 2 - Planejamento experimental para o pré-tratamento hidrotérmico com água no estado gasoso, sem descompressão explosiva	76
Tabela 3 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	86
Tabela 4 - Perda mássica percentual das amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico.....	87
Tabela 5 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda de massa percentual do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	88
Tabela 6 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda de massa percentual de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	88
Tabela 7 - Análise de variância da superfície de resposta para perda de massa percentual de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	89
Tabela 8 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento hidrotérmico em diferentes tempos e temperatura de pré-tratamento....	102
Tabela 9 - Quantitativo percentual removido dos principais constituintes do bagaço de Cana-de-açúcar pelo pré-tratamento hidrotérmico	104
Tabela 10 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	106
Tabela 11 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente.....	107
Tabela 12 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica percentual de celulose no pré-tratamento hidrotérmico	107
Tabela 13 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	110
Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente.....	110

Tabela 15 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica de hemicelulose no pré-tratamento hidrotérmico	111
Tabela 16 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	113
Tabela 17 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente.....	113
Tabela 18 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica percentual de lignina no pré-tratamento hidrotérmico	114
Tabela 19 - Tempo de retenção (min) para os compostos analisados, obtido por CLAE com utilização de padrões, na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar	116
Tabela 20 - Concentrações de componentes, analisadas por HPLC, presentes na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico das amostras de bagaço de cana-de-açúcar	116
Tabela 21 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.....	118
Tabela 22 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar	119
Tabela 23 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar	119
Tabela 24 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.....	122
Tabela 25 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	123
Tabela 26 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	123

Tabela 27 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.....	125
Tabela 28 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	126
Tabela 29 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	126
Tabela 30 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.....	128
Tabela 31 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	129
Tabela 32 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar	129
Tabela 33 - Ganho percentual em ARTs para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente em diferentes condições.....	134
Tabela 34 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	140
Tabela 35 - Coeficientes de regressão para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente.....	140
Tabela 36 - Análise de variância da superfície de resposta para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente	141

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 MOTIVAÇÃO	20
1.1 OBJETIVO GERAL.....	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	24
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	25
2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	25
2.1.1 Celulose	26
2.1.1.1 D-glicose e Celobiose.....	28
2.1.1.2 5-Hidroximetilfurfural, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico.....	29
2.1.2 Hemicelulose	30
2.1.2.1 D-xilose	32
2.1.2.2 L-arabinose	32
2.1.2.3 D-galactose	33
2.1.2.4 Furanos	34
2.1.2.5 Ácidos Urônicos	35
2.1.3 Lignina	35
2.1.3 Extrativos e Cinzas	39
2.2 CANA-DE-AÇÚCAR	39
2.2.1 Classificação Botânica	40
2.2.2 Cana-de-Açúcar no Brasil	40
2.2.3 Bagaço de Cana-de-Açúcar	43
2.2.4 Composição Química do Bagaço de Cana-de-Açúcar	44
2.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIGNOCELULÓSICOS E DERIVADOS	45
2.3.1 MEV	45
2.3.2 Método de Van Soest para Determinação de Fibras	46
2.3.3 CLAE	46
2.4 PRÉ-TRATAMENTO DE LIGNOCELULÓSICOS PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS.....	47
2.4.1 Pré-Tratamento Físico	49

2.4.2 Pré-Tratamento Químico	49
2.4.2.1 Ácidos.....	50
2.4.2.1.1 <i>Ácido Diluído</i>	51
2.4.2.1.2 <i>Ácido Peracético</i>	51
2.4.2.1.3 <i>Ácido Sulfúrico Concentrado</i>	51
2.4.2.1.4 <i>Ácido Fosfórico Concentrado</i>	52
2.4.2.2 Líquido Iônico	52
2.4.2.3 Alcalino.....	53
2.4.2.3.1 <i>Amônia Aquosa</i>	53
2.4.2.4 Solventes Orgânicos	54
2.4.3 Pré-Tratamento Biológico	55
2.4.4 Pré-Tratamento Físico e Químico	55
2.4.4.1 Explosão a Vapor	55
2.4.4.2 Explosão de Fibras com Vapor de Amônia (AFEX).....	56
2.4.5 Pré-Tratamento Hidrotérmico	57
2.4.5.1 Auto-hidrólise	57
2.4.5.2 <i>Água Líquida Quente</i>	59
2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	59
2.5.1 Enzimas	61
2.5.1.1 Celulases.....	63
2.5.1.1.1 <i>Endoglucanase ou endo 1,4-β-glucanase</i>	63
2.5.1.1.2 <i>Exoglucanases ou exo 1,4-β-glucanase</i>	63
2.5.1.1.3 <i>β-glicosidase ou 1,4-β-glicosidase</i>	63
2.5.1.2 Hemicelulases	65
2.5.1.2.1 <i>Endoxilanase ou endo 1,4-β-xilanase</i>	65
2.5.1.2.2 <i>Xilosidase ou β-xilosidase</i>	66
2.5.1.2.3 <i>Endomananase ou endo 1,4-β-mananase</i>	66
2.5.1.2.4 <i>Manosidase ou β-manosidase</i>	66
2.5.1.2.5 <i>Acetil-xilan esterase</i>	66
2.5.1.2.6 <i>Arabinofuranosidases</i>	67
2.5.2 Micro-organismos	68
2.5.2.1 <i>Penicillium echinulatum</i>	69
2.5.3 Método DNS	70

3 METODOLOGIA	72
3.1 MATERIAIS	72
3.1.1 Resíduo lignocelulósico	72
3.1.2 Micro-organismos e Enzimas	72
3.1.3 Reagentes e Soluções	72
3.2 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	74
3.2.1 Preparo da Amostra de Bagaço de Cana-De-Açúcar	74
3.2.2 Planejamento Experimental.....	74
3.2.3 Pré-tratamento Hidrotérmico	76
3.2.3.1 Unidade Didática de Pré-tratamento Hidrotérmico	76
3.2.3.2 Procedimentos Operacionais da Unidade de Pré-tratamento Hidrotérmico	77
3.2.4 Teor de Matéria Seca Definitiva (Matéria Seca 105°C)	78
3.2.5 Método de Van Soest para Determinação de Fibras	79
3.2.5.1 Determinação de Fibra em Detergente Neutro (FDN)	79
3.2.5.1.1 Teor de Fibras em Detergente Neutro.....	79
3.2.5.1.2 Teor de Conteúdo Celular	80
3.2.5.2 Determinação da Fibra em Detergente Ácido (FDA).....	81
3.2.5.2.1 Teor de Fibras em Detergente Ácido.....	81
3.2.5.2.2 Teor de Hemicelulose.....	82
3.2.5.2.3 Teor de lignina.....	82
3.2.5.2.4 Teor de Cinzas	83
3.2.5.2.5 Teor de Celulose	84
3.2.6 MEV.....	84
3.2.7 Hidrólise Enzimática	84
3.2.8 Determinação de ARTs e Glicose	85
3.2.9 CLAE.....	85
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
4.1 TEOR DE MATÉRIA SECA DEFINITIVA (MATÉRIA SECA 105°C).....	86
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	86
4.3 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO	87
4.3.1 Perda Mássica	87
4.3.2 Caracterização Morfológica do Bagaço de Cana-de-açúcar por MEV	90

4.3.3 Composição Química das Amostras Pré-tratadas Hidrotérmicamente..	102
4.3.3.1 Constituintes Principais do Bagaço de Cana-de-açúcar Removidos no Pré-tratamento Hidrotérmico	103
4.3.3.2 Superfícies de Resposta para os Efeitos Observados com a Aplicação do Pré-tratamento Hidrotérmico Sobre as Amostras de Bagaço de Cana-de-açúcar .	105
4.3.3.2.1 <i>Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Celulose no Pré-tratamento Hidrotérmico</i>	106
4.3.3.2.2 <i>Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Hemicelulose no Pré-tratamento Hidrotérmico</i>	109
4.3.3.2.3 <i>Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Lignina no Pré-tratamento Hidrotérmico</i>	112
4.3.4 Componentes Presentes na Fase Líquida Resultante do Pré-tratamento Hidrotérmico das Amostras de Bagaço de Cana-de-açúcar	115
4.3.4.1 Superfície de Resposta para concentração de Glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar	118
4.3.4.2 Superfície de Resposta para concentração de Xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar	121
4.3.4.3 Superfície de Resposta para concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico	125
4.3.4.4 Superfície de Resposta para concentração de Furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico	128
4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	131
4.4.1 Concentração de ARTs no Hidrolisado Enzimático	132
4.4.2 Concentração de Glicose no Hidrolisado Enzimático.....	134
4.4.3 Rendimento Global do Processo em Concentrações de ARTs.....	138
4.4.4 Superfície de Resposta para Concentração de ARTs no Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar Pré-tratada Hidrotérmicamente após 48h de Hidrólise Enzimática	139
5 CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS	146
APÊNDICE A – Cromatogramas resultantes da análise por HPLC da fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar com os principais picos observados (assinalados e identificados)	151

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A motivação para este trabalho se fundamenta na importância da utilização de recursos renováveis e disponíveis para a produção de energia, principalmente de transporte, no desenvolvimento de novas tecnologias que contribuam para o aumento da matriz energética do país de forma sustentável e limpa, pois a sociedade atual e seu desenvolvimento estão vinculados à excessiva dependência de energia, principalmente a energia obtida de combustíveis fósseis, com uma crescente demanda energética e uso de recursos “finitos” para a sua geração, devido a esta dependência a humanidade se depara com problemas significativos que ameaçam não somente o contínuo desenvolvimento, mas a própria existência humana no planeta. Os dois significativos problemas são o esgotamento dos combustíveis fósseis e a degradação ambiental, que estão sendo continuamente agravados devido ao aumento, global, acelerado do consumo de energia.

Diante deste cenário desenvolveu-se a idealidade de sustentabilidade e eficiência energética, desafiando o desenvolvimento da sociedade, principalmente no desenvolvimento de novas tecnologias e no equilíbrio ou substituição das tecnologias não sustentáveis existentes, dentre estes desafios o principal é a obtenção de energia de forma sustentável, fontes de curto ciclo renovável, e limpa que permitam avançar na superação do atual paradigma, baseado nos combustíveis fósseis. Segundo o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) e o Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE) (2008) o petróleo, o gás natural e seus derivados, de longos ciclos renováveis, estão condenados a se esgotar em poucas décadas devido à crescente demanda energética, representam 55% do consumo mundial de energia e são esses combustíveis que permitem a existência dos meios de transporte rápidos e eficientes que temos hoje, bem como boa parte das atividades industriais.

Os combustíveis líquidos ou gasosos de fonte renovável, bicombustíveis, são vistos como promissores substitutos para os combustíveis fósseis, principalmente como energia de transporte, o que o coloca no centro de debates a nível mundial, “atualmente existem dois biocombustíveis líquidos no mercado, que substituem

parcialmente o petróleo: (1) o etanol pode substituir a gasolina, e (2) o biodiesel pode substituir o diesel” (DEMIRBAS; GUPTA, 2010, p. 17).

Nesse cenário, segundo BNDES e CGEE (2008), destaca-se o Brasil, cujo programa de bioetanol de cana-de-açúcar apresenta resultados interessantes, desde a implementação em 1931 do programa brasileiro de etanol, reforçado a partir de 1975 com a criação do programa Proálcool, para reduzir a dependência da importação do petróleo, que expandiu a cultura da cana-de-açúcar para a produção de etanol até os níveis atuais, já são substituídos mais de 50% da gasolina utilizada no país e o mercado está expandindo em um ritmo acelerado, principalmente devido à “invasão” da tecnologia *flex fuel*, escolha entre gasolina, etanol ou a mistura dos dois, no país e sua rápida disseminação, mais de 90% dos carros novos vendidos no Brasil possuem esta tecnologia (ABRAMOVAY, 2009). A “explosão” desta tecnologia juntamente com o crescente aumento populacional e da frota de veículos em circulação no país, geram a necessidade da expansão do setor sucroalcooleiro e o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes, que possam suprir a demanda e “driblar” as limitações ambientais do cultivo da cana-de-açúcar no país.

A produção de açúcares fermentescíveis a partir de lignocelulósicos, para a produção de etanol e outros bioprodutos, possibilita a produção do etanol a partir de outras culturas em regiões onde não é possível ou viável a cultura da cana-de-açúcar e principalmente a partir de resíduos de biomassa lignocelulósicos.

Os resíduos de biomassa lignocelulósica no Brasil provem principalmente da atividade agrícola, em grandes quantidades, com destaque para o bagaço da cana-de-açúcar, que apresenta uma perspectiva promissora para contribuir com a produção de etanol em larga escala, deixando assim de ser apenas um resíduo industrial ou agrícola para ser matéria-prima, contribuindo para o uso integral da cana-de-açúcar de forma sustentável e para o aumento da produção de etanol por área cultivada de cana, reduzindo assim a necessidade de expansão desta área de cultivo. A rota que está sendo principalmente enfocada baseia-se na hidrólise enzimática de lignocelulósicos, empregando celulasas e xilanases para a produção de xaropes de glicose e pentoses que, posteriormente possam ser fermentados para a produção de etanol ou outros produtos biotecnológicos. No entanto, devido à estrutura da biomassa, faz-se necessária a realização de uma etapa denominada pré-tratamento.

O pré-tratamento tem o objetivo de deixar a celulose mais acessível, pois tanto celulose quanto hemicelulose encontram-se associadas à lignina na parede vegetal, que forma uma barreira dificultando a conversão da celulose e da hemicelulose em açúcares fermentescíveis. O pré-tratamento pode ser feito de diversas formas, utilizando métodos físicos, químicos, biológicos ou físico-químicos, porém devido a diversos fatores como necessidade de reatores altamente resistentes as condições do pré-tratamento, formação de produtos inibidores da hidrólise e da fermentação e os altos custos envolvidos, é necessário avaliar bem o caso de cada biomassa e as necessidades dessa para se chegar ao melhor custo benefício, atualmente o bagaço é utilizado, principalmente, para geração de energia nas usinas sucroalcooleiras, co-geração, com venda do excedente energético gerado a rede nacional de abastecimento com custo benefício mais atrativo que a atual tecnologia para produção do etanol de segunda geração a partir deste resíduo. Por apresentar teoricamente os menores problemas (custos e necessidades) o pré-tratamento hidrotérmico tem sido estudado a fim de viabilizar sua utilização, com potencial competitivo com a tecnologia de co-geração das usinas.

Atualmente o pré-tratamento de lignocelulósicos por explosão a vapor, que utiliza vapor d'água e altas pressões, com descompressão explosiva, é o processo em destaque no cenário nacional, devido à eficiência, aos custos benefícios e as vantagens ambientais, porém com a necessidade de investimentos e de custos operacionais de equipamentos que suportem as condições do pré-tratamento. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias para pré-tratamento hidrotérmico, utilizando água no estado líquido ou no estado gasoso, em pressões de vapor, podem constituir-se em uma alternativa para substituição deste método a altas pressões e de alguns outros métodos utilizados atualmente, com ganhos ambientais e econômicos, devido à utilização de apenas água como reagente e da necessidade de equipamentos que suportem condições de pressões brandas.

1.1 OBJETIVO GERAL

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da realização de pré-tratamento hidrotérmico, utilizando água à pressão de saturação no estado gasoso, sobre o substrato bagaço de cana-de-açúcar, através da obtenção e avaliação de dados experimentais, visando determinar as condições

para maior liberação de açúcares fermentescíveis do substrato por meio de hidrólise enzimática, foram avaliados dois parâmetros: temperatura e tempo do pré-tratamento hidrotérmico de lignocelulósicos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos compreendem oito etapas distintas, seguidas para alcançar o objetivo principal do proposto Trabalho de Conclusão de Curso, sendo elas:

- a) caracterizar a amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*;
- b) pré-tratar hidrotérmicamente bagaço de cana-de-açúcar variando o tempo de e também a temperatura a que é submetida à amostra neste pré-tratamento;
- c) relatar as alterações morfológicas que este pré-tratamento causa sobre as diferentes partes constituintes da cana-de-açúcar presentes no bagaço;
- d) determinar as alterações químicas da fase sólida (biomassa) resultante após a etapa de pré-tratamento hidrotérmico, quantificando as modificações nos teores de celulose, hemicelulose, lignina, conteúdo celular e cinzas presentes;
- e) determinar os compostos presentes na fração líquida resultante após a etapa de pré-tratamento, para determinação quantitativa, de carboidrato, inibidores da atividade enzimática e outros possíveis compostos;
- f) determinar quantitativamente o teor de açúcares redutores totais (ARTs) e o teor de glicose resultantes da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratado;
- g) determinar o ganho máximo em ARTs por hidrólise enzimática, possíveis, para o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente;
- h) determinar os efeitos do pré-tratamento hidrotérmico sobre a hidrólise enzimática levando em conta os resultados obtidos para o processo como um todo (rendimento global).

1.3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Este trabalho foi organizado em quatro tópicos principais, nos quais são abordados os seguintes assuntos:

Nos Fundamentos Teóricos são apresentados os conceitos e fundamentos teóricos essenciais, onde se descreve os materiais lignocelulósicos e sua composição, com destaque e ênfase nos aspectos relevantes à realização e aos efeitos do pré-tratamento hidrotérmico em lignocelulósicos, com foco no bagaço de cana-de-açúcar, e sua influência na produção de açúcares fermentescíveis pelo processo de hidrólise enzimática, utilizando enzimas celulasas e hemicelulasas, descreve também os tipos e princípios de pré-tratamentos existentes e apresenta também dados atuais sobre a produção da cana-de-açúcar e do bagaço no Brasil, sua composição característica, formas de caracterização de lignocelulósicos e de quantificação dos açúcares redutores produzidos na etapa de hidrólise enzimática.

Nos Materiais e Métodos é apresentada a metodologia experimental adotada, relatando os reagentes, as vidrarias e equipamentos utilizados, bem como a forma de preparo e a composição das soluções empregadas nas análises experimentais, descreve os procedimentos de ensaios e análises físicas e químicas realizadas para a obtenção dos resultados, sendo descrito os procedimentos de amostragem, caracterizações químicas e físicas, pré-tratamento das amostras de bagaço de cana-de-açúcar e hidrólise enzimática, apresenta também o planejamento experimental adotado para verificar as condições de obtenção de açúcares fermentescíveis pelo método de resposta por superfície (MRS).

Nos Resultados são apresentados os dados experimentais obtidos e suas análises, pela realização dos procedimentos experimentais e análise destes pelos métodos propostos, sendo os principais métodos de avaliação: pré-tratamento por MRS e a quantificação de açúcares redutores totais (ARTs) e glicose resultantes da hidrólise enzimática.

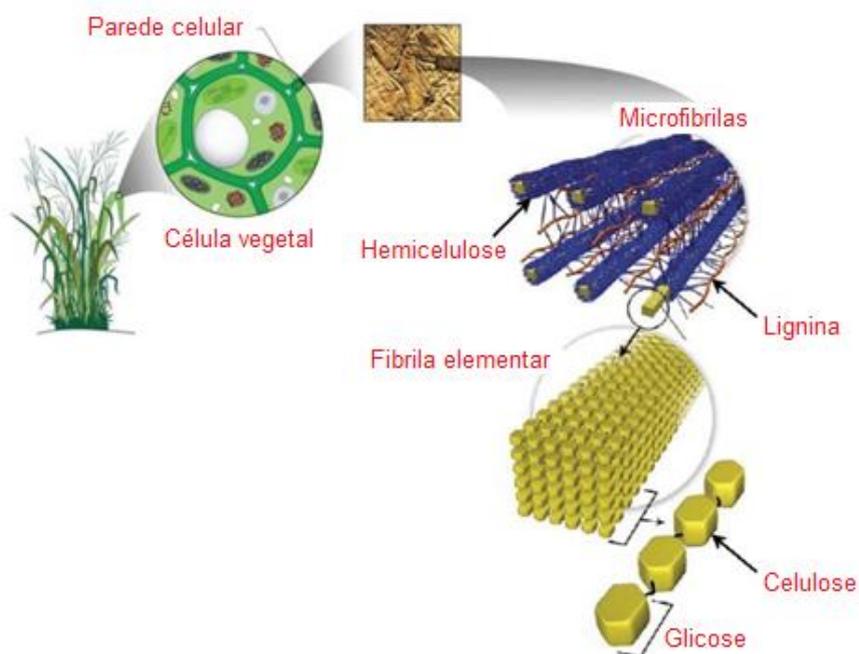
Nas Conclusões são apresentados os comentários finais e as conclusões obtidas sobre a avaliação do pré-tratamento hidrotérmico para a produção de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos (Figura 1) também denominado de material celulósico, “representam a mais significativa fração de fitobiomassa e a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera” (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 54). São constituídos principalmente de polímeros de carboidratos como a celulose e hemicelulose, que “representam até dois terços do material lignocelulósico” (GÍRIO et al., 2010, p. 4775), são constituídos ainda por uma fração de lignina e uma pequena fração de extratos e minerais.

Figura 1 - Arquitetura da parede celular vegetal - Estrutura básica de lignocelulósicos



Fonte: adaptado de Carvalho, Ferraz e Milagres (2011).

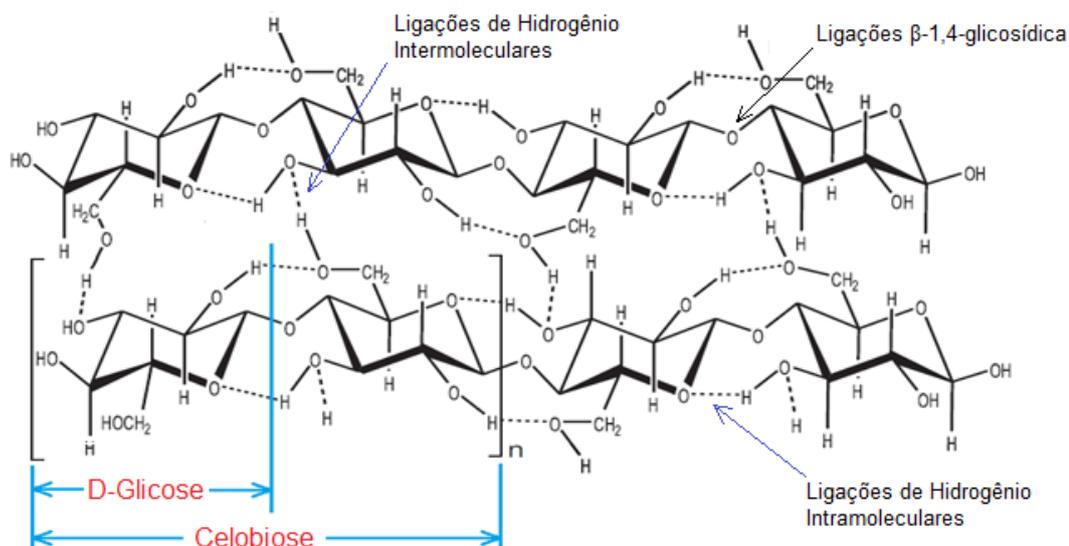
“As frações de celulose, hemicelulose e lignina correspondem a aproximadamente 90% da massa seca total do lignocelulósico” (PANDLEY et al. 2000, apud CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 54) em geral, a composição não depende unicamente do tipo de vegetal, possuindo significativas diferenças relacionadas às condições de desenvolvimento da planta, principalmente do clima e do solo, possui também diferenças de composição relacionadas às

diversas partes da planta, a idade de colheita, época de colheita e devido a outros fatores.

2.1.1 Celulose

A celulose é a principal fonte de carbono renovável e bioenergia da natureza, constituinte principal da parede celular vegetal sendo “cerca de 15% a 30% da massa seca da parede celular primária e até 40% [da massa seca] da parede celular secundária” (STICKLEN, 2008, p. 435). É um polímero linear de homopolissacrídeos, possibilitando a formação de ligações de hidrogênio intramolecular e intermolecular formando microfibrilas, constituídas por unidades de D-glicose (monômero), são unidas entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, e por celobiose (dímero) (Figura 2) formando fibrilas elementares, apresentando alta massa molecular, cristalinidade e um grau de polimerização de 100 a 20.000, conferindo uma elevada resistência à tensão e tornando a celulose rígida e insolúvel em um grande número de solventes o que pode explicar a sua resistência à atividade enzimática e microbiológica, já as ligações de hidrogênio, responsáveis pela manutenção da rede cristalina, tornam a celulose resistente a diversos tratamentos químicos (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; DING; HIMMEL, 2006 apud CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011).

Figura 2 - Estrutura molecular parcial da celulose com representação das ligações de hidrogênio supramolecular



Fonte: adaptado de Demirbas e Gupta, (2010) e Santos et al. (2012).

Na celulose ocorrem várias fases cristalinas decorrentes da interrupção das forças de Vander Waals e ligações de hidrogênio que ligam normalmente as microfibrilas dentro da rede cristalina, os fatores de estabilização da celulose são individualmente fracos, porém juntos formam laços fortes. “As ligações de hidrogênio intramoleculares entre as hidroxilas conferem resistência à celulose. Já as interações intermoleculares entre hidroxilas são responsáveis pela formação da fibra vegetal” (GENOMIC, 2010 apud SANTOS et al., 2012, p. 4).

A região da celulose que é altamente perturbada, com baixa cristalinidade, é referida como celulose amorfa e a região com alta cristalinidade é referida como celulose cristalina, “as regiões cristalinas de celulose são intercaladas com regiões amorfas menos ordenadas” (POLIKARPOV; SERPA, 2011, p. 98), influenciando na porosidade da microfibrilas e na área superficial interna. “A formação de ligações de hidrogênio é o principal fator que influencia as propriedades físicas da celulose, tais como solubilidade, reatividade e cristalinidade” (KONDO, 1997 apud SANTOS et al., 2012, p. 4).

Segundo Snider e Wolfenden (2001), Berner (2003) e Zhang et al. (2006) citados por Polikarpov e Serpa (2011, p. 98):

A molécula de celulose é muito estável, com uma meia-vida de vários milhões de anos para a clivagem espontânea das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ em temperatura ambiente, o que indica que praticamente toda a degradação da celulose na natureza é realizada por ação de enzimas.

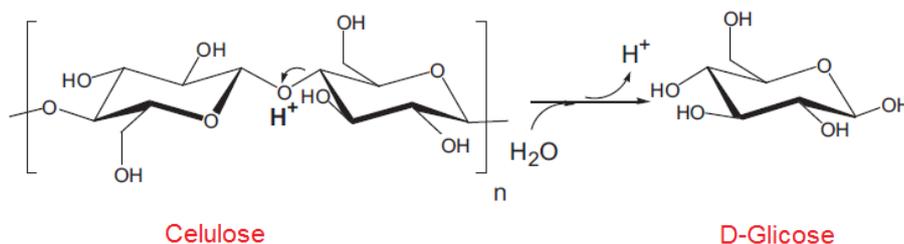
“É difícil para as enzimas atacarem as regiões cristalinas da celulose, e também devido à presença de lignina e hemicelulose que impedem este ataque” (HAYASHI; KAIDA, 2011, p. 45). O processo de hidrólise enzimática depende da área superficial do substrato disponível para as enzimas, o processo pode ocorrer tanto na superfície externa como na interna do substrato, o processo se inicia mais aceleradamente pelas regiões mais suscetíveis a reação, que são as regiões amorfas, pois possui maior acessibilidade às enzimas, sendo estas rompidas primeiramente, fator determinante para a taxa da hidrólise e considerado em muitos modelos cinéticos para o processo, nos quais se considera uma etapa sendo rápida e a outra lenta, uma vez que em pequenos poros apenas os componentes menores do complexo de celulasas podem entrar, tendendo a segregar as enzimas e reduzir a taxa de hidrólise.

O pré-tratamento hidrotérmico atua fracamente sobre a celulose em temperaturas abaixo de 230°C, porém a parte hidrolisada da celulose se transforma basicamente em D-glicose (monômero), celobiose (dímero) e produtos da degradação da D-glicose, os quais são 5-hidroximetilfurfural, ácido levulínico e ácido fórmico (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999).

2.1.1.1 D-glicose e Celobiose

A D-glicose de cadeia linear é o carboidrato mais importante e abundante na natureza, presente tanto na celulose quanto na hemicelulose de gramíneas, sendo utilizado como fonte de energia e intermediário metabólico nos processos biológicos. A hidrólise da celulose catalisada por íons hidrônio (Figura 3) ocorre pela clivagem das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ levando a formação de D-glicose, quando a reação é completa, ou formando a celobiose, que é um dissacarídeo constituído por duas unidades de D-glicose segundo Ogeda e Petri (2010) ligadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, sendo esta o produto da hidrólise incompleta da celulose.

Figura 3 - Mecanismo de degradação da celulose catalisada por íons hidrônio, resultando em D-glicose



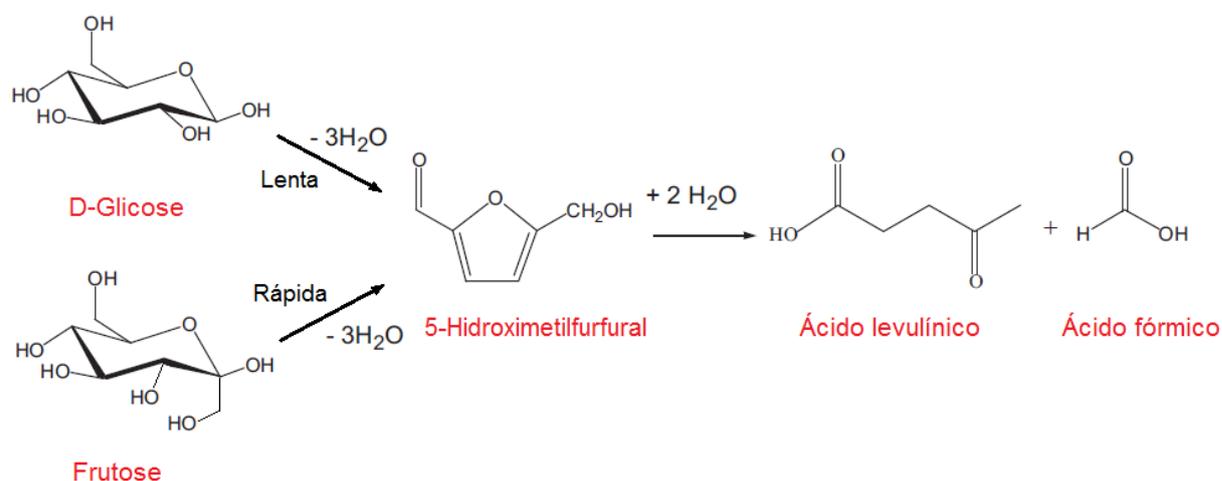
Fonte: adaptado de Demirbas e Gupta (2010).

A presença de celobiose e D-glicose diminuem significativamente a taxa de hidrólise enzimática da celulose, sendo considerados inibidores das celulases, “a glicose e a celobiose permanecem no mesmo meio que a celulose e as celulases” (OGEDA; PETRI, 2010, p. 1555). A celobiose exerce forte inibição na atividade da celulase e a D-glicose inibe esta atividade em menor escala.

2.1.1.2 5-Hidroximetilfurfural, Ácido Levulínico e Ácido Fórmico

São produtos de degradação das unidades básicas de hexoses, principalmente da degradação da D-glicose e da frutose, e são altamente solúveis em água. Sob temperaturas elevadas ocorre a desidratação da molécula de açúcar e a formação do 5-hidroximetilfurfural, o qual passa por uma reidratação formando ácido levulínico e ácido fórmico (Figura 4) (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999).

Figura 4 - Mecanismo de desidratação da D-glicose e frutose, resultando em 5-hidroximetilfurfural, e mecanismo de reidratação do 5-hidroximetilfurfural, resultando em ácido levulínico e ácido fórmico



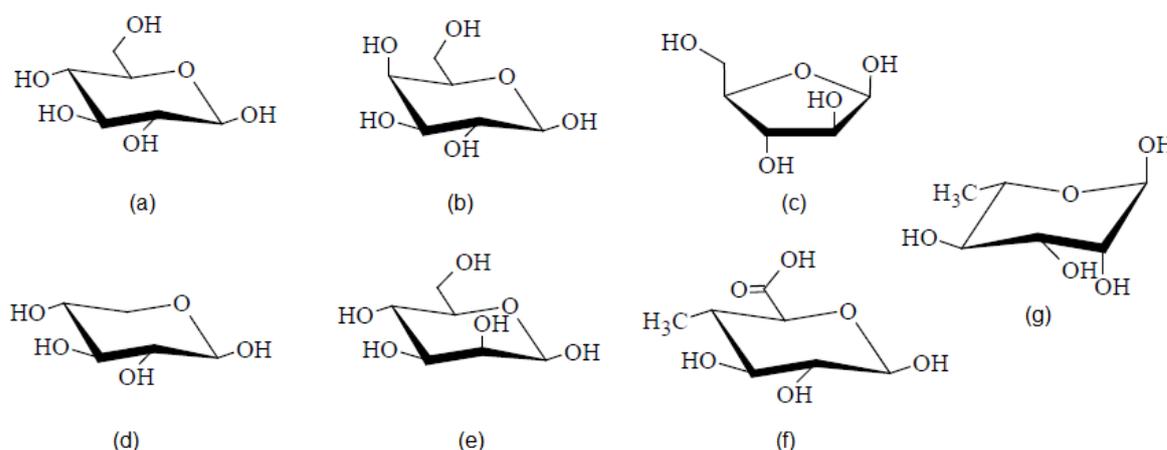
Fonte: o autor (2012).

Segundo Gírio et al. (2010) o aumento da temperatura e do tempo de tratamento aumentam a quantidade de monômeros hidrolisados e também aceleram o processo de degradação dos açúcares, de forma sensível e significativa. Deve-se adequar a temperatura e o tempo de residência do pré-tratamento hidrotérmico para evitar a produção destes produtos de degradação, tóxicos, e segundo Loureiro et al. (2011) estes agem como fortes inibidores enzimáticos e do crescimento microbiológico, ou seja, a presença destes afeta diretamente o processo de hidrólise enzimática, reduzindo assim a eficiência e o rendimento final em açúcares fermentescíveis.

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose ou poliose é um heteropolissacarídeo complexo e ramificado que “representa em geral de 15% a 35% da biomassa, constituída por pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glucurônico, α -D-4-O-metil-galactorônico, α -D-galactorônico)” (GÍRIO et al., 2010, p. 4775) e ainda pequenas parcelas de desoxiexoses (α -L-ramnose, α -L-fucose) (Figura 5). É uma estrutura amorfa de baixa massa molecular “30.000 ou menos” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 70) presente na parede celular do lignocelulósico, “parcialmente solúvel em água. A quantidade de cada componente varia de espécie para espécie e mesmo entre as partes da mesma planta.” (POLIZELI et al., 2011, p. 120).

Figura 5 - Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses: (a) D-glicose; (b) D-galactose; (c) L-arabinose; (d) D-xilose; (e) D-manose; (f) 4-O-metil-D-glucurônico e (g) ramnose

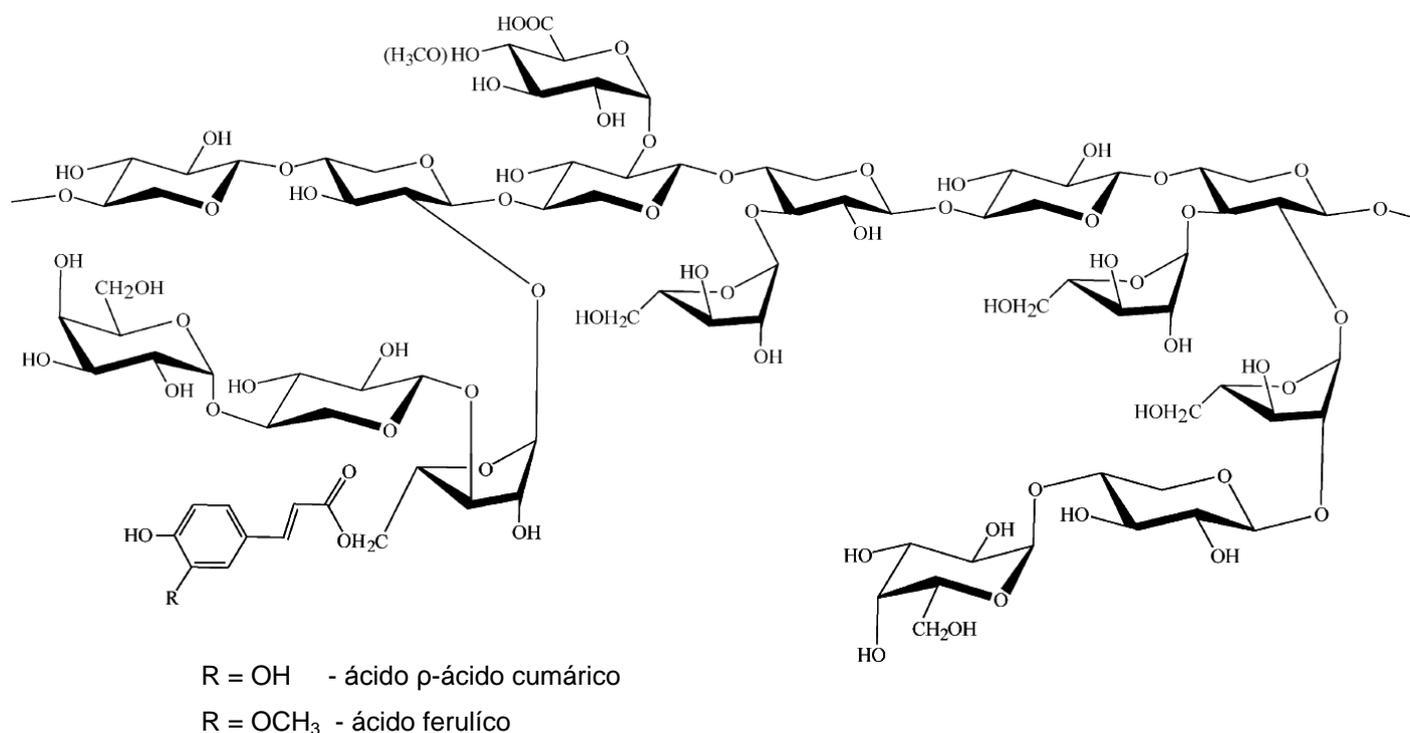


Fonte: Sjostrom (1992 apud Martins, 2005).

A cadeia principal de uma hemicelulose (Figura 6) pode-se constituir de uma só unidade (homopolímero), como a xilana, ou de duas ou mais unidades (heteropolímero) que podem ser glucomananas, glucoronoxilanas, galactoglucomananas, arabinoglucoronoxilanas, xiloglucanas ou arabinoxilanas, diferentes tipo de lignocelulósico possuem diferentes estruturas (GÍRIO et al., 2010; OGEDA; PETRI, 2010).

Os grupos hidroxila presentes nestes açúcares podem ser parcialmente substituídos por grupos acetila, os quais durante o processo de pré-tratamento hidrotérmico são clivados produzindo ácido acético (GÍRIO et al., 2010).

Figura 6 - Estrutura molecular parcial da hemicelulose proposta para gramíneas



Fonte: adaptado de Polizeli et al. (2011).

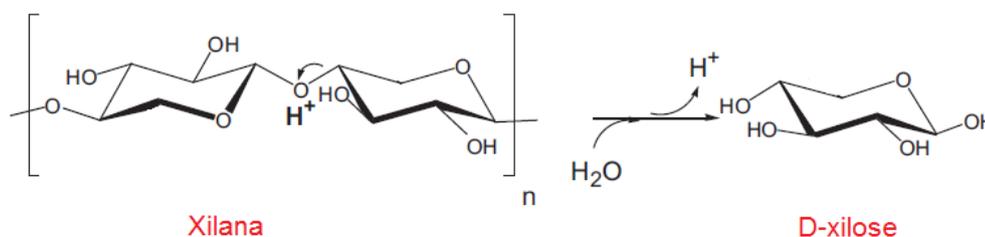
O rompimento estrutural da hemicelulose pela hidrólise forma principalmente os monômeros glucoronoarabinoxilanas (GAX) e xiloglucanas (XyG), constituintes principais da estrutura da hemicelulose de gramíneas, as quais interagem com as microfibrilas de celulose pela formação de pontes de hidrogênio, contribuindo assim para a integridade estrutural da rede celulósica (BUCKERIDGE; SANTOS; SOUZA, 2010; GÍRIO et al., 2010).

Os monossacarídeos presentes na hemicelulose de gramíneas são aproximadamente 40 % de D-xilose, 30% arabinose e galactose e 6% de D-glicose nas folhas. Frutose, ramnose e ácidos urônicos estão presente em pequenas proporções, cerca de 1% a 2% do total de hemiceluloses (SCHÄDEL et al., 2010).

2.1.2.1 D-xilose

A D-xilose é uma pentose, açúcares que contém cinco carbonos na sua estrutura molecular, “é o principal açúcar hemicelulósico das matérias-primas de maior interesse” (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJO, 1999, p; 192). A hidrólise da xilana, constituinte da hemicelulose e o “segundo polissacarídeo mais abundante na natureza” (BEG et al. 2001, apud POLIKARPOV; SERPA, 2011, p. 105), catalisada por íons hidrônio (Figura 7) ocorre segundo Hayashi e Kaida (2011) pela clivagem das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ levando a formação de D-xilose.

Figura 7 - Mecanismo de degradação da xilana catalisada por íons hidrônio, resultando em D-xilose



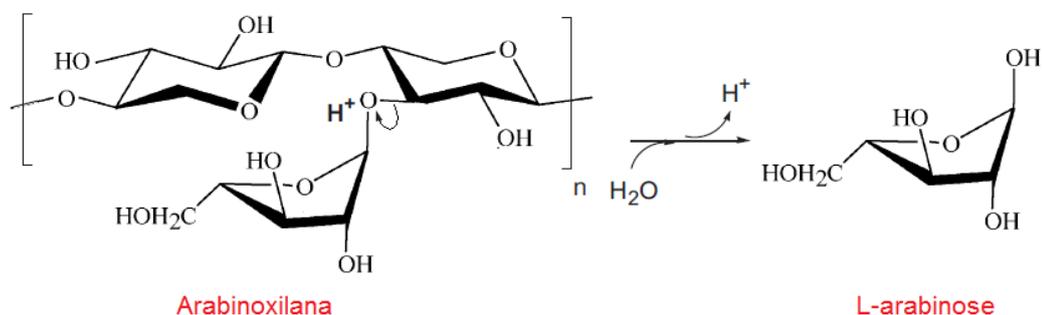
Fonte: o autor (2012).

A fermentação da xilose para produção de etanol segundo Goldman (2011) é uma alternativa para aumentar a produção do combustível, porém é necessário um processo de desintoxicação da fase líquida, devido há diversos inibidores presentes, normalmente, além de utilizar hemicelulases eficientes, e segundo Gírio et al. (2010) estes microorganismos são menos tolerantes ao etanol, pH, hidrolisados e inibidores.

2.1.2.2 L-arabinose

A L-arabinose é uma aldopentose, monossacarídeo que contém cinco carbonos na sua estrutura molecular, e possui um grupo funcional de aldeído em uma das suas terminações. A hidrólise da arabinoxilana, clivagem das ligações entre xilana e arabinose, catalisada por íons hidrônio (Figura 8) ocorre pela clivagem das ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow2)$ e ou clivagem das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$, levando a formação de L-arabinose (BURANOV; MAZZA, 2008).

Figura 8 - Mecanismo de degradação de arabinoxilanas catalisada por íons hidrônio, resultando em L-arabinose e xilana (suprimida do mecanismo).



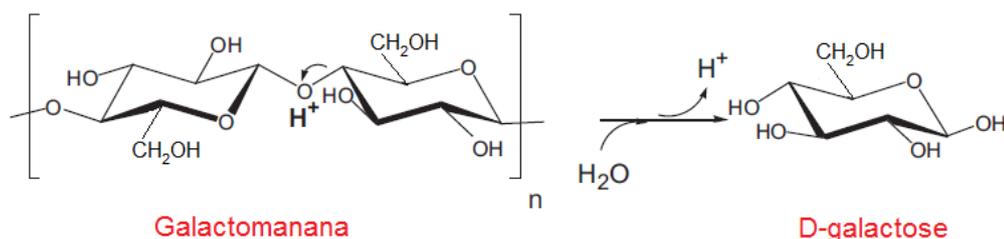
Fonte: o autor (2012).

A forma L-arabinose é mais abundante na natureza do que a forma D-arabinose, ao contrário dos outros monossacarídeos presentes nas gramíneas. Nas estruturas arabinoglucoronoxilanas a L-arabinofuranose está ligada por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow2)$ e por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow3)$ (TIMELL, 1965; WOODWARD, 1984 apud GÍRIO et al., 2010).

2.1.2.3 D-galactose

A galactose é uma hexose, açúcares que contém seis carbonos na sua estrutura molecular, e segundo Gírio et al. (2010) está presente em pequena quantidade na parede secundária do lignocelulósico. A hidrólise da galactomanana catalisada por íons hidrônio (Figura 9) ocorre pela clivagem das ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ levando a formação de D-galactose.

Figura 9 - Mecanismo de degradação da galactomanana catalisada por íons hidrônio, resultando em D-galactose



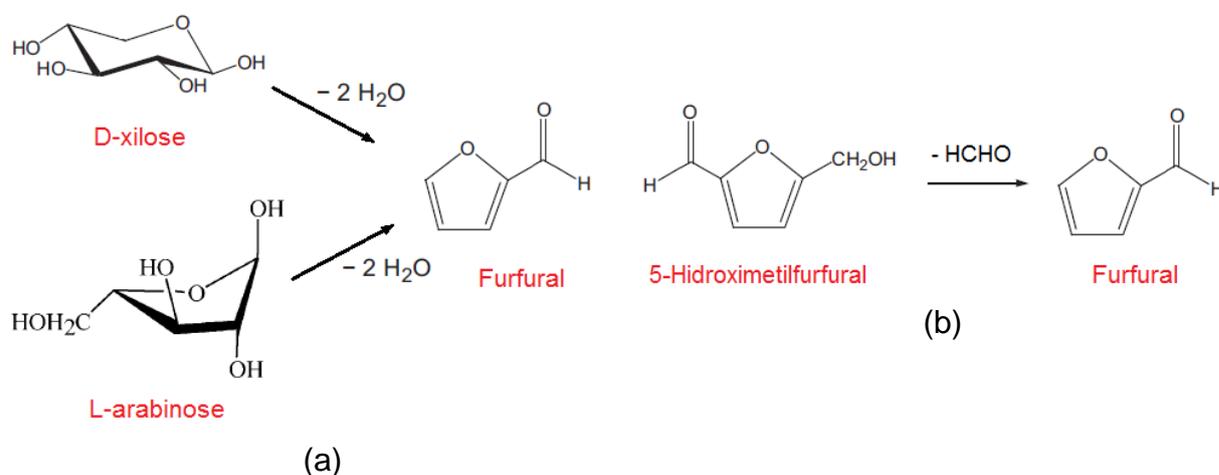
Fonte: o autor (2012).

Ácido ferúlico, ácido acético e outros estão ligados à galactose, ocorrendo durante o processo de pré-tratamento a produção destes inibidores tanto pela clivagem quanto pela degradação da galactose (LOUREIRO et al., 2011).

2.1.2.4 Furanos

Os principais produtos de degradação são furanos, sendo 2-furaldeído (furfural) produzidos pela degradação das unidades básicas de pentoses, açúcares que contém cinco carbonos na sua estrutura molecular, principalmente xilose e arabinose. Já o 5-hidroximetilfurfural é derivado da degradação de hexoses como anteriormente já descrito (HAMES, 2009). Há temperaturas elevadas ocorre à desidratação destas moléculas de pentose e a formação de furfural, o qual pode ser originado também pela degradação do 5-hidroximetilfurfural (Figura 10), e a degradação destes furanos gera fenóis.

Figura 10 - Obtenção de 2-furaldeído (furfural): (a) Mecanismo de desidratação de pentoses (xilose e arabinose); (b) Degradação do 5-hidroximetilfurfural



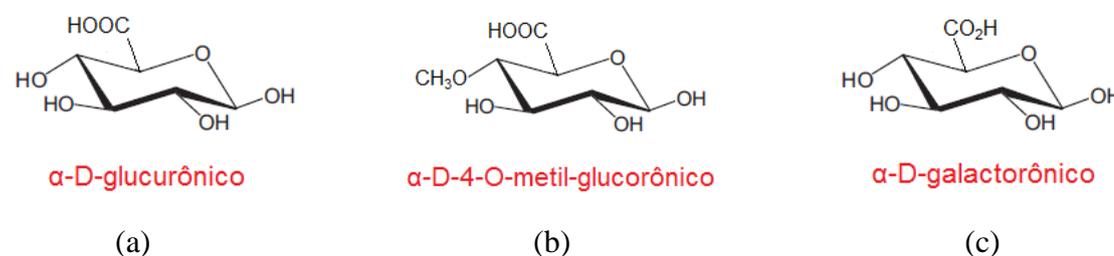
Fonte: o autor (2012).

Da mesma forma que o descrito para o 5-hidroximetilfurfural deve-se evitar a produção destes furanos, tóxicos, que também agem como fortes inibidores enzimáticos e do crescimento microbiológico, “levando a menores rendimentos de etanol e produtividade e, portanto, pode ser necessária a realização de um tratamento de desintoxicação prévio” (GÍRIO et al., 2010 p. 4779).

2.1.2.5 Ácidos Urônicos

Os ácidos urônicos são ácidos carboxílicos derivados da oxidação de aldohexoses, açúcares que contém seis carbonos na sua estrutura molecular e um grupo aldeído em sua terminação, principalmente β -D-glicose, α -D-galactose nas gramíneas. Presentes em pequenas quantidades devido à oxidação das hidroxilas terminais destas estruturas, resultando nos ácidos α -D-glucurônico, α -D-4-O-metil-glucorônico e α -D-galactorônico (Figura 11) (SCHÄDEL et al., 2010).

Figura 11 - Ácidos urônicos formados: (a) α -D-glucurônico; (b) α -D-4-O-metil-glucorônico e (c) α -D-galactorônico



Fonte: o autor (2012).

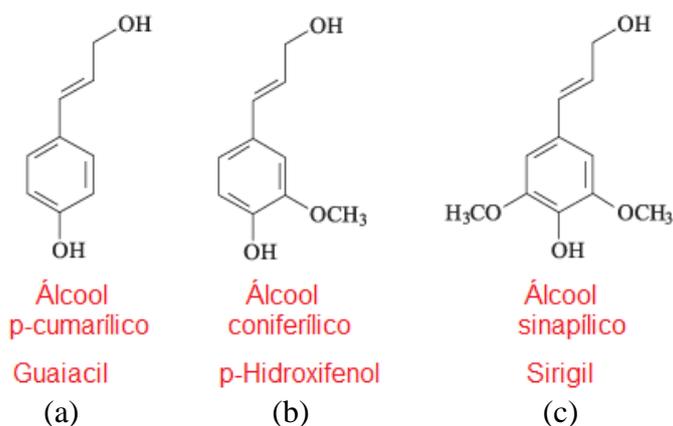
Os ácidos urônicos também têm sido sugeridos como contribuintes para a formação de íons hidrônio, juntamente com a auto-ionização da água e do ácido acético no pré-tratamento hidrotérmico (CONNER, 1984 apud DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999; GÍRIO et al., 2010).

2.1.3 Lignina

A lignina é a maior fração não polissacarídica presente em lignocelulósicos. Encontrada na lamela média e na parede secundária das células do lignocelulósico, é uma macromolécula estereoquimicamente complexa tridimensional, com diversas ligações cruzadas, altamente ramificada e amorfa, “é um polímero fenólico heterogêneo hidrofóbico e uma de suas principais funções fisiológicas é ‘cimentar’ as fibras de celulose na planta” (POLIKARPOV; SERPA, 2011, p. 107) forma ligações covalentes com a hemicelulose e sua formação não é totalmente compreendida, “formada por polimerização radicalar dos fenolpropanóides” (CARVALHO; FERRAZ;

MILAGRES, 2011, p. 54). A lignina presente em gramíneas é composta principalmente de três unidades básicas: guaiacil, *p*-hidroxifenol e sirigil derivadas de seus precursores primários de fenolpropanóides: álcool coniférico, álcool *p*-Cumarílico e álcool sinapílico (Figura 12), cada tipo de lignocelulósico possui sua característica de formação (ZHOU et al., 2010).

Figura 12 - Alcoóis precursores das unidades fenolpropanóides: (a) álcool *p*-cumarílico (guaiacil); (b) álcool coniférico (*p*-hidroxifenol); (c) álcool sinapílico (sirigil)

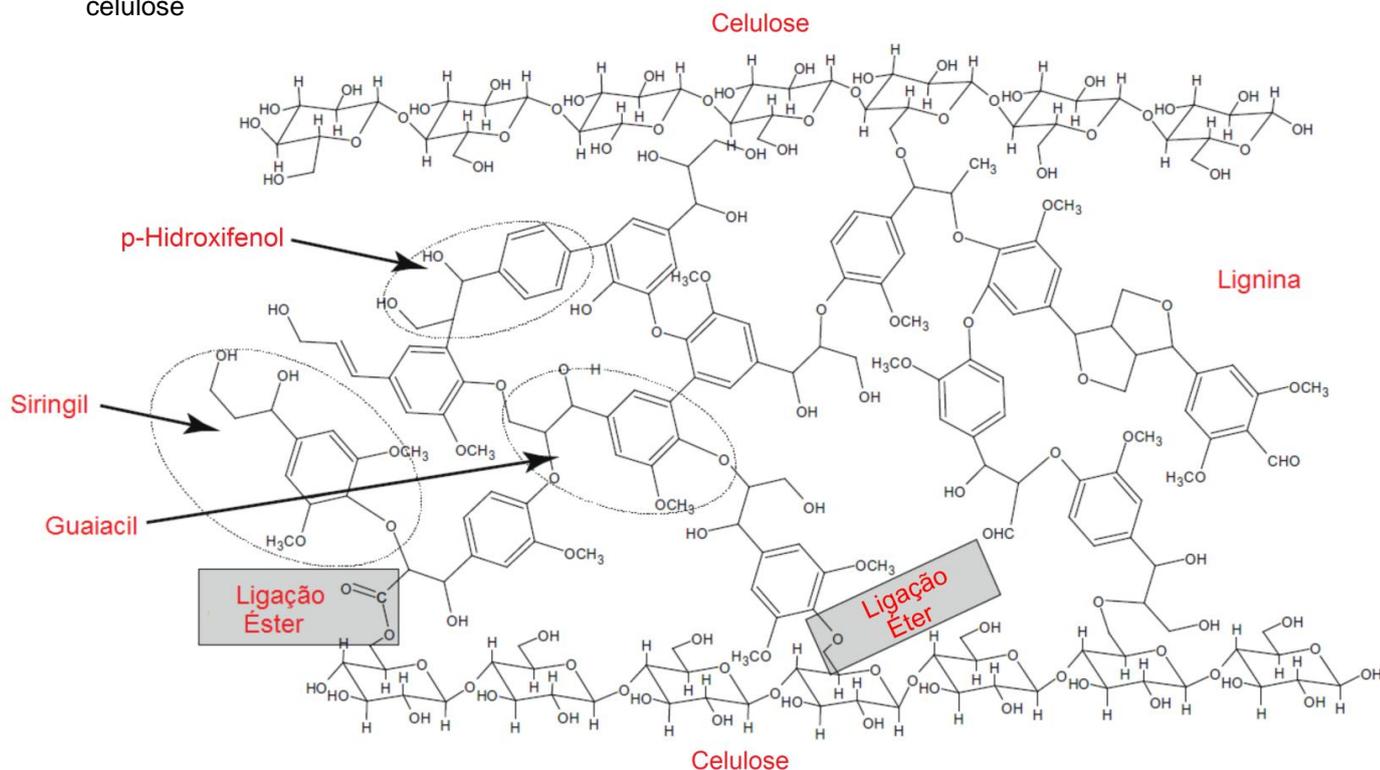


Fonte: adaptado de Buranov e Mazza (2008).

O estudo das ligações químicas entre os principais componentes estruturais das paredes das células vegetais, celulose, hemicelulose e lignina, é importante para a compreensão da fisiologia da formação de celulose e da deposição de lignina, e principalmente na escolha e desenvolvimento de métodos eficazes na remoção da lignina (ZHOU et al., 2010).

A lignina (Figura 13) é incorporada como o último componente na célula, envolvendo as microfibrilas celulósicas e assim fortalecendo a parede celular. Confere resistência mecânica e proteção à degradação química e biológica, reduzindo a acessibilidade à celulose e à hemicelulose. A lignina está presente em diferentes teores nos lignocelulósicos, sendo que as gramíneas apresentam os menores teores de lignina, enquanto as coníferas são mais ricas em lignina (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

Figura 13 - Estrutura molecular parcial da lignina e possíveis ligações éster e éter da lignina com a celulose

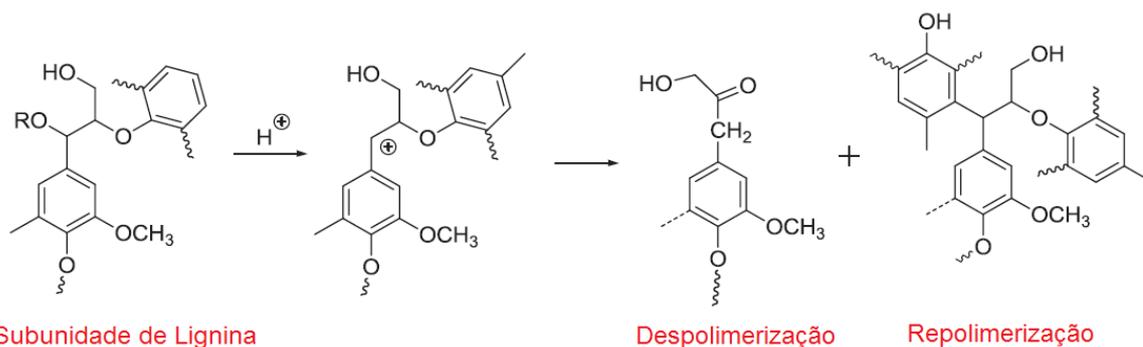


Fonte: Zhou et al. (2010).

“A lignina só é removida em quantidades limitada durante o pré-tratamento, porém ocorre a redistribuição da fibra devido a reações de despolimerização e repolimerização” (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 60-61), através de carbocátion intermediário (Figura14).

As reações de despolimerização e repolimerização podem ocorrer em meio aquoso. A repolimerização da lignina ocorre na presença de ácidos orgânicos liberados durante o pré-tratamento hidrotérmico produzindo produtos de condensação insolúveis (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999).

Figura 14 - Mecanismo parcial de despolimerização e repolimerização de subunidades de lignina

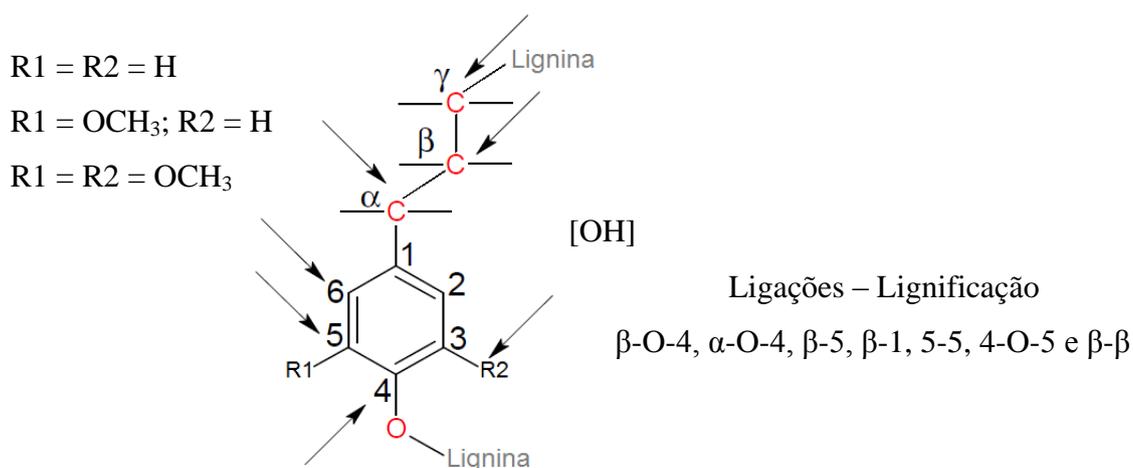


Fonte: Samuel et al. (2011).

As unidades aromáticas condensadas, ou altamente fundidas, tem menor grau de liberdade em sistemas com solventes iônicos líquidos, reduzindo significativamente as taxas de hidrólise enzimática (SAMUEL et al., 2011). A remoção apenas parcial da hemicelulose e a realocação da lignina já são fatores suficientes para aumentar as taxas de hidrólise enzimática, sendo que esses fatores são mais importantes do que a ruptura da estrutura da parede celular e modificação da cristalinidade da celulose (PALONEN et al., 2004 apud CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011).

A conversão eficiente de lignocelulósicos em açúcares fermentescíveis e os custos de produção dependem diretamente da presença de lignina no material. Por este motivo estudam-se materiais com quantidades reduzidas de lignina em sua estrutura, a qual apresenta uma série de sítios reativos (Figura 15) presentes na cadeia principal e nas ramificações, os quais sofrem diferentes reações dependendo das condições reacionais.

Figura 15 - Sítios reativos das unidades precursoras da lignina



Fonte: adaptado de Buranov e Mazza (2008).

Dependendo das condições do processo de deslignificação do lignocelulósico adotadas, “a remoção da hemicelulose e a redistribuição da lignina aumentam o volume de poros e a área interna do material pré-tratado, facilitando a acessibilidade das enzimas para subsequentes hidrólises da celulose” (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 61).

2.1.3 Extrativos e Cinzas

Os materiais lignocelulósicos possuem uma pequena quantidade de extrativos, que são compostos de baixa massa molecular e ainda uma parcela denominada de cinzas, nestas categorias se incluem os materiais extracelulares e os que não fazem parte da estrutura da parede celular, são todos facilmente extraídos utilizando água ou solventes orgânicos tais como etanol ou hexano (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011; HAMES, 2011). “Proteínas e alguns sais, por outro lado, podem ser completamente insolúveis nos solventes utilizados para remoção dos extrativos” (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 55).

Os componentes inorgânicos presentes em lignocelulósicos são usualmente incluídos no chamado teor de cinzas, “alguns sais inorgânicos podem ser solubilizados, sendo a sílica a constituinte principal das cinzas estruturais livre de extrativos” (HAMES, 2011, p. 148). Dentre os componentes orgânicos, extrativos, encontram-se os compostos envolvidos no metabolismo das células da planta, como açúcares residuais, aromáticos, ácidos graxos, resinas, comumente associados com propriedades como cor, cheiro e sabor (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011).

2.2 CANA-DE-AÇÚCAR

A planta tem origem segundo Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB) (2009), Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) (2011a) e União da Indústria de Cana-de-açúcar (ÚNICA) (2010) no Sudeste Asiático e tem sido cultivada desde a pré-história, acredita-se que o centro de origem da espécie *Saccharum officinarum* seja a Melanésia (Oceania) e depois disseminada pelo homem por todo o Sudeste Asiático.

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene, com ciclo fotossintético do tipo C4, cultivada em regiões tropicais e subtropicais, é composta basicamente de duas partes: uma subterrânea (rizomas e raízes) e outra aérea (colmo, folhas e flores), o colmo é constituído de nós e entrenós, devido às suas características, a cana é uma planta que tem alto poder de conservação do solo (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008; CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009).

O clima ideal para a produção da cana-de-açúcar é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo; seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e consequente acúmulo de sacarose (BRASIL, 2007b, p. 10).

As folhas secas e verdes juntamente com as pontas são denominadas de palha e constitui-se basicamente de fibras, e o colmo é constituído de 65% a 75% de água, 8%-14% de fibras, 10% a 17% de sacarose e 0,5% a 1% de açúcares redutores, sendo a sacarose e os açúcares redutores a principal matéria-prima para a produção de açúcar e álcool (etanol) (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008; CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009).

2.2.1 Classificação Botânica

A cana-de-açúcar é classificada hierarquicamente, observando-se o que preceitua o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (CINB), como pertencente ao domínio *Eukaryota*, reino *Plantae*, divisão *Embryophyta*, subdivisão *Magnoliophyta*, classe *Liliopsida*, subclasse *Commelinidae*, ordem *Cyperales*, família *Poaceae*, tribo *Andropogonae*, subtribo *Saccharininae*, gênero *Saccharum*, principais espécies *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi*, *Saccharum robustum* e *Saccharum edule* (LUCCHESI, 2001).

2.2.2 Cana-de-Açúcar no Brasil

O negócio da cana-de-açúcar no Brasil é tão antigo quanto à própria colonização do país, o primeiro engenho data de 1532, as primeiras mudas oriundas da Ilha da Madeira foram introduzidas no país pelos portugueses por volta de 1515, por dois séculos dominou a economia brasileira com a produção de açúcar e cachaça, nas últimas décadas a indústria canavieira se reinventou com novas tecnologias e novos mercados, e está cada vez mais relevante para o agronegócio e

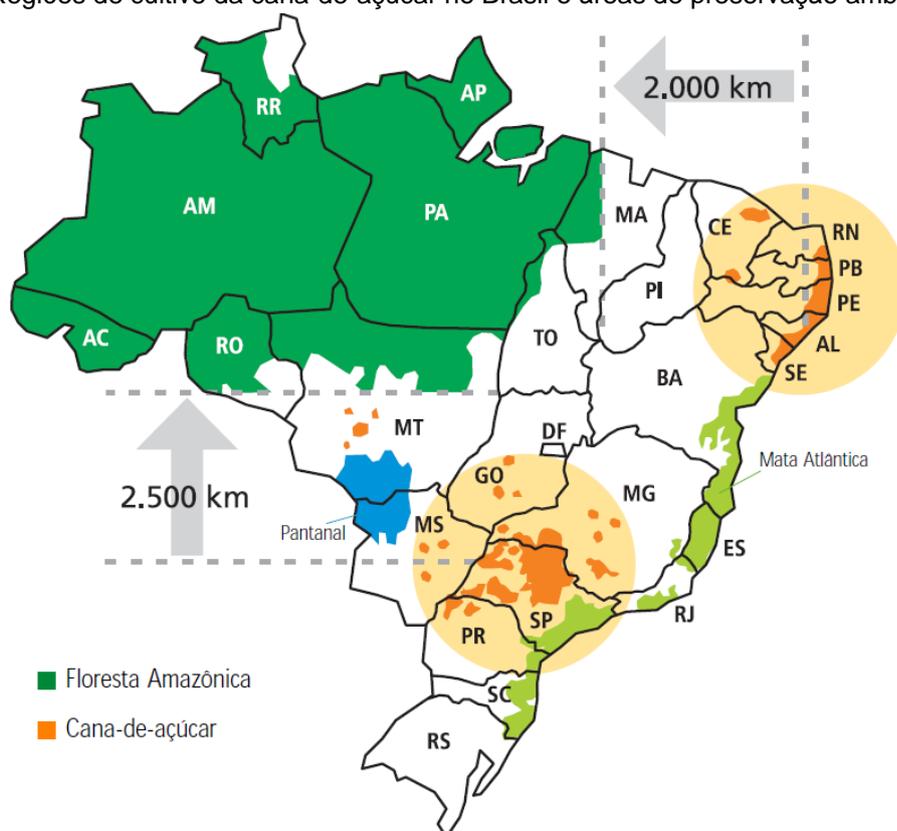
energia no país (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009; UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2010).

“O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo” (ABRAMOVAY, 2009 p.24), “respondendo sozinho por 45% de todo o produto comercializado no mundo” (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009, p. 14), é cultivada no sistema convencional, em solos bem preparados com consumo médio de mudas por hectare de 15 toneladas no plantio manual e ultrapassando 20 toneladas no plantio mecanizado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011a). Segundo estimativas da CONAB (2011a) o país na safra 2010/11 possuía uma área cultivada de cana-de-açúcar de 8.056,0 mil hectares com colheita de 623,905 milhões de toneladas, na safra 2011/2012 possuirá 8.368,4 mil hectares, porém a previsão do total de cana moída na safra 2011/2012 é de 571.471,0 milhões de toneladas, com queda de 8,4% em relação à safra 2010/11. Estima também a produtividade média brasileira para a safra 2011/2012 em 68.289 kg/ha, 11,8% menor que a da safra 2010/2011, que foi de 77.446 kg/ha.

A diminuição da produtividade nesta safra está ligada a diversos fatores e o clima é o principal. A estiagem ocorrida de abril a outubro de 2010, a escassez de chuvas no mês de maio de 2011, a ocorrência de geadas em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná e o florescimento em excesso de boa parte da lavoura, fizeram a queda da produtividade ser a maior dos últimos anos (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011a, p. 9).

A área plantada de cana-de-açúcar está em expansão, como a legislação brasileira não permite novos cultivos da planta nos estados de Amazonas e Pará, a expansão da cana ocorre principalmente nas Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Figura 16), sendo o maior percentual de aumento na região Sudeste, responsável por 38,04% do total da área nova agregada, estima-se que a área total agregada deve ficar em 697.770,9 hectares para a safra 2011/2012. A área de cana cultivada no Amazonas e no Pará é de 15 mil hectares, o que representa uma pequena fração apenas 0,05% do total de área desses dois Estados somados (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011a).

Figura 16 - Regiões de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e áreas de preservação ambiental



Fonte: Universidade de Campinas (UNICamp), Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Centro de Tecnologia Canaveira (CTC) (2007 apud CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA 2009; ABRAMOVAY, 2009).

Estima-se que o estado do Rio Grande do Sul (RS) será responsável por uma pequena parcela da produção de cana no país, com área planta de 1,7 mil hectares na safra 2011/2012 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011a). O Decreto 6.961, de 2009, define o RS como propício para plantio da cana e para indústrias de açúcar e etanol, hoje há no estado o projeto de uma usina na cidade de São Luiz Gonzaga, NOROBIOS, e uma potencial iniciativa da empresa BSBios Energia Renovável, juntamente com a Petrobras Biocombustíveis (PBio), para produção de etanol na unidade produtora de biodiesel, desta parceria, localizada na cidade de Passo Fundo (KAKUTA, 2012).

“A partir da cana se produz tanto o açúcar quanto o álcool, e a porcentagem destinada a uma produção ou outro depende da demanda de mercado de cada produto e dos preços relativos” (BRASIL, 2007a, p. 37), segundo estimativas da CONAB (2011a) na safra 2011/2012 serão esmagadas 283.906,5 milhões de toneladas de cana para produção de 36,9 milhões de toneladas de açúcar e

287.564,5 milhões toneladas de cana para a produção total de 22.857,6 bilhões de litros de etanol 17,2% menor que a produção da safra 2010/2011.

“O setor sucroalcooleiro tem 437 unidades produtoras, sendo 168 produtoras de álcool, 16 de açúcar e 253 de açúcar e álcool” (BRASIL, 2012). Passa por um momento de crescimento do mercado interno e externo em razão da tendência da procura de outras fontes de energia para substituir o petróleo, com menor custo energético, e devido à preocupação mundial com a preservação ambiental com consequente busca por alternativas de energia renovável (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009).

2.2.3 Bagaço de Cana-de-Açúcar

O bagaço da cana-de-açúcar é um resíduo sólido do colmo da planta e um dos resíduos agrícolas de maior importância no Brasil, resultante em grande quantidade do processamento da cana-de-açúcar pelas indústrias sucroalcooleiras, “a proporção desse resíduo depende da quantidade de fibras que as particulares cultivares de cana apresentam” (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011b, p.22). Segundo Demirbas e Gupta (2011) para cada tonelada de cana-de-açúcar (queimada e cortada) são produzidos 130 kg de bagaço seco, a produção global é estimada em 200 milhões de toneladas por ano, com maior produção no Brasil, Índia, China e Tailândia. “De um modo geral, o material genético em uso no país apresenta um teor aproximado de 270 a 290 kg de bagaço (com 50% de unidade) em cada tonelada de cana processada” (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011b, p 22), na safra de 2010/2011 estima-se que o Brasil tenha produzido cerca de 173 milhões de toneladas de bagaço úmido (50% umidade) CONAB (2011a).

“A quantidade de bagaço produzida a cada ano é uma proporção fixa do volume da cana processada nas usinas e destilarias” (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011b, p. 106), esta quantidade é variável, dependendo principalmente de fatores relacionados ao cultivo da cana-de-açúcar, o que resulta em quantidades diferentes por regiões de cultivo, a proporção entre o bagaço produzido e o total de cana-de-açúcar moída na região Centro-Sul é de 27,5%, sendo 24,4% utilizados como combustível, e na região Norte-Nordeste é de 28,9%,

sendo 24,6% utilizados como combustível, a média nacional resulta em 24,6% utilizado como combustível e 3,1% para outros usos, resultando no total 27,7%.

O bagaço é principalmente empregado para a geração de energia nas usinas, que requerem três tipos de energia: térmica, mecânica e elétrica, estas obtidas através da queima do bagaço em fornalhas para aquecimento das caldeiras para a produção de vapor, co-geração, no geral é aproveitada uma fração modesta deste resíduo agrícola (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2011b).

O Brasil já utiliza o bagaço para a produção, com restrição devido aos custos, do etanol de segunda geração, denominação que se dá ao etanol obtido através de diferentes processos derivados da fermentação de açúcares de origem hemicelulósica e celulósica, frações de materiais lignocelulósicos, através de um pré-tratamento adequado e enzimático de hidrólise da celulose e ou hemicelulose (DEMIRBAS; GUPTA, 2011). Este compete com a geração de energia nas usinas pela queima deste bagaço, co-geração, a qual se mostra economicamente favorável em relação à obtenção do etanol de segunda geração, processo ainda em fase de desenvolvimento da viabilidade técnica em escala comercial, sendo o processo de pré-tratamento do bagaço um dos principais gargalos para a competitividade econômica (CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA, 2009).

2.2.4 Composição Química do Bagaço de Cana-de-Açúcar

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar, material lignocelulósico, depende de diversos fatores relacionados ao cultivo da cana-de-açúcar, sendo os principais, a espécie, o tipo de solo, o clima, as técnicas de manuseio e colheita. Devido a isto, encontram-se na literatura especializada diversas análises da composição, ligeiramente diferentes, alguns dos estudos mais atuais realizados no Brasil relatam que é um material fibroso composto principalmente por celulose (40-60% da matéria seca), hemicelulose (20-40% da matéria seca) e lignina (10-25% da matéria seca), o bagaço de cana-de-açúcar é constituído segundo Goldenberg (2011) e Polizeli et al. (2011) de 46% de celulose, 25% de hemicelulose, 21% de lignina e 8% de outros constituintes, segundo Canilha et al. (2007) de 3,34% de celobiose, 46,20% de glicose, 0,30% de hidroximetilfurfural, 0,56% de ácido fórmico, 24,21% de xilose, 1,70% de arabinose, 1,25% de furfural, 1,09% de ácido

glucurônico, 2,64% de ácido acético, 2,61% de lignina solúvel, 23,66% de lignina insolúvel e 1,61% de cinzas.

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE LIGNOCELULÓSICOS E DERIVADOS

Existem inúmeros métodos de análise de lignocelulósicos descritos na literatura especializada que incluem o emprego de técnicas diversas, as quais possibilitam a caracterização física e química do lignocelulósico. Algumas técnicas são complexas, caras e com alta precisão nos resultados, podendo determinar diversos compostos de menor teor presente nos lignocelulósicos, e outras são simples e possuem um bom grau de precisão na determinação dos principais compostos do lignocelulósico, dentre estes métodos destacam-se, microscopia eletrônica de varredura (MEV), o método desenvolvido por Van Soest em 1967 para determinação do teor de fibras em lignocelulósicos e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.3.1 MEV

O microscópio eletrônico de varredura é uma das ferramentas de caracterização disponíveis mais utilizadas na revelação de detalhes estruturais. (KAPLAN; SCHEU, 2012).

Um feixe focado de elétrons é rasterizado através da amostra, e os sinais emitidos a partir da amostra são detectados como uma função da posição do feixe focado incidente de elétrons, este sinal reflete a topografia da amostra, pela interação do feixe com átomos na superfície da amostra e a imagem final em contraste e alta resolução é formada a partir destes sinais detectados, estes dados juntamente com a informação morfológica proveniente da amostra podem ser diretamente associados com as características microestruturais da amostra (KAPLAN; SCHEU, 2012; NIKLAS; SPATZ, 2012).

Para amostras biológicas a MEV convencional tem a desvantagem de que a amostra deve ser revestida com ouro ou carbono sob elevado vácuo, e a câmara de observação tem que ser evacuada, e as amostras só podem ser observadas se completamente secas ou congeladas criogenicamente (NIKLAS; SPATZ, 2012).

2.3.2 Método de Van Soest para Determinação de Fibras

A determinação de fibras segundo Van Soest e Wine (1968) pelo método sequencial, conhecido como Método de Van Soest, é baseado na separação das diversas frações fibrosas que constituem o lignocelulósico, por meio de reagentes específicos, denominados de detergentes neutros e detergentes ácidos. Este método quantifica os importantes constituintes com precisão superior a outros métodos existentes, por este motivo é um dos métodos mais utilizados para a determinação de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas e sílica presentes no material lignocelulósico. O método divide os constituintes em duas frações quanto à solubilidade destes compostos aos detergentes empregados, estas frações segundo Van Soest e Wine (1968) e Fuller et al. (2004) são:

- a) conteúdo celular: determinação da Fibra em Detergente Neutro (FDN) que engloba os nutrientes solúveis em detergente neutro, tais como lipídios, compostos nitrogenados, pectina, proteínas solúveis, açúcares, ácidos orgânicos e outros;
- b) parede celular: determinação da Fibra em Detergente Ácido (FDA) que solubiliza o conteúdo celular e a hemicelulose, além da maior parte das proteínas insolúveis, Van Soest e Wine (1968) propuseram um detergente ácido específico, que após a digestão por este detergente, o produto resultante será quase que na sua maioria lignina e celulose.

2.3.3 CLAE

A técnica de CLAE, nome mais aceito e utilizado no Brasil, sendo denominada e referenciada a esta mesma técnica como cromatografia de alta velocidade, de alta pressão, de alto desempenho ou de alta resolução.

Segundo Oliveira (2009) esta técnica consiste no fracionamento de substâncias, que emprega pequenas colunas preenchidas por materiais especialmente preparados, baseada nas diferentes velocidades com que cada uma delas migra através de um meio poroso ao ser eluída por um solvente em movimento, com capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos em poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Comenta também que a análise de carboidratos é um desafio para a

cromatografia, devido à diversidade dos carboidratos e as pequenas diferenças de propriedades químicas e físicas entre mono, di e trissacarídeos, não existindo uma única coluna capaz de separar todos, por essa razão seleciona-se uma coluna específica que melhor se adapte as condições.

Na caracterização de lignocelulósicos é empregada na determinação quantitativa direta de açúcares na fase aquosa e de componentes extrativos resultante de alguns métodos de pré-tratamento, determinando quais carboidratos são formados e quantificando-os, podendo ser considerados perdas do processo de pré-tratamento caso a fase aquosa não seja posteriormente processada, permite também a detecção e quantificação de produtos inibidores, que reduzem o rendimento da hidrólise enzimática, adotada para a obtenção de açúcares.

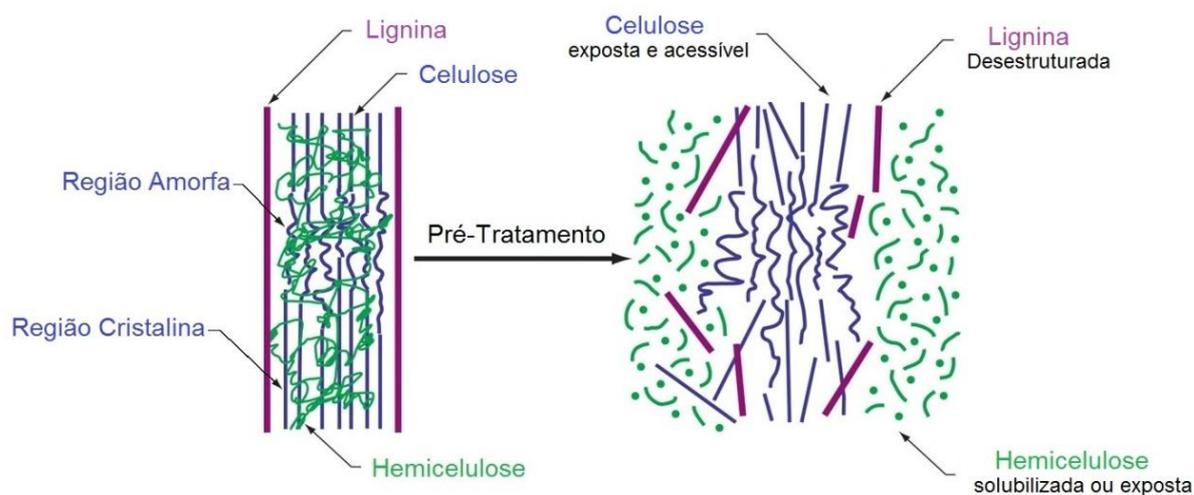
2.4 PRÉ-TRATAMENTO DE LIGNOCELULÓSICOS PARA PRODUÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS

A produção de açúcares fermentescíveis a partir de materiais lignocelulósicos é desafiador, pois normalmente as “hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20%” (GOSH; GHOSE, 2003 apud OGEDA; PETRI, 2010, p. 1552), sem pré-tratamento. Estes baixos rendimentos são devidos à complexidade estrutural natural do lignocelulósico, principalmente devido à presença da estrutura rígida de lignina que envolve a hemicelulose e a celulose, restringindo à suscetibilidade a degradação biológica e química desta, que possui também um alto grau de polimerização e cristalinidade, dificultando assim o acesso das enzimas as fibrilas elementares presentes na parede celular primária e secundária. A lignina adsorve as enzimas fisicamente aumentando a dificuldade do processo (OGEDA; PETRI, 2010). Já a estrutura da hemicelulose, que também envolve a celulose, é suscetível a ação enzimática de hidrólise e pode ser mais facilmente degradada que a lignina, sendo totalmente ou parcialmente solubilizada.

Segundo Carvalho, Ferraz e Milagres (2011), Domínguez, Garrote e Parajó (1999) e Demirbas e Gupta (2011) as tecnologias de pré-tratamento, em geral, são realizadas com a finalidade de alterar a estrutura do lignocelulósico (Figura 17), remover ou alterar a hemicelulose e a lignina, aumentar o volume de poros e a área superficial interna, reduzir o grau de polimerização e a cristalinidade, deixando as fibrilas elementares de D-glicose mais expostas e suscetíveis à digestão enzimática.

Há um aumento na acessibilidade da enzima a superfície da celulose, aumentando assim o rendimento de açúcares fermentescíveis, “o rendimento pode alcançar até [...] [valores maiores que] 90%” (GOSH; GHOSE, 2003 apud OGEDA; PETRI, 2010, p. 1552), e ainda reduzir a quantidade de enzimas necessárias para a conversão, com conseqüente redução de custos destas.

Figura 17 - Representação esquemática das alterações estruturais desejadas de um pré-tratamento eficiente sobre as microfibrilas do lignocelulósico



Fonte: adaptado de HSU et al. (1980 apud CARVALHO, FERRAZ E MILAGRES, 2011).

Um dos desafios desta tecnologia é realizar estas modificações estruturais da parede celular com a menor perda em açúcares possível, e, evitar ou minimizar a geração de inibidores da hidrólise enzimática, que são basicamente segundo Demirbas e Gupta (2011) furanos e ácidos fracos resultantes da degradação da celulose e da hemicelulose e ácidos fenólicos resultantes da degradação da lignina, durante o pré-tratamento, ou seja, melhorar a eficiência e o rendimento em açúcares fermentescíveis. Já o maior desafio é tornar o processo de pré-tratamento viável e atrativamente econômico, atualmente tem alto custo.

Segundo Demirbas e Gupta (2011, p. 91) as características desejáveis de um processo de pré-tratamento incluem:

- (1) utilização mínima de energia e produtos químicos, (2) ser adequado para uma variedade de fontes de biomassa, (3) requer o mínimo de capital e despesas operacionais, (4) ampliável para escala industrial, e (5) limitar a formação de produtos de degradação que inibem a fermentação microbiana.

Diversas são as tecnologias, os métodos de pré-tratamento e seus princípios, que são divididos basicamente em físicos, biológicos, químicos e combinação destes, são utilizados particularmente para cada tipo de lignocelulósico a fim de “evitar a degradação do substrato e maximizar o rendimento em açúcar” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 86). Segue uma breve descrição de algumas das técnicas mais relevantes e em desenvolvimento atualmente para o pré-tratamento de lignocelulósicos.

2.4.1 Pré-Tratamento Físico

Utiliza processos mecânicos, puramente físicos, para reduzir o tamanho das partículas de lignocelulósicos e romper a estrutura da parede celular “aumentando a área disponível e diminuindo a cristalinidade da celulose” (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 60), o que possibilita a acessibilidade das enzimas no processo posterior de hidrólise enzimática. Utilizam-se normalmente moagem ou trituração, porém outros “métodos não mecânicos tais como alta temperatura, ciclos de congelamento/descongelamento e irradiação de micro-ondas têm sido estudados para alterar características estruturais da celulose” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 91). São limitados quanto a sua eficácia e os requisitos de equipamento e energia dependem diretamente do tamanho da partícula desejada, consumindo grande quantidade de energia, mais do que o dobro da utilizada em outros métodos, para reduzir as partículas a uma escala milimétrica, e ainda possui grande desvantagem por ser um processo demorado (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011; DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

2.4.2 Pré-Tratamento Químico

São utilizados ácidos concentrados, ácidos diluídos, soluções alcalinas, amônia, solventes orgânicos, dióxido de enxofre, dióxido de carbono, ozônio e muitos outros químicos “para o fracionamento dos componentes da biomassa, aumentar a área superficial e aumentar o volume de poros e inchar a celulose” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 92). Em geral é utilizado ácido sulfúrico (H_2SO_4), porém outros ácidos como ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (H_2NO_3), ácido

fosfórico (H_3PO_4), ácido peracético ($C_2H_4O_3$) e outros ácidos orgânicos fracos (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

2.4.2.1 Ácidos

A denominação só se aplica a processos com pH abaixo de 2,0, este é o modelo de hidrólise mais utilizado, porém pode ser dividido em duas abordagens com base na temperatura (alta/baixa) e na concentração (concentrado/diluído), para pH acima deste valor ocorre competição da catálise do íon hidrônio com a catálise do íon hidroxila, ocorre o ataque às longas cadeias de hemicelulose quebrando-as para formar oligômeros mais curtos, que são hidrolisados para formar monossacarídeos (CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011; GÍRIO et al., 2010). A formação de ácidos conjugados leva a clivagem das ligações glicosídicas da celulose, a parte amorfa é clivada quase instantaneamente para suas unidades monoméricas de D-glicose, as quais são, fortemente, sujeitas a reação de degradação levando a formação de Hidroximetilfurfural e uma pequena fração de ácido fórmico, inibidores (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

Estes modelos possuem desvantagens quanto ao requisito de equipamento, que deve ser resistente ao ataque ácido, também há a formação de produtos inibidores da atividade enzimática, pois os açúcares (pentoses e hexoses) quando expostos ao ácido por longos períodos são convertidos, principalmente a furanos (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; GÍRIO et al., 2010).

O rendimento em açúcares fermentescíveis é aumentado com o aumento da concentração de ácido e de temperatura, “este método fraciona a maioria das hemiceluloses (75%-90%)” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 93), dependendo das condições, este modelo necessita de processo adicional para a recuperação do ácido e sua viabilidade econômica, sendo necessário à neutralização ou correção de pH antes dos posteriores processos, porém não necessita de um processo de hidrólise enzimática, pois tanto a celulose e a hemicelulose são convertidas em açúcares. “A maior vantagem do pré-tratamento ácido é a rápida taxa de reação, o que facilita o processamento contínuo” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 93).

2.4.2.1.1 *Ácido Diluído*

“Ácido diluído é um eficiente método de pré-tratamentos e adequado para a maioria das matérias-primas lignocelulósicas” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 92). A diluição de ácidos é utilizada principalmente para a remoção da hemicelulose do substrato e o modelo de pré-tratamento com diluição de ácidos em comparação a outros modelos com utilização de ácidos mais concentrados, possui como vantagens o consumo relativamente baixo de ácido juntamente com a redução do desgaste do equipamento, a exigência de energia para a recuperação do ácido é menor e sob condições controladas a quantidade de produtos de inibição, gerados pela degradação dos açúcares é baixa, porém a temperatura de reação aumenta e o rendimento reduz devido à redução da clivagem da celulose (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; GÍRIO et al., 2010).

2.4.2.1.2 *Ácido Peracético*

Este método merece destaque entre os métodos ácidos, pois possui um mecanismo um tanto diferenciado, sendo segundo Demirbas e Gupta (2011) o uso de ácido peracético (2-10%) em uma faixa de 25°C a 75°C causa deslignificação significativa de lignocelulósicos devido à ação oxidante do ácido, ocorrendo ainda redução da cristalinidade pelo inchaço estrutural, destaca ainda que a maioria das hemiceluloses é retida na fração sólida, possui como desvantagens o custo elevado e a natureza explosiva do ácido peracético, por este motivo o método se limitou ao uso laboratorial.

2.4.2.1.3 *Ácido Sulfúrico Concentrado*

“Processos com ácido concentrados permitem a hidrólise tanto da hemicelulose quanto da celulose” (GÍRIO et al., 2010, p. 4779). O ácido sulfúrico concentrado provoca o inchaço da celulose e é um forte agente hidrolisador, no intervalo de concentração de 62,5-70,0% ocorre o inchaço intercrystalino da celulose, e em concentrações acima de 75% ocorre à dissolução e a decomposição da celulose, esta celulose é então precipitada com a adição de metanol ou etanol e é facilmente hidrolisada por ácido diluído ou enzimas, obtendo-se uma alta conversão

em açúcares (DEMIRBAS; GUPTA, 2011). Este processo pode ser seguido por uma diluição com água para hidrolisar o substrato em açúcares proporcionando uma conversão rápida e completa da celulose e hemicelulose com pouca degradação dos açúcares (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

O ácido pode ser reutilizado após a destilação do metanol ou etanol, este método requer temperaturas e pressões relativamente baixas, o que contribui para minimizar a degradação dos açúcares e a redução de custos com equipamentos. Porém com tempo de reação tipicamente muito mais longo do que o tempo de reação para o pré-tratamento com ácido diluído, e com custos significativos com sistemas de recuperação de ácido, etanol ou metanol, sem esta recuperação de ácidos além do gasto com o reagente seria necessário grandes quantidades de cal para a neutralização da solução de açúcares, gerando grandes quantidades de sulfato de cálcio (CaSO_4), e custos adicionais para eliminação deste (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

2.4.2.1.4 *Ácido Fosfórico Concentrado*

Ácido fosfórico concentrado 85% é aplicado como solvente e provoca menor degradação da celulose do que os outros ácidos, o método é conduzido em condições moderadas de temperatura e a pressão ambiente, muitas das limitações deste método são parecidas com as dos métodos por ácido sulfúrico (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

2.4.2.2 *Líquido Iônico*

Segundo Gírio et al. (2010) os líquidos iônicos são sais orgânicos com baixo ponto de fusão com alta estabilidade térmica e pressão de vapor desprezível, classificados como solventes verdes, possibilitam a dissolução completa do lignocelulósico, o cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio e o cloreto de 1-alil-3-metilimidazólio são alguns dos líquidos iônicos mais utilizados. Após a dissolução em líquido iônico a celulose pode ser regenerada pela adição de água, etanol ou acetona. A hidrólise de celulose regenerada é significativamente aumentada, com taxa inicial de cerca de uma ordem de magnitude maior que a celulose não tratada

(DEMIRBAS; GUPTA, 2011). Os principais inconvenientes do processo são os custos com a reciclagem do líquido iônico, e a toxicidade de alguns destes reagentes.

2.4.2.3 Alcalino

“Entre os diversos pré-tratamentos químicos, o pré-tratamento alcalino é o mais amplamente usado para melhorar a hidrólise enzimática de lignoceluloses” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 95). Em geral, são usados hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH), hidróxido de cálcio (CaOH₂) ou hidróxido de amônia (NH₃OH), pode ser dividido em duas abordagens dependendo do catalisador utilizado (alcalino/alcalino-terroso), os métodos alcalinos são mais eficazes na remoção da lignina, ácidos urônicos e sílica, se presente, deixando grande parte da hemicelulose insolúvel.

O pré-tratamento com álcalis provoca o “inchaço” da biomassa, levando ao aumento de área interna superficial e uma diminuição da cristalinidade, o mecanismo é considerado como saponificação de reticulação intermolecular das ligações éster da hemicelulose-lignina, há o rompimento parcial da estrutura da lignina e a separação estrutural da hemicelulose-lignina. Há uma baixa formação de furanos, inibidores da hidrólise enzimática, e aldeídos, porém há a formação significativa de ácidos carboxílicos (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

São utilizadas temperaturas e pressões mais baixas em comparação aos outros métodos, podendo ser realizado em condições ambiente, porém o tempo de pré-tratamento é muito longo, sendo medido em horas ou até em dias, embora os custos com equipamentos sejam reduzidos em comparação aos utilizados no pré-tratamento ácido, os custos com reagentes são mais altos em alta concentração e o uso destes resulta em impactos negativos sobre as questões ambientais.

2.4.2.3.1 Amônia Aquosa

Foi o primeiro pré-tratamento patenteado, 1905, a natureza da reação é bastante complexa, a amônia causa um grande inchaço, provocando alteração da estrutura cristalina do lignocelulósico, e possui reatividade química suficiente para causar significativas alterações morfológicas mostrando uma elevada seletividade para a lignina, deixando a maioria das hemiceluloses retidas na fração sólida, esta

lignina possui alta qualidade devido à baixa contaminação e pode ser comercializada, adicionando uma renda extra ao.

Este pré-tratamento possui custo relativamente baixo com possibilidade de reciclagem devido à volatilidade da amônia em comparação a água, facilitando sua separação a partir de misturas aquosas, através da separação *flash* é possível remover a maior parte da amônia, esta é levemente corrosiva, porém menos corrosiva que os ácidos a altas temperaturas (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; GUPTA; KIM; LEE, 2009). “O fato de a hemicelulose ser mantida após pré-tratamento é um fator positivo em um pré-tratamento” (GUPTA; KIM; LEE, 2009 p. 80). Segundo os autores Gupta, Kim e Lee (2009) as enzimas celulases apresentam considerável atividade de xilanase, bem como de celulase, portando ocorre simultaneamente a hidrólise de celulase e hemicelulase, oferecendo mais vantagens ao método.

2.4.2.4 Solventes Orgânicos

Segundo os autores Demirbas e Gupta (2011) este método utiliza solventes orgânicos com ácidos minerais como catalisadores para quebrar a estrutura de forma seletiva da lignina e da hemicelulose, são utilizados solventes como, metanol, etanol, acetona, etileno glicol, trietilenoglicol, e os ácidos minerais tais como o ácido sulfúrico e os ácidos orgânicos tais como o ácido oxálico, acetilsalicílico e salicílico. “Aplica o conceito da solubilização diferencial e do fracionamento dos vários componentes da parede celular vegetal, incluindo a celulose, pelo rompimento das ligações de hidrogênio entre as microfibras” (OGEDA; PETRI, 2010, p. 1553).

Os solventes devem ser reciclados para a viabilidade econômica do sistema e deve ser removido após o pré-tratamento porque podem inibir o processo de hidrólise enzimática e os posteriores processos microbiológicos, “as temperaturas do processo podem variar desde a temperatura ambiente até 205°C, dependendo principalmente do solvente orgânico utilizado” (GÍRIO et al., 2010, p. 4871). A partir deste método pode-se isolar lignina de alta qualidade e, portanto, adicionar uma renda extra.

2.4.3 Pré-Tratamento Biológico

Segundo Ogeda e Petri (2010) os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos e algumas bactérias (actinomicetes). Durante o processo, estes micro-organismos secretam enzimas extracelulares como peroxidases e lactases que ajudam a remover uma quantidade considerável de lignina da biomassa e solubilizar a hemicelulose. “Geralmente, é utilizado em combinação com outros processos” (BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008, p. 127), e as vantagens são a baixa exigência energética e os baixos custos com reagentes químicos, no entanto segundo Eriksson et al. (1980) apud Carvalho, Ferraz e Milagres (2011) as taxas desta hidrólise para o processo de pré-tratamento são muito baixas, evidenciando ainda que os processos que combinam princípios físicos e químicos em geral representam as melhores opções de pré-tratamento.

2.4.4 Pré-Tratamento Físico e Químico

“Pré-tratamentos que combinam princípios físicos e químicos geralmente representam as melhores opções para fracionar a lignocelulose” (RAMOS, 2003 apud CARVALHO; FERRAZ; MILAGRES, 2011, p. 60), pois altera as propriedades físicas e químicas do lignocelulósico, normalmente pelo aumento da porosidade, área superficial, resultante do efeito físico e pelo fracionamento seletivo do lignocelulósico, resultante do efeito químico.

2.4.4.1 Explosão a Vapor

“É considerada uma das opções mais bem sucedidas para fracionar a biomassa em seus três principais componentes” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 96) e para tornar a celulose acessível à hidrólise enzimática, considerado um método termomecânico e químico, “pode ocorrer na presença de catalisadores químicos (ácido sulfúrico, dióxido de enxofre, hidróxido de sódio e amônia)” (CHEN (2007); ÖHGREN (2007) apud OGEDA; PETRI, 2010, p. 1552) os quais, normalmente, aumentam o rendimento em açúcares do pré-tratamento, porém suas nomenclaturas diferem do processo sem adição de catalisadores, portanto, para a explosão a vapor

geralmente é utilizado apenas vapor saturado a alta pressão. Segundo os autores Demirbas e Gupta, (2011) e Gírio et al., (2010) por alguns segundos ou minutos, podendo ser utilizado até 90 atm de pressão dependendo do lignocelulósico, seguido de uma súbita descompressão através de uma válvula, o que resulta em uma expansão do material rompendo, “explodindo”, a estrutura da parede celular, ligações intermoleculares entre a celulose e a hemicelulose, realizando hidrólise glicosídica, porém não rompe toda a lignina, mas possibilita o acesso das enzimas as fibrilas elementares da celulose.

A explosão a vapor é considerada a mais rentável opção para madeiras e resíduos de agricultura, mas é menos eficaz para lignocelulósicos macios, sofrendo grande influência do tamanho da partícula, do tempo de residência e da temperatura de processo. É um método com custo capital baixo, sem agentes químicos além da água, com economia energética e um bom rendimento em açúcares fermentescíveis, sendo a principal vantagem os efeitos ambientais negligenciava (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; GÍRIO et al., 2010).

2.4.4.2 Explosão de Fibras com Vapor de Amônia (AFEX)

No processo é adicionada uma alta carga de amônia a temperatura e pressão elevadas, após a reação a pressão é liberada explosivamente, processo semelhante ao de Explosão a Vapor, porém com adição de amônia (DEMIRBAS; GUPTA, 2011). É um pré-tratamento que provoca alterações físico-química na macro e micro estrutura do lignocelulósico, reduzindo a cristalinidade, despolimerizando parcialmente a hemicelulose, aumentando a área superficial acessível devido à ruptura da estrutura pela rápida descompressão do sistema.

Quase toda a amônia (99%) utilizada pode ser recuperada e reciclada, o processo é atrativamente econômico em comparação a outras tecnologias, e possui uma formação mínima de produtos de degradação dos açúcares, este pré-tratamento solubiliza uma pequena fração de hemicelulose, o que resulta em maior rendimento em açúcares sendo este maior que o rendimento do pré-tratamento Explosão a Vapor catalisado por ácido (DEMIRBAS; GUPTA, 2011; GÍRIO et al., 2010). “Ao contrário da maioria dos pré-tratamentos nenhuma fração líquida com produtos dissolvidos é gerada” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 97).

2.4.5 Pré-Tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico considera uma variedade de condições operacionais, visando à hidrólise seletiva da hemicelulose e a deslignificação, utilizando-se água no estado líquido ou gasoso, “água age como um solvente e como reagente ao mesmo tempo” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 96), segundo Dermirbas e Gupta (2011) em temperaturas e pressões elevadas a química da água é modificada e sua força iônica aumenta significativamente, e tais alterações na água clivam as ligações éter e éster favorecendo a hidrólise da hemicelulose.

O pré-tratamento, geralmente, é conduzido na faixa de temperatura de 150°C a 230°C, pressão de saturação ou abaixo, com o tempo de reação que varia de alguns segundos em alta temperatura há horas em condições amenas (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999). Em meio aquoso, a lignina sofre tanto degradação quanto repolimerização, sendo a fração de lignina solubilizada dependente das condições operacionais e da matéria-prima, esta solubilização envolve tanto a quebra da ligação lignina-carboidrato quanto à reação de despolimerização (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999; SAMUEL et al., 2011).

Um mecanismo de duas etapas tem sido proposto para a reação de deslignificação, uma etapa rápida onde fragmentos de lignina com baixo peso molecular e alta reatividade são solubilizados pela quebra da lignina em hidratos de carbono, e uma etapa lenta onde ocorre a repolimerização da lignina na presença de ácidos orgânicos, os quais são liberados durante o pré-tratamento a partir da biomassa, o que reduz o pH do meio reacional (DEMIRBAS; GUPTA, 2011).

Este método possui segundo Domínguez, Garrote e Parajó (1999) a vantagem de não ser necessário o uso de produtos químicos, que ocasionam a depreciação do equipamento, além da água, o baixo custo operacional e ainda há uma reduzida formação de produtos inibidores resultantes da degradação do lignocelulósico em comparação aos pré-tratamentos ácidos e alcalinos.

2.4.5.1 Auto-hidrólise

“Auto-hidrólise ocorre quando a biomassa é pré-tratada com apenas vapor” (WYMAN; YANG, 2009, p. 104). A auto-ionização da água forma íons hidrônio que

atuam como catalisadores das reações de clivagem das ligações intermoleculares da hemicelulose, segundo Domínguez, Garrote e Parajó (1999) as ligações de éter heterocíclicos são as mais suscetíveis a esse tipo de reação, resultando tanto na geração de oligossacarídeos e a divisão do grupo acetil da fração hemicelulósica da matéria-prima.

Durante a reação de auto-hidrólise os grupos acetila presentes na hemicelulose são clivados e produzem ácido acético alterando assim o pH do meio reacional e sob as condições do pré-tratamento, geralmente, segundo os mesmos autores há geração de íons hidrônio gerados a partir da auto-ionização do ácido acético, que também atuam como catalisadores na degradação de polissacarídeos, os ácidos urônicos também podem contribuir na geração de íons hidrônio, porém seu papel na hidrólise não é bem compreendido e relatado.

A hemicelulose é despolimerizada e convertida em oligômeros solúveis e monossacarídeos juntamente com parte da lignina, resultando em uma fase líquida, já a celulose e uma parte da lignina, fase sólida, não são significativamente afetadas, “até 60% da lignina pode ser despolimerizada [...], mas uma significativa fração (até 20%) da celulose pode ser degradada” (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999, p. 199). Os açúcares, monossacarídeos, gerados durante o processo sofrem degradação gerando furanos, principalmente furfural e hidroximetilfurfural e outros subprodutos como fenóis, esta degradação depende do tempo de residência e da temperatura de tratamento, sendo assim necessário adequar as condições de operação que possibilite o maior rendimento em açúcares com a mínima geração de inibidores, aumentando a eficiência da posterior hidrólise enzimática (DOMÍNGUEZ; GARROTE; PARAJÓ, 1999; GÍRIO et al., 2010; LOUREIRO, et al. 2011).

O rendimento em açúcar a partir da fração hemicelulósica pela auto-hidrólise estão limitados a menos do que cerca de 65% do máximo possível, enquanto que a adição de sulfúrico diluído ou outros ácidos podem recuperar-se cerca de 90% do máximo teórico (WYMAN; YANG, 2009, p. 104).

2.4.5.2 Água Líquida Quente

Este método segue os mesmos princípios do método anteriormente descrito, sendo que este pré-tratamento ocorre com água na pressão de saturação ou em pressões acima da pressão de saturação, na forma líquida, segundo Kim et al. (2009) é eficaz em dissolver a hemicelulose e uma parte da lignina enquanto minimiza a formação de monossacarídeos e a degradação dos açúcares durante o pré-tratamento. Este pré-tratamento difere da auto-hidrólise devido a menor degradação dos açúcares, conseqüentemente menor quantidade de inibidores, e principalmente na maior quantidade de água consumida e conseqüentemente na maior diluição dos açúcares presentes na fase líquida resultante do pré-tratamento.

Para evitar a formação de inibidores o pH deve ser mantido entre 4 e 7, durante o pré-tratamento, este por sua vez minimiza a formação de monossacarídeos e, portanto, também as formações de produtos de degradação que podem catalisar a hidrólise do material celulósico durante o pré-tratamento (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 96).

Segundo Ogeda e Petri (2010) é difícil realizar uma comparação direta da eficiência do pré-tratamento, pois cada método possui diferentes mecanismos, devido às variações de como os rendimentos são relatados e quais açúcares estão incluídos, porém busca-se avaliar a remoção seletiva de frações do lignocelulósico, a acessibilidade às enzimas, os inibidores gerados e principalmente os rendimentos resultantes em açúcares.

2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis pode ser conduzida com a utilização, comumente, de ácidos concentrados, ácidos diluídos ou enzimas. Os métodos com ácidos são os mesmos descritos em pré-tratamento químico com ácidos, portanto foram abordados apenas os conceitos referentes à hidrólise enzimática como posterior processo ao pré-tratamento, utilizada pelo autor para hidrolisar as fibras do bagaço de cana-de-açúcar, devido principalmente às condições brandas de ensaio, uma menor

quantidade de produtos indesejáveis formados (subprodutos), além do alto rendimento, menores custos e impacto ambiental.

Comparativamente segundo os autores Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2008), tem-se a hidrólise com ácido diluído num estágio tecnológico mais avançado do que as demais, mas com rendimento limitado entre 50% a 70%, a hidrólise com ácido concentrado apresenta rendimentos em torno de 90% porém com desempenho econômico do processo comprometido devido à recuperação do ácido e corrosão dos equipamentos, já a hidrólise enzimática, por sua vez, apresenta rendimentos entre 75% e 85%, e grandes melhorias são esperadas resultando em rendimentos de até 95%, com grandes vantagens não só econômicas como também ambientais.

Ao efetuarmos uma comparação entre os processos de hidrólise podemos perceber que a hidrólise enzimática conduz a rendimentos mais elevados de monossacarídeos do que a hidrólise ácida, porque as enzimas celulasas catalisam somente as reações de hidrólise e não as reações da degradação do açúcar (PARISI, 1989, apud RABELO, 2007, f. 27).

Segundo Polikarpov e Serpa (2011) a estrutura do lignocelulósico é naturalmente resistente à decomposição por micróbios e enzimas e esta resistência é conhecida como “recalcitrância da biomassa”, a realização do pré-tratamento visa melhorar a taxa de hidrólise enzimática e aumentar a produção de açúcares fermentescíveis, através dos métodos e mecanismos anteriormente já descritos.

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, para produção de açúcares fermentescíveis segundo os autores Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (2008), em fase de pesquisa e desenvolvimento, é conduzida em escalas experimentais ou unidades piloto de produção, sendo utilizadas tecnologias complexas e multifásicas com rendimento influenciado fortemente pela composição e estrutura da biomassa, portanto sendo fortemente influenciada pelo pré-tratamento utilizado.

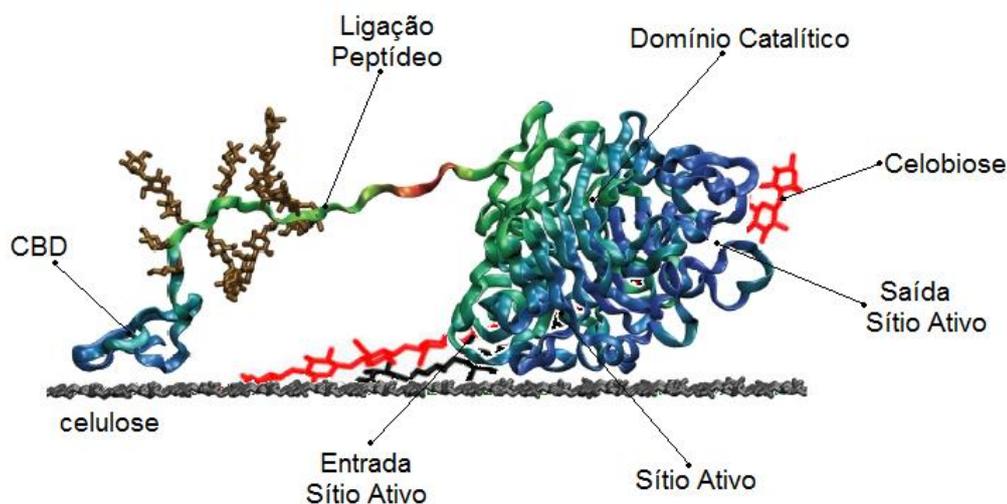
“Os desafios da hidrólise enzimática de lignocelulose incluem o custo da enzima, inibição do produto, a perda da enzima devido à ligação com a lignina, e a desnaturação ou degradação” (DEMIRBAS; GUPTA, 2011, p. 98). “Por conta de seu grande potencial de evolução e redução de custos, muitos especialistas veem a hidrólise enzimática como a chave para a produção de bioetanol a um custo competitivo no longo prazo” (DIPARDO, 2000; LYND et al., 1996 apud BANCO

NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008, p. 128).

2.5.1 Enzimas

No processo enzimático, a hidrólise é catalisada por enzimas, que possuem uma alta especificidade em relação ao substrato e a sua utilização, sua estrutura é composta majoritariamente por proteínas, podendo estar ligada a carboidrato e lipídeos, possuem um centro ativo no domínio catalítico e outro domínio de ligação ou *Core Binding Domain* (CBD), responsável pela ligação da enzima com o substrato (Figura 18). As enzimas mais utilizadas são as de origem microbiana do tipo extracelular.

Figura 18 - Representação 3D esquemática de uma exoglucanase (CBH) e suas principais partes



Fonte: adaptado de Zhong et al. (2007).

Segundo o autor Moreira et al. (2011) as enzimas hidrolíticas geram a partir da hidrólise dos polissacarídeos presentes no lignocelulósico, oligômeros e monômeros de pentoses e hexoses, porém devido à complexidade da parede celular e sua heterogeneidade é necessário um vasto espectro de enzimas com atividade específica, sendo necessários segundo Coughlan (1992 apud MOREIRA et al., 2011) dois tipos de enzimas para realizar a quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular:

- a) exohidrolases: responsáveis por atuar nas ligações glicosídicas terminais e liberar unidades terminais de monossacarídeos;
- b) endohidrolases: responsáveis por clivar ligações glicosídicas internas de forma aleatória ou em posições específicas, geralmente internas.

Segundo Polizeli et al. (2011) as enzimas específicas para a hidrólise de lignocelulósicos, para obtenção de açúcares fermentescíveis, são principalmente as enzimas que hidrolisam a celulose e a hemicelulose presentes na parede celular (constituídas de unidades básicas de açúcares), sendo:

- a) complexo de celulases para degradar celulose em glicose ou moléculas constituídas de sacarídeos de baixo peso molecular solúveis;
- b) complexo de hemicelulases para degradação da hemicelulose, para completa degradação é necessário um sistema enzimático com várias enzimas específicas para clivar as diversas e diferentes ligações existentes na estrutura da hemicelulose, obtendo-se uma diversificada gama de sacarídeos dependendo das enzimas aplicadas.

As celulases são amplamente utilizadas na hidrólise de lignocelulósicos, porém a utilização de hemicelulases depende das características do material, significativa presença ou não de hemicelulose, pois segundo Moreira et al. (2011) alguns métodos de pré-tratamento não removem totalmente a hemicelulose, da fração sólida, sendo necessário para a hidrólise eficiente deste material também a utilização de enzimas hemicelulases. As hemicelulases facilitam a hidrólise da celulose devido à exposição das fibras de celulose, pois ocorre a conversão e remoção da hemicelulose presente na matriz lignocelulósica, facilitando o acesso à celulose e a atividade das celulases (SHALLOM E SHOHAM, 2003 apud GÍRIO et al., 2010).

Como as hemiceluloses variam entre as diferentes espécies de plantas, o ideal é que a mistura de enzimas seja ajustada e otimizada para cada tipo de material a ser hidrolisado (MOREIRA et al., 2011).

As formulações de enzimas com atividades adaptadas para uma biomassa específica e as alterações estratégicas das propriedades catalíticas de enzimas para melhorar as funções existentes ou até mesmo introduzir novas propriedades são

formas de aumentar a eficiência hidrolítica, e um vasto campo para pesquisas e desenvolvimento de tecnologias (WARD, 2011).

2.5.1.1 Celulases

O processo de hidrólise enzimática da celulose, bioconversão, para obtenção de glicose, envolve um complexo enzimático, celulase, com ação de três tipos de enzimas, subdivididas em endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, altamente específicas para a hidrólise da celulose (OGEDA; PETRI, 2010; POLIKARPOV; SERPA, 2011).

2.5.1.1.1 *Endoglucanase ou endo 1,4- β -glucanase*

Agem aleatoriamente quebrando as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ das cadeias de celulose expondo novas extremidades redutoras e não redutoras (terminais) no produto da hidrólise, terminais disponíveis ao ataque das exoglucanases, atuam preferencialmente na degradação da celulose em fase amorfa do que na fase cristalina (POLIZELI et al., 2011; WARD, 2011).

2.5.1.1.2 *Exoglucanases ou exo 1,4- β -glucanase*

Clivam progressivamente as cadeias de celulose a partir das extremidades, terminais, liberam unidades de celobiose solúveis e glicose (POLIKARPOV; SERPA, 2011; POLIZELI et al., 2011).

Estas enzimas são conhecidas também como Celobiohidrolases (CBH) sendo a enzima CBH I atua na redução dos grupos terminais redutores da cadeia de celulose, enquanto que a enzima CBH II atua sobre os grupos terminais não redutores (ROUVIEN et al., 1990; DIVNE et al., 1994, apud POLIKARPOV; SERPA, 2011).

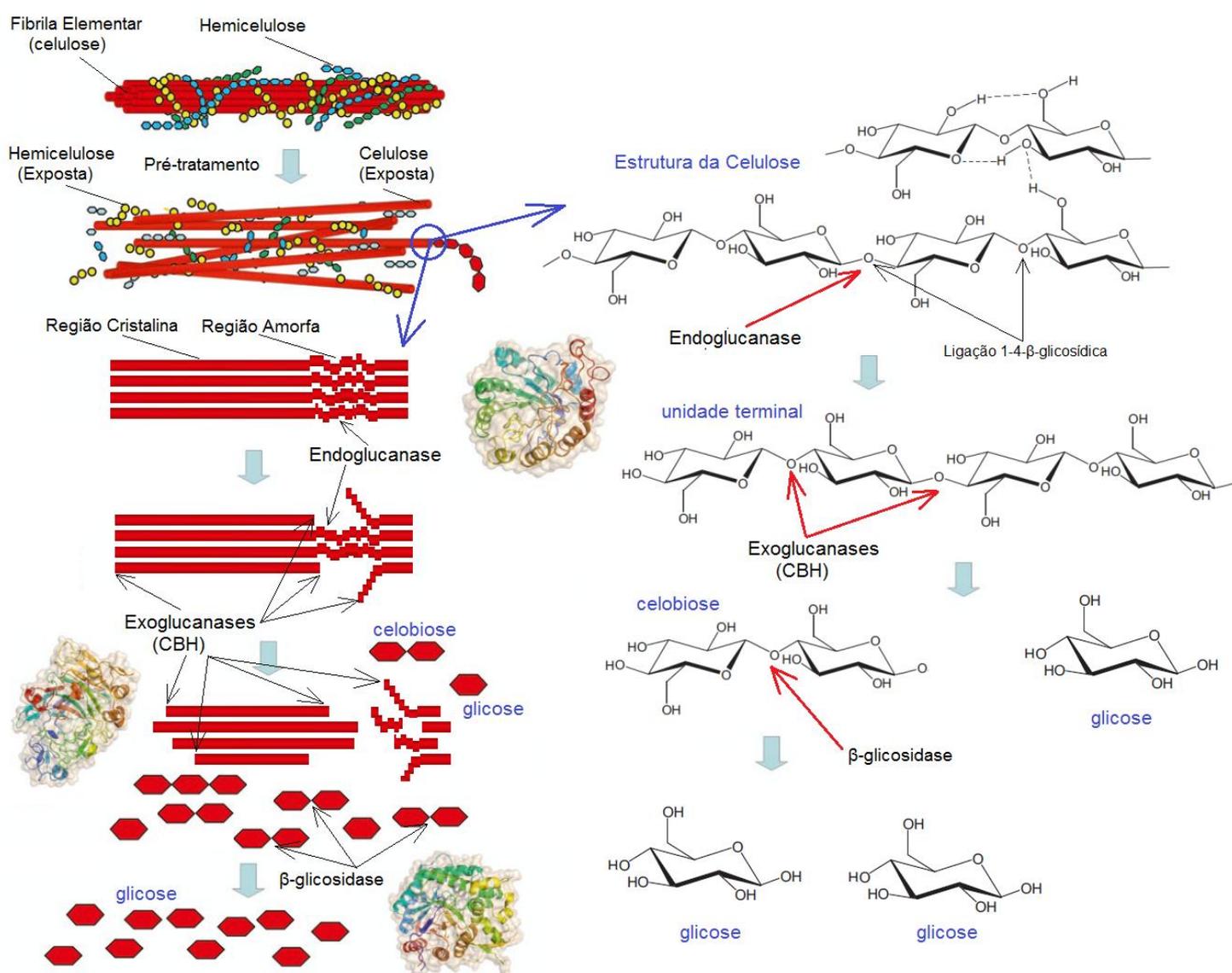
2.5.1.1.3 *β -glicosidase ou 1,4- β -glicosidase*

Hidrolisam principalmente celobiose para produzir monômeros de β -glicose, e hidrolisam também ácido celobiônico para produzir glicose e gluconolactona

(POLIZELI et al., 2011; WARD, 2011). Regula a velocidade do processo, pois as enzimas endo e exo 1,4- β -glucanase são inibidas pelo produto, glicose, resultante da atividade da enzima 1,4- β -glicosidase (POLIZELI et al., 2011; WARD, 2011).

As três enzimas atuam sinergicamente na degradação da fração celulósica, do lignocelulósico, em uma sequência de eventos (Figura 19).

Figura 19 - Representação da atuação das enzimas celulases sobre a matriz celulósica



Fonte: adaptado de Polizeli et al. (2011) e de Zechel et al. (2003 apud WARD, 2011)

Segundo Polizeli et al. (2011) as endoglucanases aleatoriamente rompem ligações nas regiões amorfas da celulose, enquanto as exoglucanases atuam nas cadeias terminais expostas formando unidades de celobiose e glicose, as unidades

de celobiose são subsequentemente hidrolisadas pelas β -glicosidases formando unidades de glicose.

2.5.1.2 Hemicelulases

O processo de hidrólise enzimática da hemicelulose, heteropolissacarídeo complexo e ramificado, envolve um complexo enzimático, hemicelulases, com ação de diversos tipos de enzimas que atuam na cadeia principal e enzimas que atuam nas cadeias laterais (ramificações) (POLIZELI et al., 2011). Na parede celular da cana-de-açúcar encontram-se arabinoxilanos, mas também os polissacarídeos β -glucanos, mananas e pectinas com ramificações neutras de galactanos, sendo que os xilanos contribuem de 15% a 30% da massa total seca da cana-de-açúcar (SILVA 2005, apud POLIZELI et al., 2011).

A maioria dos estudos com aplicação de hemiceluloses para a hidrólise de lignocelulósicos têm-se concentrado na aplicação das enzimas que hidrolisam xilose (xilanasas), sendo as enzimas que hidrolisam mananas (mananasas) amplamente negligenciadas, embora seja uma hemicelulase abundante em alguns lignocelulósicos (GÍRIO et al., 2010). Segundo Moreira et al. (2011, p. 78) a “arabinoxilose é o principal constituinte da parede celular de madeiras macias, bem como gramíneas e cereais”.

Existem diversas enzimas que atuam catalisando a hidrólise específica das ligações existentes na hemicelulose, algumas mais importantes e citadas, neste contexto, são as enzimas endoxilânase, xilosidase, mananasas, arabinofuranosidasas, xiloglucanases, acetil-xilân esterase, galactosidase, glucuronidase, poligalacturonase, feruloil esterases, coumaroil esterases, pectinases, protopectinases, liases, entre outras (GÍRIO et al., 2010; MOREIRA et al., 2011; POLIZELI et al., 2011).

2.5.1.2.1 Endoxilânase ou endo 1,4- β -xilânase

É a principal enzima para despolimerizar a xilose, cliva as ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ entre as unidades de D-xilose da cadeia principal, provocando redução no grau de polimerização do substrato (GÍRIO et al., 2010; MOREIRA et al., 2011). A cadeia de xilose não é atacada aleatoriamente sendo este dependente do

tamanho da cadeia, do grau de ramificação, da presença de ramificações e da presença de substituintes, influenciando na taxa de hidrólise da cadeia de xilose (LI et al., 2000 apud GÍRIO et al., 2010). Inicialmente os principais produtos da hidrólise são oligômeros de β -D-xilopiranosil, e numa fase posterior são produzidas moléculas menores de mono, di e trissacarídeos de β -D-xilopiranosil (POLIZELI et al., 2005 apud GÍRIO et al., 2010; MOREIRA et al., 2011).

2.5.1.2.2 Xilosidase ou β -xilosidase

A enzima hidrolisa cadeias curtas de xilo-oligômeros e xilobiose liberando cadeias menores de β -D-xilopiranosil e unidades de xilose a partir dos terminais não redutores (GÍRIO et al., 2010).

2.5.1.2.3 Endomananase ou endo 1,4- β -mananase

Responsáveis pela catálise da hidrólise aleatoriamente das ligações $\beta(1\rightarrow4)$ entre as ligações internas da cadeia principal de mananas, produzindo novas unidades com terminais, oligossacarídeos e manobiose (MOREIRA et al., 2011).

2.5.1.2.4 Manosidase ou β -manosidase

Atuam subsequentemente as enzimas endomananase para produzir unidades de manose a partir das extremidades não redutoras de mananas, oligossacarídeos e de manobiose (MOREIRA et al., 2011).

2.5.1.2.5 Acetil-xilan esterase

Enzimas que catalisam a hidrólise de grupos acetil ligados à cadeia polimérica de xilose (xilose acetilada), acetil ligados à cadeia de glicose (glicose acetilada), α -naftil acetato e p-nitrofenil acetato (POLIZELI et al., 2011).

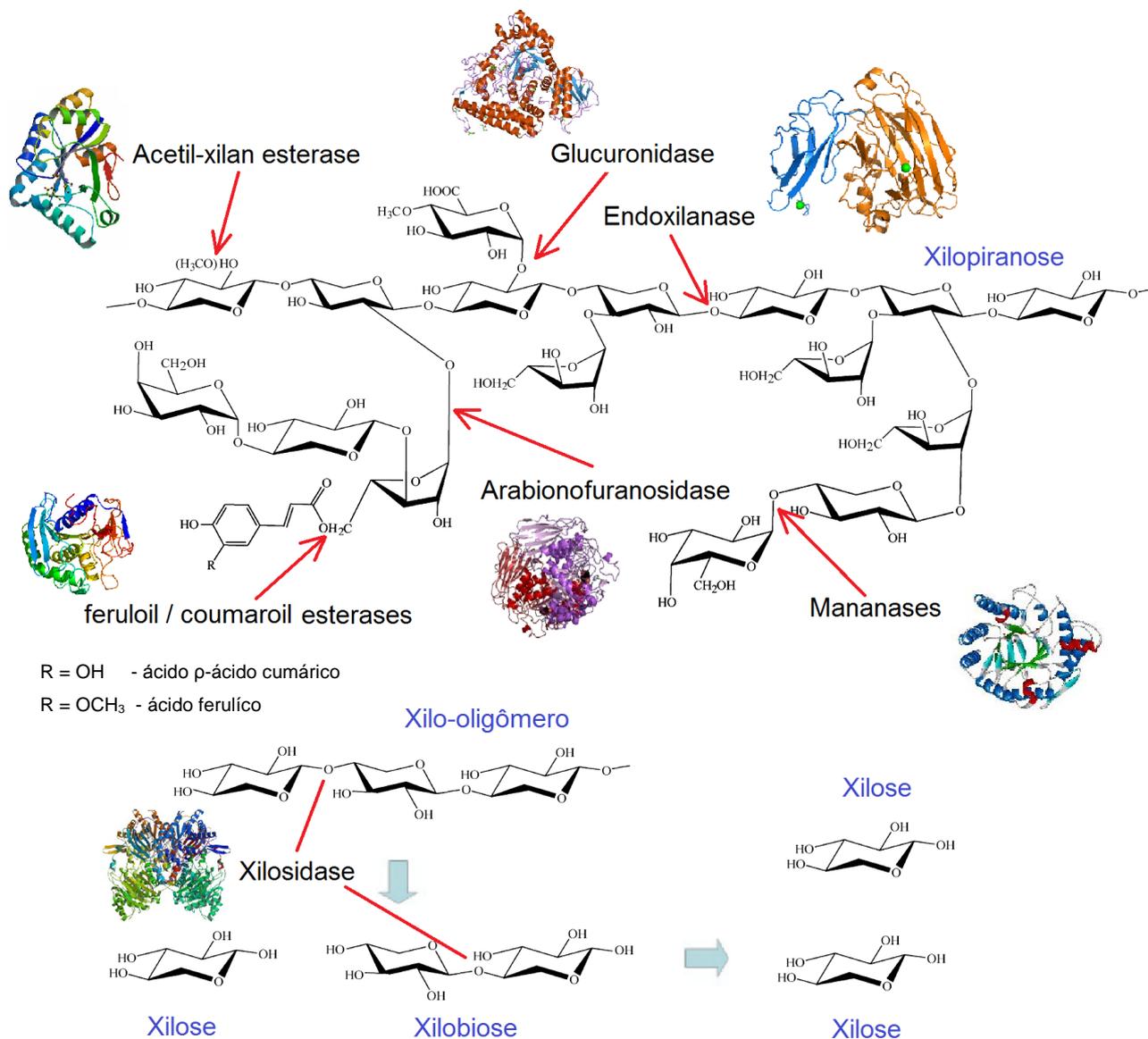
2.5.1.2.6 Arabinofuranosidases

Duas enzimas, a mais comum, exo α -L-arabinofuranosidase que atua clivando as ramificações de arabinanas e degradando p-nitrofenil- α -L-arabinofuranosidas, e endo 1,5- α -L-arabinase que atua catalisando a hidrólise apenas de arabinanas lineares (POLIZELI et al., 2011).

Para a completa hidrólise da hemicelulose é necessário à utilização de outras diversas enzimas que hidrolisem os grupos laterais ou substituintes (ramificações) (arabinofuranosidases, mananases, glucuronidase, acetil-xilan esterase, feruloil e coumaroil esterases), podendo estas aumentar significativamente a velocidade da hidrólise enzimática, devido à criação de novos pontos suscetíveis a subsequente hidrólise catalisada, principalmente, pelas endoxilanases (MOREIRA et al., 2011; POLIZELI et al., 2011).

As enzimas atuam sinergicamente na degradação da fração hemicelulósica, do lignocelulósico, em uma sequência de eventos (Figura 20).

Figura 20 - Representação da atuação das enzimas hemicelulases sobre a matriz hemicelulósica, sequência simplificada com ênfase na degradação da xilose



Fonte: adaptado de Polizeli et al. (2011).

2.5.2 Micro-organismos

Os micro-organismos possuem um grande potencial para degradar biomassa, através da produção de enzimas com potencial para hidrolisar cadeias com unidades de açúcares, utilizando um complexo sistema de enzimas específicas, gerando açúcares simples, monossacarídeos, que servem de fonte de energia, alimento para o micro-organismo. As enzimas “são produzidas [por uma vasta gama de organismos, sendo] por fungos, bactérias, leveduras, algas marinhas, protozoários,

caramujos, crustáceos, insetos, sementes, etc.” (POLIZELI et al., 2005 apud POLIKARPOV; SERPA, 2011, p. 105).

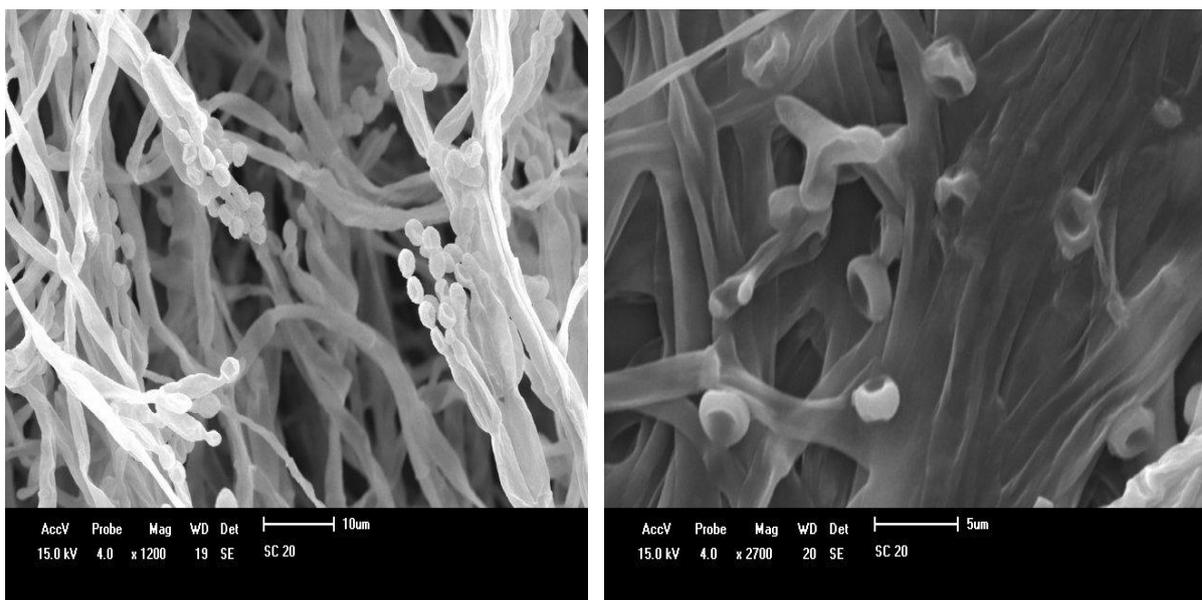
Dentre os diversos micro-organismos que estão envolvidos na hidrólise dos constituintes da parede celular os fungos e as bactérias são destaque e amplamente estudados, com interesse comercial (MOREIRA et al., 2011).

“Quase todas as celulases comerciais obtidas por fermentação submersa são produzidas pelos fungos *Trichoderma*, *Humicola*, *Aspergillus* e *Penicillium*” (TOLAN; FOODY, 1999 apud MOREIRA et al., 2011, p. 75). As hemicelulases, de maior importância, são produzidas por fungos, em particular os filamentosos, com grande capacidade de secretar uma vasta gama de hemicelulases, sendo os pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Trichoderma* mais estudados e analisados dentre os produtores (POLIKARPOV; SERPA, 2011).

2.5.2.1 *Penicillium echinulatum*

O *P. echinulatum* (Figura 21) está também entre os microrganismos com grande potencial para a produção de celulases (DILLON et al., 1992; DILLON et al., 2006). Mutantes selecionados são capazes de secretar celulases com atividade de papel filtro maior do que 2 UI.mL⁻¹ quando crescendo em meio contendo 1% de celulose como fonte de carbono, com valores superiores a 30 U/massa fermentada seca em fermentação no estado sólido, usando bagaço de cana-de-açúcar (CAMASSOLA; DILLON, 2007, 2010). Adicionalmente, FPA e β -glicosidases de *P. echinulatum* são importantes para a hidrólise de celulose, pois apresentam estabilidade a 50°C e 55°C, respectivamente (CAMASSOLA et al., 2004). A importância do complexo enzimático de *P. echinulatum* deve-se também ao fato deste apresentar uma proporção equilibrada de FPA e β -glicosidase, fato relevante para a hidrólise da celulose (MARTINS et al., 2007). A linhagem 9A02S1 empregada para a produção das enzimas empregadas nas hidrólises enzimáticas deste trabalho foi obtida após várias etapas de mutagênese, caracterizando-se por ser um mutante parcialmente desreprimido à glicose (DILLON et al., 2006).

Figura 21 - MEV da linhagem S1M29 de *Penicillium echinulatum*

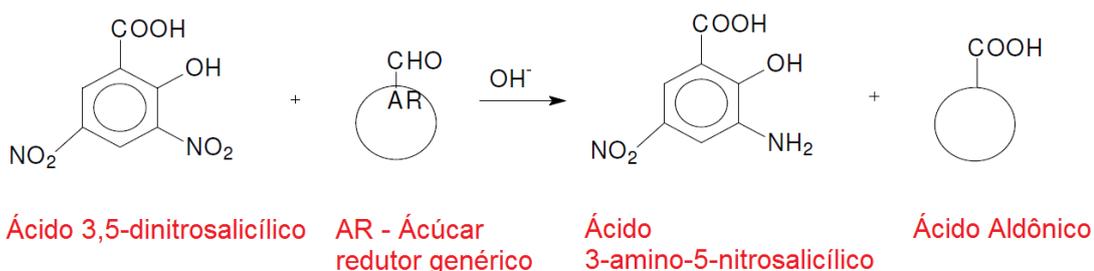


Fonte: Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul (2008).

2.5.3 Método DNS

Método para quantificação de ARTs, “açúcares redutores são aqueles que possuem grupos carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas” (SILVA et al., 2003 apud RABELO, 2007, f.49), segundo Rabelo (2007) este método se baseia na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico e o grupamento aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, formando ácido aldônico (Figura 22), com desenvolvimento de coloração avermelhada, lida espectrofotometricamente, sendo a intensidade da coloração corresponde à concentração de ARTs.

Figura 22 - Reações ocorridas na quantificação de ARTS pelo método DNS



Fonte: Rabelo (2007).

Segundo Summer et al. (1921 apud MILLER, 1959), desenvolvedores do método, o método é composto por ácido dinitrosalicílico, tartarato de sódio e potássio (Sal de Rochelle), utilizado para evitar a oxidação pelo oxigênio dissolvido, fenol, utilizado para aumentar a quantidade de cor produzida, bissulfito de sódio, utilizado para estabilizar a cor obtida na presença de fenol e hidróxido de sódio, utilizado para reduzir a ação da glicose sobre o ácido dinitrosalicílico.

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Resíduo lignocelulósico

O resíduo lignocelulósico utilizado, bagaço de cana-de-açúcar, foi obtido no município de Marau, localizado na região Norte do Rio Grande do Sul, geograficamente na latitude -28.445 e longitude -52.2098 (28°26'42" Sul, 52°12'35" Oeste), com altitude de 589 metros, região de clima subtropical úmido. Este resíduo é resultante do processamento convencional de moagem por rolos da cana-de-açúcar, para extração do caldo de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar pertence à espécie *Saccharum officinarum*, foi cultivada no período de maio de 2011 a março de 2012, sem tratamento especial do solo e colheita realizada manualmente.

3.1.2 Micro-organismos e Enzimas

O complexo de enzimas celulasas e hemicelulasas foi obtido no Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul - Campus Universitário de Caxias do Sul, sendo estas produzidas pelo fungo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1 (micro-organismo depositado no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* - DSM 18942), conforme o processo de produção de enzimas hidrolíticas, patente PI0703302-8, autoria de Dillon et al. (2007).

3.1.3 Reagentes e Soluções

Todos os reagentes e demais insumos laboratoriais envolvidos no presente trabalho foram adquirido em grau analítico, puro para análise (p.a.), sendo utilizados sem qualquer tratamento prévio a sua utilização nos procedimentos experimentais e no preparo das seguintes soluções:

- a) solução de fibra em detergente neutro: (1) adicionou-se em um béquer de 100 mL 9,305 g de etilenodiaminotetraacetato dissódico ($\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 3,405 g de borato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), com adição de

- aproximadamente 40 mL de água deionizada (H_2O), aqueceu-se a solução para dissolver, (2) adicionou-se a estes 15,000 g de lauril sulfato de sódio ($CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$) e 2,280 g de fosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4), dissolvidos com água deionizada quente. Transferiu-se quantitativamente (1) e (2) para garrafão de vidro, e adicionou-se ainda 5 mL de etileno glicol ($C_2H_4O_2$) e água deionizada até volume final de 500 mL;
- b) solução de etanol 80% v/v: Misturou-se 845 mL de etanol 95% (C_2H_6O) com 155 mL de água deionizada;
- c) solução detergente ácido: Adicionou-se 20,00 g de Brometo-cetil-trimetilamônio ($C_{19}H_{42}BrN$) em 1000 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 N, previamente padronizado. Agitou-se a solução para facilitar a dissolução;
- d) solução tampão: (1) Dissolveu-se 1,50 g de nitrato férrico hidratado ($Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$) e 0,038 g de nitrato de prata ($AgNO_3$) em 25 mL de água deionizada. (2) Adicionou-se 125 mL de ácido acético glacial (CH_3COOH) com 1,250 g de acetato de potássio (CH_3COOK) dissolvido em (1), e após adicionou-se 100 mL de álcool butil terciário ($(CH_3)_3COH$) e homogeneizou-se;
- e) solução de permanganato de potássio 5%: Dissolveu-se 30,00 g de permanganato de potássio ($KMnO_4$) em 600 mL de água deionizada. (Solução guardada na ausência de luz);
- f) solução combinada de permanganato 2:1: Misturou-se a solução de permanganato de potássio e a solução tampão na razão de 2:1 V/V, antes de ser usada. (Solução guardada em lugar refrigerado e na ausência de luz);
- g) solução de desmineralização: Dissolveu-se 25,00 g de ácido oxálico dihidratado ($C_2H_2O_4 \cdot 2H_2O$) em 350 mL de etanol 95%. Adicionou-se 25 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado 12 N e realizou-se a aferição com aproximadamente 125 mL de água deionizada.

3.2 MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Preparo da Amostra de Bagaço de Cana-De-Açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi seco a uma temperatura inferior a 55°C por aproximadamente 48h, triturado em um triturador forrageiro Trapp® 70 e posteriormente foi realizada uma separação granulométrica do material, sendo este passado por uma série de peneiras com malhas de diferentes diâmetros, peneiras série Tyler de *mesh* 6, 8, 10, 14, 20, 30 e fundo, ficando por cerca de 20 minutos no peneirador vibratório, deste fracionamento foi utilizada apenas a fração de *mesh* 10/14 neste trabalho, esta foi armazenada em sacos plásticos fechados e acondicionados em local sem umidade até a sua utilização.

3.2.2 Planejamento Experimental

O planejamento composto central rotacional (CCDR) para metodologia de superfície de resposta (MSR) foi aplicado para verificar as condições ótimas do processo de pré-tratamento hidrotérmico. O CCDR segundo Montgomery (2001) consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k com n_F corridas, $2k$ corridas axiais ou estrela e n_C corridas centrais, com parâmetro de rotabilidade α dado por $(k)^{1/2}$, onde todos os pontos do planejamento fatorial e axial ficam sobre uma esfera de raio $(k)^{1/2}$.

Segundo o autor Montgomery (2001) a MSR é um processo sequencial de duas etapas, primeira ordem e segunda ordem, utiliza-se um polinômio de menor grau, se a resposta se ajustar bem a este polinômio a função será dada pelo **modelo de primeira ordem** (Equação 1).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (1)$$

Onde, Y é o resultado predito, x é o código para as variáveis independentes, β_0 é o ponto de interceptação, β_k é o coeficiente linear e ε é o erro observado ou o ruído na resposta.

É aplicado a uma ampla região para determinar primeiramente a existência de uma região no sistema com curvatura, que contenha um ponto ótimo, esta região

restrita já é conhecida e foi determinada com base em resultados obtidos em trabalhos anteriores e definida na literatura especializada por diversos autores, citado por Domínguez, Garrote e Parajó (1999), como sendo de 150°C a 230°C, e também por Kim et al. (2009) como sendo de 160°C a 200°C, com tempos abaixo de 30 min. Para este trabalho foi definido tempos de residência no reator variando de 5 a 25 minutos e temperatura de pré-tratamento variando de 169 a 211°C.

Aplicou-se o modelo de segunda ordem, salvo quando o modelo de primeira ordem obteve um ajuste ótimo, para se determinar os termos quadráticos do modelo de regressão aplicado para determinar pontos ótimos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, a função segundo Montgomery (2005) é dada por um **modelo de segunda ordem ou quadrático** (Equação 2).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2)$$

Onde, Y é o resultado predito, x_i e x_j são os códigos para as variáveis independentes, β_0 é o ponto de interceptação, β_i é o coeficiente linear, β_{ij} é o coeficiente de interação, β_{ii} é o coeficiente quadrático e ε é o erro observado ou o ruído na resposta.

As variáveis independentes em estudo e mais significantes para o desempenho do pré-tratamento hidrotérmico de lignocelulósicos, são o tempo de residência no reator (X_1) e a temperatura do pré-tratamento (X_2), investigadas em cinco diferentes níveis (Tabela 1). Portanto tem-se que $k = 2$ e $\alpha \cong 1,414$.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental (CCDR)

Variáveis	$-\alpha$ (-1,414)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,414)	Range
Tempo (min.) (X_1)	5	8	15	22	25	5-25
Temperatura (°C) (X_2)	169	175	190	205	211	169-211

Fonte: o autor (2012).

O número de experimentos a ser realizado é dado por $k^2 + 2k + 2$, resultando em 10 experimentos (Tabela 2), sendo uma repetição no ponto central, planejamento identificado como 2/1/10.

Tabela 2 - Planejamento experimental para o pré-tratamento hidrotérmico com água no estado gasoso, sem decompressão explosiva

Experimento	Variável Codificada		Variável Real	
	X_1	X_2	Tempo	Temperatura
1	0	0	15	190
2	0	0	15	190
3	+1	+1	22	205
4	-1	-1	8	175
5	+1	-1	22	175
6	-1	+1	8	205
7	-1,414	0	5	190
8	+1,414	0	25	190
9	0	-1,414	15	169
10	0	+1,414	15	211

Fonte: o autor (2012).

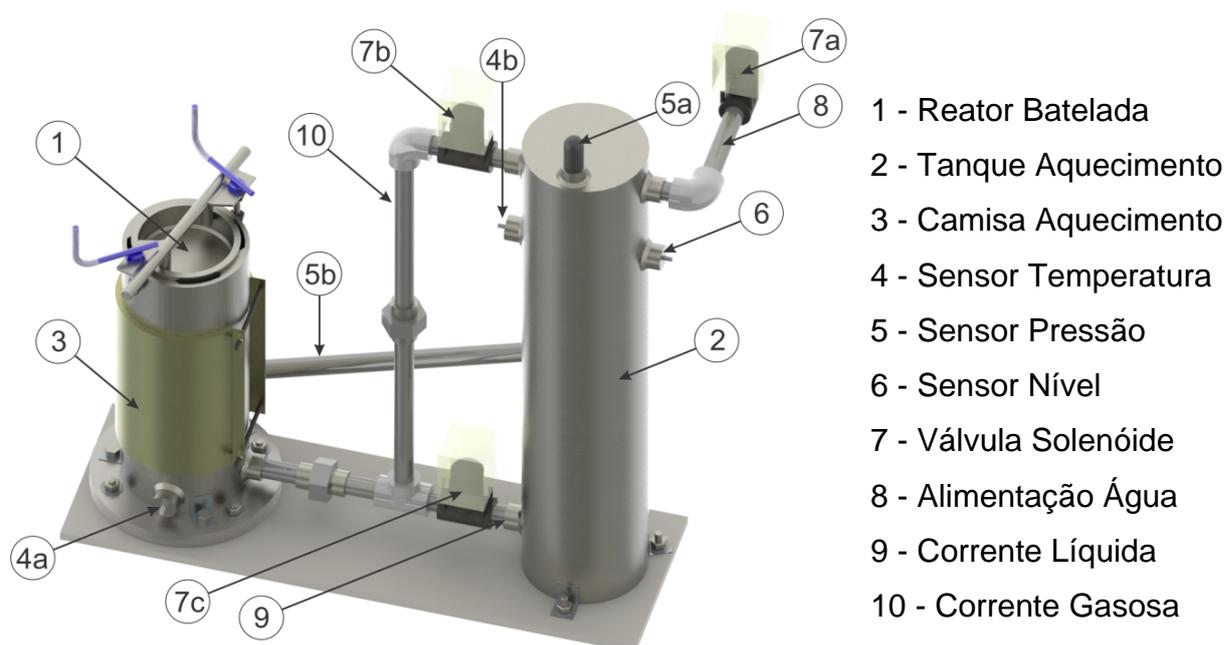
3.2.3 Pré-tratamento Hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado na Unidade Didática de Pré-Tratamento de Lignocelulósicos do Laboratório de Reatores do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET) da Universidade de Caxias do Sul - Campus Universitário de Caxias do Sul.

3.2.3.1 Unidade Didática de Pré-tratamento Hidrotérmico

A unidade de pré-tratamento hidrotérmico (Figura 23) é composta por um reator batelada (1) com capacidade para 2165 cm³, tanque de aquecimento (2) com capacidade para 11810 cm³, ambos de aço inoxidável 304, camisa de aquecimento (3) que possui uma resistência elétrica com potência de 2202 W e uma tensão de 220 V, sendo esta controlada pelo sensor de temperatura (4a), por válvulas solenóides (7) que possuem controle de abertura automático programado e acionamento manual no painel de controle, e por um compartimento poroso metálico removível (leito) para acondicionamento da amostra, com espaçamento menor que 1 mm. (suprimido da Figura 23).

Figura 23 - Detalhamento da unidade didática para pré-tratamento de material lignocelulósico



Fonte: o autor (2012).

3.2.3.2 Procedimentos Operacionais da Unidade de Pré-tratamento Hidrotérmico

Os procedimentos conduzidos na unidade de pré-tratamento hidrotérmico, foram realizados sistematicamente para as diferentes condições em estudo, basicamente sendo:

- carga do tanque de aquecimento (2) com água deionizada até um determinado nível, controlado pelo sensor de nível (6) e aquecimento desta água até a temperatura e pressão de ensaio, controlada pelos sensores de temperatura (4b) e de pressão (5a);
- pré-aquecimento do reator batelada (1) até a temperatura de ensaio, através da camisa de aquecimento (3), controlada pelo sensor de temperatura (4a);
- após atingir condições estáveis, no reator batelada (1) e no tanque de aquecimento (2), o reator batelada (1) foi carregado com o leito contendo **75,00 g da amostra de bagaço de cana-de-açúcar**, previamente preparada, e colocada em água deionizada por 1 min antes do ensaio para evitar que o bagaço de cana-de-açúcar queime durante o tempo necessário para o procedimento de fechamento do reator (tempo em que não há vapor no reator, aproximadamente 20 segundos);

- d) abre-se a válvula solenóide (7b) da corrente gasosa (10), após esta abertura o tempo de ensaio (corrida) é iniciado, momento em que se inicia a reação propriamente dita, esta é mantida na temperatura de ensaio pela manta de aquecimento (3) e controlada pelos sensores de temperatura (4a) e de pressão (5b);
- e) após determinado tempo de residência da amostra no reator batelada (1), este é descarregado pela válvula solenóide na base do reator batelada (suprimida da Figura 23), saindo por esta o vapor, que é então condensado para formar a fração líquida (aproximadamente 250 mL), hidrolisados, a fração sólida permanece no leito e é removida pelo topo do reator batelada (1), o procedimento de abertura também leva aproximadamente 20 segundos.

3.2.4 Teor de Matéria Seca Definitiva (Matéria Seca 105°C)

Procedeu-se a secagem em estufa a temperatura de 105°C por 12 h de 2,00 g de amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, em cadinho de porcelana, e, após retirou-se os cadinhos da estufa sendo resfriados em dessecador por aproximadamente 1 h, até a temperatura da amostra se igualar a temperatura ambiente, após foi realizada a pesagem, sendo que a diferença de massa representa a umidade bruta e a quantidade de matéria seca definitiva é dada pela Equação 3.

$$\%MS(105^{\circ}C) = \frac{MAS}{MAI} \times 100 \quad (3)$$

Onde, $\%MS(105^{\circ}C)$ é a porcentagem de matéria seca definitiva na amostra, MAS é a massa seca presente na amostra e MAI é a massa de amostra inicial (úmida).

Este mesmo procedimento foi utilizado para determinação da perda de massa no pré-tratamento hidrotérmico das amostras e também antes da caracterização do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pelo método de Van Soest, no qual se utilizou o quantitativo de 1,00 g de matéria seca 105°C.

3.2.5 Método de Van Soest para Determinação de Fibras

Foram realizadas análises químicas da amostra de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento e após a realização de cada pré-tratamento hidrotérmico, utilizando-se o método de fracionamento de fibras Van Soest, conforme descrito por Van Soest e Wine (1968), Silva (2002) e Rodrigues (2010) para a determinação de teor de conteúdo celular, teor de hemicelulose, teor de lignina, teor de celulose e teor de cinzas.

Para a análise da amostra de bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento foi utilizada a amostra preparada e classificada granulometricamente em *mesh* 10/14 série Tyler, já as amostras que foram pré-tratadas hidrotérmicamente não sofreram posterior modificações ou classificação granulométrica para esta análise, para esta análise as amostras pré-tratadas foram apenas secadas a uma temperatura de 105°C em estufa por 4 h e resfriadas em dessecador por 1 h.

3.2.5.1 Determinação de Fibra em Detergente Neutro (FDN)

3.2.5.1.1 Teor de Fibras em Detergente Neutro

Acondicionou-se 0,300 g da amostra em tubo de ensaio graduado de 50 ml, adicionou-se 35 mL da Solução de Fibras em Detergente Neutro, aqueceu-se durante um período de 5 min a 10 min até ebulição. Após o início da ebulição foi marcado o tempo de 1 h para digestão e o calor foi reduzido para evitar formação de espuma mantendo a digestão em nível lento e constante a uma temperatura de 120°C a 125°C, a amostra foi periodicamente agitada quando esta se depositou acima da solução de FDN. Após a digestão realizou-se imediatamente uma filtração, por sucção a vácuo, com a realização de duas lavagens cuidadosas com água deionizada a aproximadamente 100°C. Lavou-se duas vezes com 30 mL a 40 mL de acetona ou até que a amostra se tornou incolor, a amostra foi então acondicionada em cadinho de porcelana, previamente pesado, e colocada para seca em estufa a 105°C por pelo menos 4 h, após foi colocado para esfriar em dessecador por 1 h.

A massa obtida após este procedimento forneceu a massa de fibras em detergente neutro (Equação 4).

$$MFDN = A - Massa(Cadinho) \quad (4)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 5).

$$\%FND = \frac{MFDN}{Massa(Amostra)} \times 100 \quad (5)$$

Ajuste à base de 100% da matéria seca (Equação 6).

$$Base\ sec = \frac{\%FND}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100 \quad (6)$$

Onde, A é a massa da amostra com o cadinho, $MFDN$ é a massa de fibras em detergente neutro na amostra, $\%FND$ é a porcentagem de fibras em detergente neutro na amostra, e $\%MS(105^{\circ}C)$ é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.1.2 Teor de Conteúdo Celular

A quantidade de conteúdo celular na amostra foi determinada pela diferença de massa obtida entre a massa da amostra inicial e a massa de fibras em detergente neutro (Equação 7).

$$MCC = Massa(Amostra) - MFDN \quad (7)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 8).

$$\%CC = \frac{MCC}{Massa(Amostra)} \times 100 \quad (8)$$

Ajuste à base de 100% da matéria seca (Equação 9).

$$Base\ sec = \frac{\%CC}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100 \quad (9)$$

Onde, $MFDN$ é a massa de fibras em detergente neutro na amostra, MCC é a massa de conteúdo celular na amostra, $\%CC$ é a porcentagem de conteúdo celular na amostra, e $\%MS(105^{\circ}C)$ é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.2 Determinação da Fibra em Detergente Ácido (FDA)

3.2.5.2.1 Teor de Fibras em Detergente Ácido

Para a digestão acondicionou-se 1,000 g da amostra pré-seca, e adicionou-se 100 mL de solução detergente ácida e 2 mL de decahidronaftaleno. Aqueceu-se durante um período de 5 min a 10 min até a ebulição, após o início da ebulição foi marcado o tempo de 1 h para digestão e o calor foi reduzido para evitar formação de espuma mantendo a digestão em nível lento e constante. Após este período realizou-se imediatamente uma filtragem, por sucção a vácuo, com a realização de duas lavagens cuidadosas com água deionizada a aproximadamente 100°C. Lavou-se duas vezes com 30 mL a 40 mL de acetona ou até que a amostra se tornou incolor, a amostra foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente pesado. Após este procedimento a amostra foi seca a 105°C em estufa por 8 h, resfriada em dessecador por 1 h, e depois pesada.

A massa obtida após este procedimento fornece a massa de fibras em detergente ácido (Equação 10).

$$MFDA = B - \text{Massa}(\text{Cadinho}) \quad (10)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 11).

$$\%FDA = \frac{MFDA}{\text{Massa}(\text{Amostra})} \times 100 \quad (11)$$

Ajuste à base de 100% da matéria seca (Equação 12).

$$\text{Base sec} = \frac{\%FDA}{\%MS(105^\circ C)} \times 100 \quad (12)$$

Onde, B é a massa da amostra com o cadinho, $MFDA$ é a massa de fibras em detergente ácido na amostra, $\%FDA$ é a porcentagem de fibras em detergente ácido na amostra, e $\%MS(105^\circ C)$ é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.2.2 Teor de Hemicelulose

O teor de hemicelulose na amostra foi determinado pela diferença de massa obtida entre a diferença de massa da amostra e PFDA com a massa do conteúdo celular na amostra (Equação 13), determinado por FDN.

$$MHEM = Massa(amostra) - MFDA - MCC \quad (13)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 14).

$$\%HEM = \frac{MHEM}{Massa(Amostra)} \times 100 \quad (14)$$

Ajuste à base de 100% da matéria seca (Equação 15)

$$Base\ sec = \frac{\%HEM}{\%MS(105^{\circ}C)} \times 100 \quad (15)$$

Onde, *MFDA* é a massa de fibras em detergente ácido na amostra, *MCC* é a massa de conteúdo celular na amostra, *%HEM* é a porcentagem de hemicelulose na amostra, e *%MS(105°C)* é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.2.3 Teor de lignina

A amostra restante do procedimento de determinação do teor de hemicelulose e conteúdo celular foi colocada, com o cadinho, em uma bandeja de vidro contendo uma camada d'água de 2 cm a 3 cm de altura. Adicionou-se no cadinho de 20 mL a 30 mL de Solução Combinada de Permanganato 2:1, o nível d'água foi mantido no mesmo nível da solução no cadinho, a solução foi agitada com bastão de vidro permitido que a solução entrasse em contato com todas as partículas por 15 min, após foi realizado uma filtração a vácuo e a água da bandeja foi renovada, o procedimento foi repetido adicionando-se 30 mL de Solução Combinada de Permanganato 2:1 permanecendo agora por 1h e 30 min. Observou-se para que a cor púrpura fica-se presente em todo o tempo de oxidação.

Novamente é realizada a filtração a vácuo e o cadinho novamente é colocado na bandeja como anteriormente já descrito adicionando-se no cadinho de 20 mL a 30 mL de Solução de Desmineralização permanecendo em contato com as fibras por 10 min. Após é realizado a filtração e novamente repete-se o processo adicionando

a mesma quantidade de Solução de Desmineralização anteriormente utilizada, a fim de que a fibra ficasse de cor clara, após 10 min realizou-se nova filtração e lavagem das fibras primeiramente com etanol 80% por duas vezes, a amostra é então succionada até secar e após realizou-se duas lavagens utilizando de 30 mL a 40 mL de Acetona. Após este procedimento a amostra foi seca a 105°C em estufa por 8 h, e posteriormente resfriada em dessecador, e então o cadinho com amostra foi pesado.

A diferença de massa obtida entre a amostra após este procedimento e a massa de fibras em detergente ácido fornece a massa de lignina da mesma (Equação 16).

$$MLIG = MFDA - [C - Massa(Cadinho)] \quad (16)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 17).

$$\%LIG = \frac{PLIG}{Peso(Amostra)} \times 100 \quad (17)$$

Ajuste à base de 100% da matéria seca (Equação 18).

$$Base\ sec = \frac{\%LIG}{\%MS(105^\circ C)} \times 100 \quad (18)$$

Onde, *MFDA* é a massa de fibras em detergente ácido na amostra, *C* é a massa da amostra com o cadinho após a análise do teor de lignina, *%LIG* é a porcentagem de lignina na amostra, e *%MS(105°C)* é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.2.4 Teor de Cinzas

A amostra restante do procedimento de determinação do teor de lignina foi incinerada em forno mufla, com o cadinho, durante 2 h a 500°C, após resfriada naturalmente em dessecador por 1 h. A amostra foi então pesada, resultando diretamente na massa de cinzas na amostra (Equação 19).

$$MCIN = D - Massa(Cadinho) \quad (19)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 20).

$$\%CIN = \frac{MCIN}{Massa(Amostra)} \times 100 \quad (20)$$

Determinação da matéria orgânica (Equação 21).

$$MO = 100\% - \%CIN \quad (21)$$

Onde, $MCIN$ é a massa de cinzas na amostra, D é a massa da amostra com o cadinho após a análise do teor de cinzas, $\%CIN$ é a porcentagem de cinzas na amostra, e $\%MS(105^\circ C)$ é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.5.2.5 Teor de Celulose

A massa de celulose é dada pela diferença de massa de C menos a massa do cadinho com $MCIN$ (Equação 22).

$$MCEL = [C - Massa(Cadinho)] - MCIN \quad (22)$$

Cálculo da porcentagem final (Equação 23).

$$\%CEL = \frac{MCEL}{Massa(Amostra)} \times 100 \quad (23)$$

Onde, $MCEL$ é a massa de celulose na amostra, C é a massa da amostra com o cadinho após a análise do teor de lignina, $\%CEL$ é a porcentagem de celulose na amostra, e $\%MS(105^\circ C)$ é a porcentagem de matéria seca na amostra.

3.2.6 MEV

Foram realizadas duas microscopias por amostra de bagaço de cana-de-açúcar, uma do colmo e outra da casca, sem pré-tratamento e da fração sólida resultante dos pré-tratamentos hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, realizadas com tensão de aceleração de 15,0 kV no equipamento de marca SHIMADZU, modelo SSX-550 SUPERSCAN, no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (LMEV) do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia (CCET) da Universidade de Caxias do Sul - Campus Universitário de Caxias do Sul.

3.2.7 Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com Camassola (2007). Em frascos de 50 mL foram adicionados tampão citrato de sódio (pH 4,8; 50 mM), caldo enzimático e as diferentes amostras de bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-

tratado. Empregou-se a carga enzimática de 15 FPU/g de substrato. A mistura foi incubada na presença de 0,01% (m/v) de azida sódica, a 50°C, que é a condição ótima para a atividade enzimática de *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1, sob agitação de 150 rpm. Volumes de 1 mL foram coletados nos tempos de hidrólise 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h e 60 h de hidrólise. Estas amostras foram centrifugadas e do sobrenadante foram determinados os açúcares.

3.2.8 Determinação de ARTs e Glicose

Os açúcares presentes nas soluções provenientes da hidrólise enzimática foram dosados pelo método de DNS descrito por Miller (1959) e a glicose liberada foi determinada por kit de glicose PAP Liquiform, Labtest[®] utilizando-se 5 µL do hidrolisado diluído 10 vezes. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro SPECTRAMAX 190 do Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul - Campus Universitário de Caxias do Sul. Foi construída uma curva padrão de glicose para converter os valores de absorvância para concentração de açúcares.

3.2.9 CLAE

A dosagem de açúcares foi realizada por CLAE no Laboratório de Enzimas e Biomassa do Instituto de Biotecnologia (IB) da Universidade de Caxias do Sul - Campus Universitário de Caxias do Sul, em equipamento SHIMADZU, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 60°C, utilizando H₂SO₄ (5 mM) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 40 µL, sendo que estas amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro Sep-Pack C18 (Millipore).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TEOR DE MATÉRIA SECA DEFINITIVA (MATÉRIA SECA 105°C)

Na data da realização dos pré-tratamentos das amostras de bagaço de cana-de-açúcar, a umidade relativa do ar foi de 77%, medida no Laboratório de Reatores, local onde foi armazenada a amostra preparada e onde se encontra a Unidade de Pré-tratamento Hidrotérmico de Lignocelulósicos da Universidade de Caxias do Sul.

Foram submetidas amostras de bagaço de cana-de-açúcar a análise de teor de massa seca definitiva, e obteve-se 88,67%±0,12% de teor de matéria seca definitiva na amostra (%MS105°C) e, conseqüentemente 11,33%±0,12% de teor de umidade bruta.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foi caracterizado quimicamente, pelo método de fracionamento de fibras Van Soest, apresentando 93,14%±0,21% de fibras em detergente neutro (FDN) e 68,13%±0,93% de fibras em detergente ácido (FDA), a composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar em estudo e os desvios padrões são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

Componentes	Quantitativo (%)
Celulose	46,22 ±1,11
Hemicelulose	25,15 ±0,90
Lignina	19,70 ±1,80
Conteúdo Celular	6,86 ±0,21
Cinzas	2,05 ±0,25

Fonte: o autor (2012).

Os valores apresentados estão em base seca e estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Deve-se levar em conta que a constituição do lignocelulósico é o resultado de vários fatores referentes principalmente à espécie, ao cultivo e ao local de cultivo.

4.3 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

4.3.1 Perda Mássica

O percentual de perda mássica das amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 4), foi determinado em base seca, obtido retirando-se 2,000 g de cada amostra úmida e determinando a matéria seca, sabendo-se a massa úmida após o pré-tratamento estimou-se o quantitativo de matéria seca restante descontando a umidade, pois não é realizada a secagem das amostras após o pré-tratamento, mantendo assim as características da amostra após o pré-tratamento.

Tabela 4 - Perda mássica percentual das amostras submetidas ao pré-tratamento hidrotérmico

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tempo (min)	15	15	22	8	22	8	5	25	15	15
Temperatura (°C)	190	190	205	175	175	205	190	190	169	211
Perda de Massa (%)	9,97	11,16	21,67	6,04	8,76	14,97	6,29	14,95	4,55	32,70

Fonte: o autor (2012).

A umidade não é uma propriedade homogênea, sendo assim os valores são estimativas aproximadas da perda de massa nos experimentos realizados, porém fica evidente ao analisar a Tabela 4 que há perdas de massa significativas, nos experimentos realizados, as quais impactarão no quantitativo de bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizado para obtenção dos açúcares fermentescíveis, rendimento por biomassa bruta.

Para verificar a relação entre a perda de massa devido ao pré-tratamento hidrotérmico com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 4.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a perda de massa percentual das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente pode ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda de massa percentual do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
(2)Temperatura (L)	417,991	16,5278	0,597998	27,64	0,023024	12,752	20,303
Média	-4,7695	10,5278	0,595000	17,76	0,035815	6,809	14,322
Temperatura (Q)	-1,2732	6,1322	0,800782	7,66	0,082666	1,0763	11,188
(1)Tempo (L)	0,0136	5,3928	0,591987	9,11	0,069605	1,655	9,130
1L* 2L	0,0095	1,9900	0,841457	2,36	0,254675	-3,323	7,303
Tempo (Q)	-0,0047	-0,4642	0,77325	-0,60	0,655915	-5,348	4,420
R ² = 90,70%		R ² ajuste = 79,07%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 5 percebe-se que o fator de interação linear das variáveis tempo e temperatura e o fator quadrático da variável tempo não se mostram estatisticamente significativos para uma confiança de 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão (Tabela 6), somente com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda de massa percentual de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança		
					-90%	+90%	
(2)Temperatura (L)	408,3029	57,8827	7,054	0,089652	42,84584	773,7600	
Média	-4,8013	0,6128	-7,854	0,080618	-8,66079	-0,9418	
Temperatura (Q)	0,3852	0,04228	9,110	0,069605	0,11823	0,6522	
(1)Tempo (L)	0,0141	0,00161	8,760	0,072357	0,00393	0,0242	
R ² = 90,12%		R ² ajuste = 85,17%					

Fonte: o autor (2012).

Observa-se que os fatores são significativos a 90% e teve um ajuste um pouco melhor que o modelo completo (todos os fatores), para analisar a predição do modelo foi realizado a análise de variância conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Análise de variância da superfície de resposta para perda de massa percentual de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	653,9	3	217,9937	18,243
Resíduo	71,71	6	11,9495	
Falta de ajuste	71,0014	5	14,2003	20,057
Erro puro	0,7080	1	0,7080	
Total	725,6782	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(3,6)} = 3,29$ para 90% tabelado

$F_{(5,1)} = 57,24$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 6 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 18,243, maior que o valor tabelado para $F_{(3,6)}$. O modelo também não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 20,057, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(5,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 90,12 % da variância (R^2).

A porcentagem de perda mássica de bagaço de cana-de-açúcar pode ser descrita através da Equação 24 considerando todos os fatores (com menor ajuste) ou através da Equação 25 considerando apenas os fatores significativos (Figura 24).

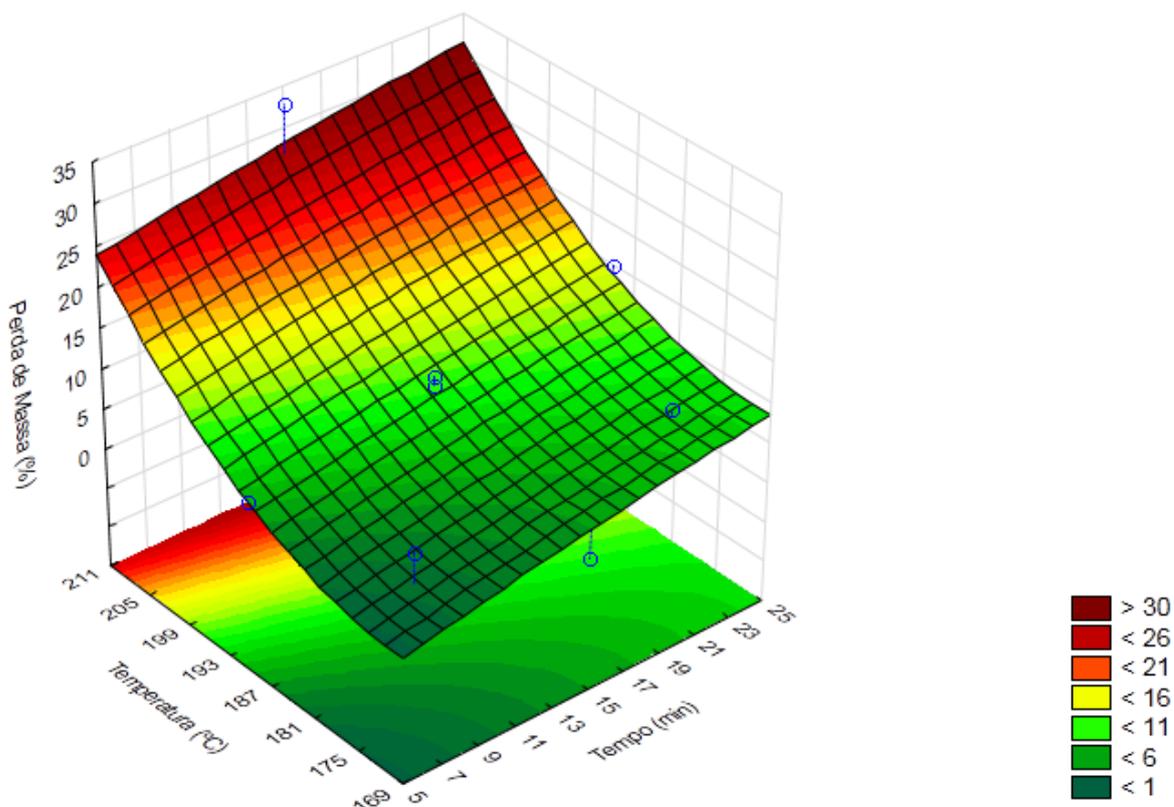
$$\%PM = 417,99 - 4,7695t - 1,2732T - 0,0047t^2 + 0,0095tT + 0,0136T^2 \quad (24)$$

$$\%PM = 408,3029 - 4,8013t + 0,3852T + 0,0141T^2 \quad (25)$$

Onde, $\%PM$ é a perda mássica percentual de bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}C$).

A Figura 24 apresenta a superfície de resposta para a perda mássica de bagaço de cana-de-açúcar resultante do pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca $105^{\circ}C$) de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 24 - Superfície de resposta para a perda mássica percentual de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

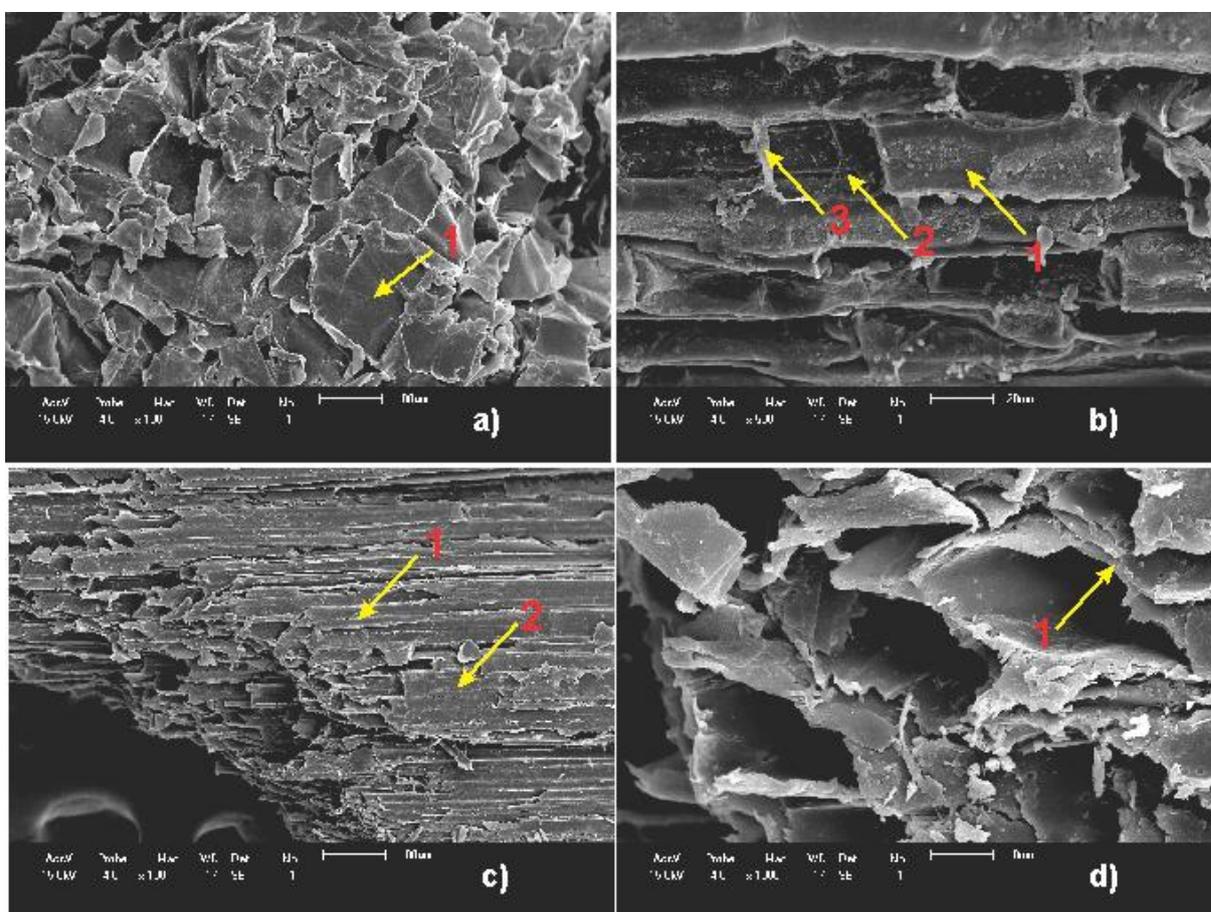
4.3.2 Caracterização Morfológica do Bagaço de Cana-de-açúcar por MEV

O bagaço de cana-de-açúcar apresenta duas partes com morfologias distintas, o colmo (estrutura porosa) parte interna da cana-de-açúcar e a casca (estrutura compacta) parte externa da cana-de-açúcar (com nódulos e entrenós), a Figura 25 mostra a morfologia destas partes para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

formando feixes de microfibrilas (a1), o colmo apresenta microporos (d2) em sua estrutura e uma organização aleatória com espaçamentos (c1), formando uma estrutura “esponjosa”, também possui uma camada protetora de materiais não fibrosos (c2) (MANDAL; CHAKRABARTY, 2011).

A Figura 26 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 1, tempo de 15 min e temperatura de 190°C.

Figura 26 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000



Fonte: o autor (2012).

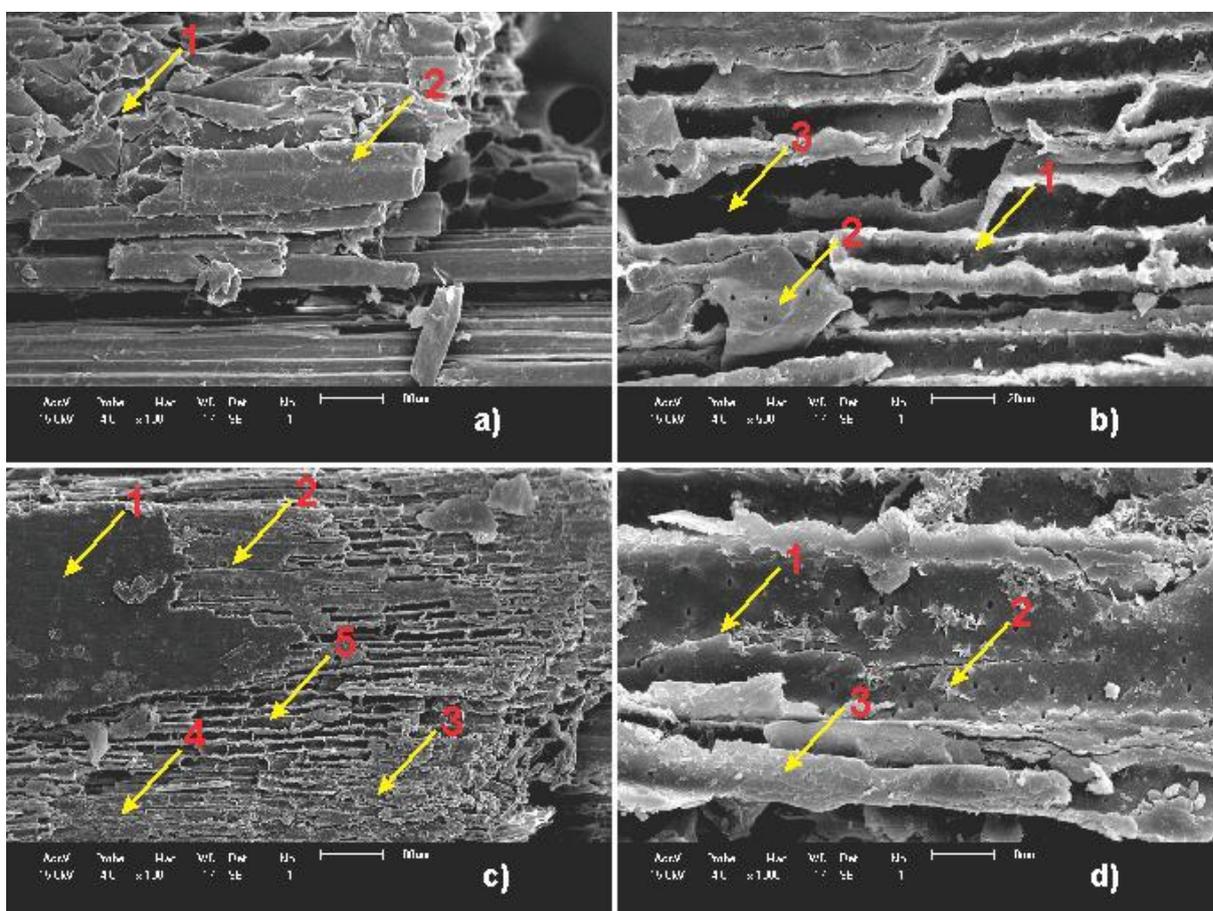
As micrografias apresentadas na Figura 26 mostram que para as diferentes partes fibrosas que constituem o bagaço de cana-de-açúcar há efeitos distintos causados pelo pré-tratamento hidrotérmico sobre estas partes, é possível observar que há alterações superficiais, se visualiza “trincas” e o início de pequenas fissuras (a1), porém é possível observar alterações mais significativas (c), sendo possível

observar que as camadas protetoras foram removidas expondo as estruturas tubulares (a1), porém ainda há camadas protetoras em pequenas regiões (a2), observa-se ainda que as fibras permaneceram compactas e sem grandes fissuras.

Observa-se que há a remoção das células (b1) com formação de lacunas (b2), expondo a camada inferior, visualiza-se a parede que envolvia uma célula (b3).

A Figura 27 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 2, tempo de 15 min e temperatura de 190°C.

Figura 27 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000



Fonte: o autor (2012).

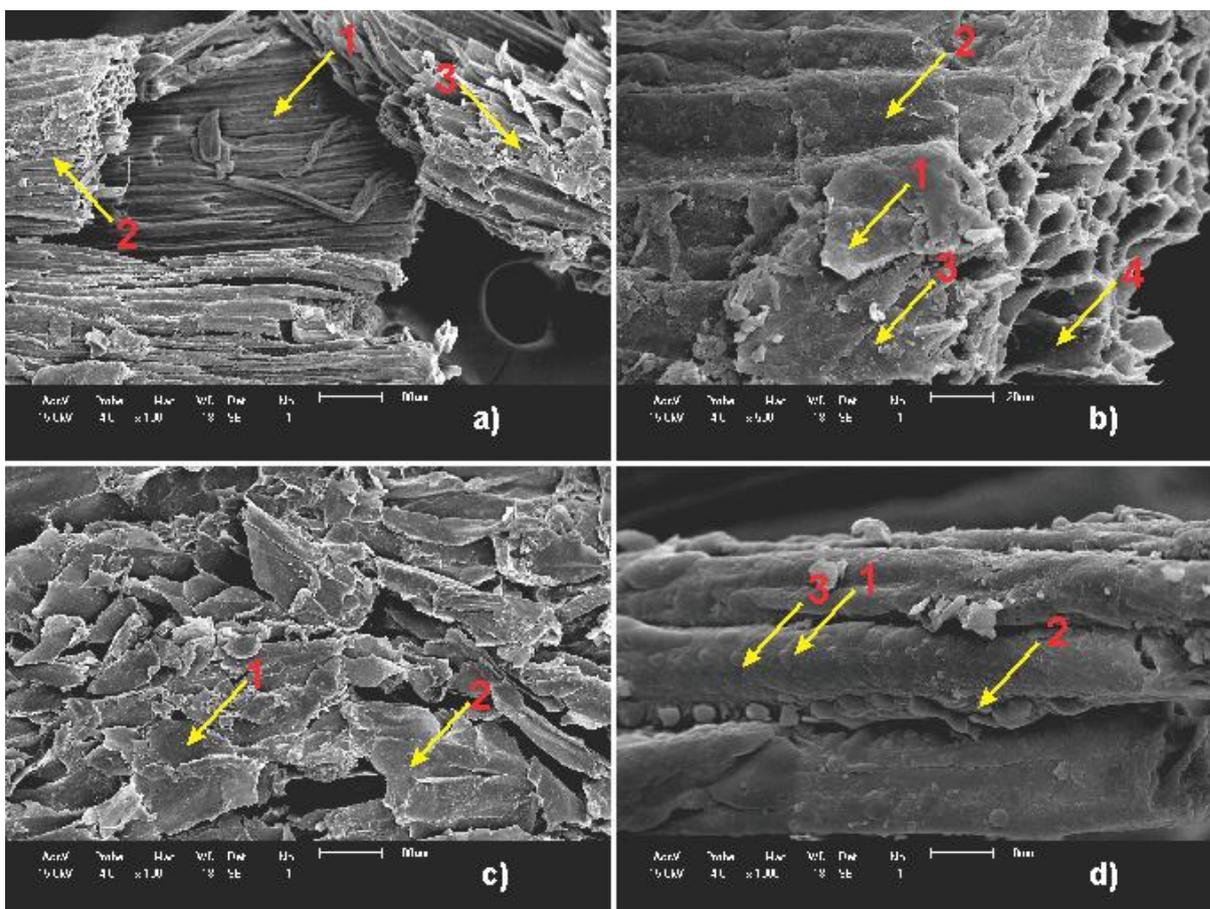
As micrografias apresentadas na Figura 27 mostram a desestruturação das fibras e o rompimento das estruturas, observa-se que há fissuras pequenas e fragmentação da estrutura (a1). É possível visualizar as etapas básicas ocorridas neste pré-tratamento (c), observa-se que ainda há uma estrutura protetora sendo

removida, em camadas, da mais externa (a1) para as mais internas (a2), observa-se também a desestruturação e a presença de pequenas fissuras (c3) que resultarão na formação de “módulos” (a2 e c4) que posteriormente são removidos da estrutura deixando lacunas (a5), que acabam expondo as camadas inferiores de fibras.

Observa-se, ainda, que há grandes fissuras (d1) e que o rompimento das estruturas tubulares (b1) possivelmente aumenta a acessibilidade pela formação de lacunas (a3), observa-se que a estrutura “Inchou” e formou rugosidades na superfície (b2, d3) e que possivelmente houve migração da lignina para a superfície (d2).

A Figura 28 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 3, tempo de 22 min e temperatura de 205°C.

Figura 28 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 22 min a 205°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000

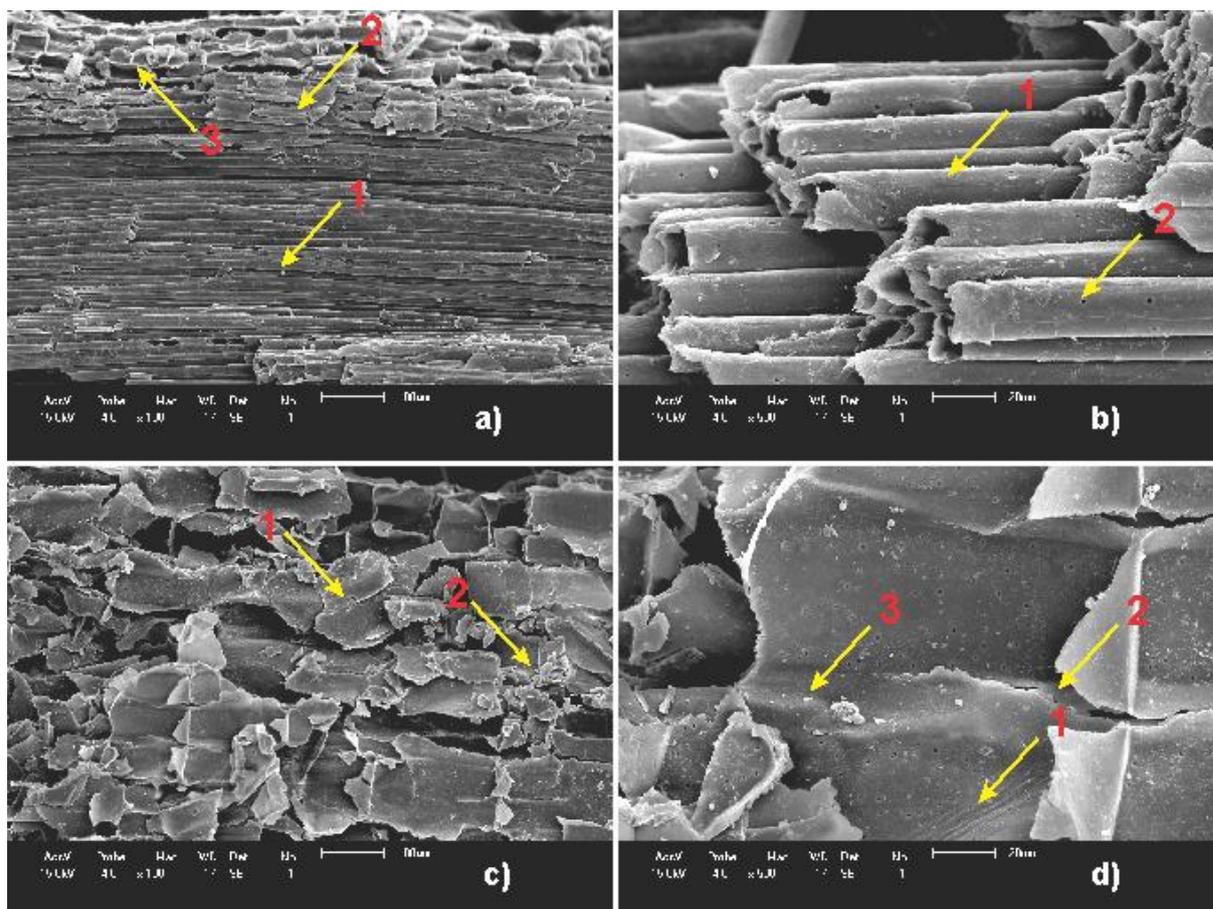


Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 28 mostram as fibras expostas (a1) e a fragmentação das camadas externas (a2, b1 e c1), observa-se fragmentação das estruturas tubulares (a3) e uma grande quantidade de fissuras e “trincas” (b3 e c1) e uma superfície rugosa (c2 e d3) com aspecto de “inchada” (d3) observa-se também que sobre toda a estrutura há a formação de deposições “globulares” (d2), a lignina tem a tendência de migrar para a superfície e depositar-se sobre ela. Observa-se também a tendência destas formações estarem localizadas nos microporos, deduz-se que estes sirvam de caminho e espaços para mobilidade da lignina, este efeito também pode ser observado na parte internas da estrutura tubular (b4).

A Figura 29 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 4, tempo de 8 min e temperatura de 175°C.

Figura 29 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 8 min a 175°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500

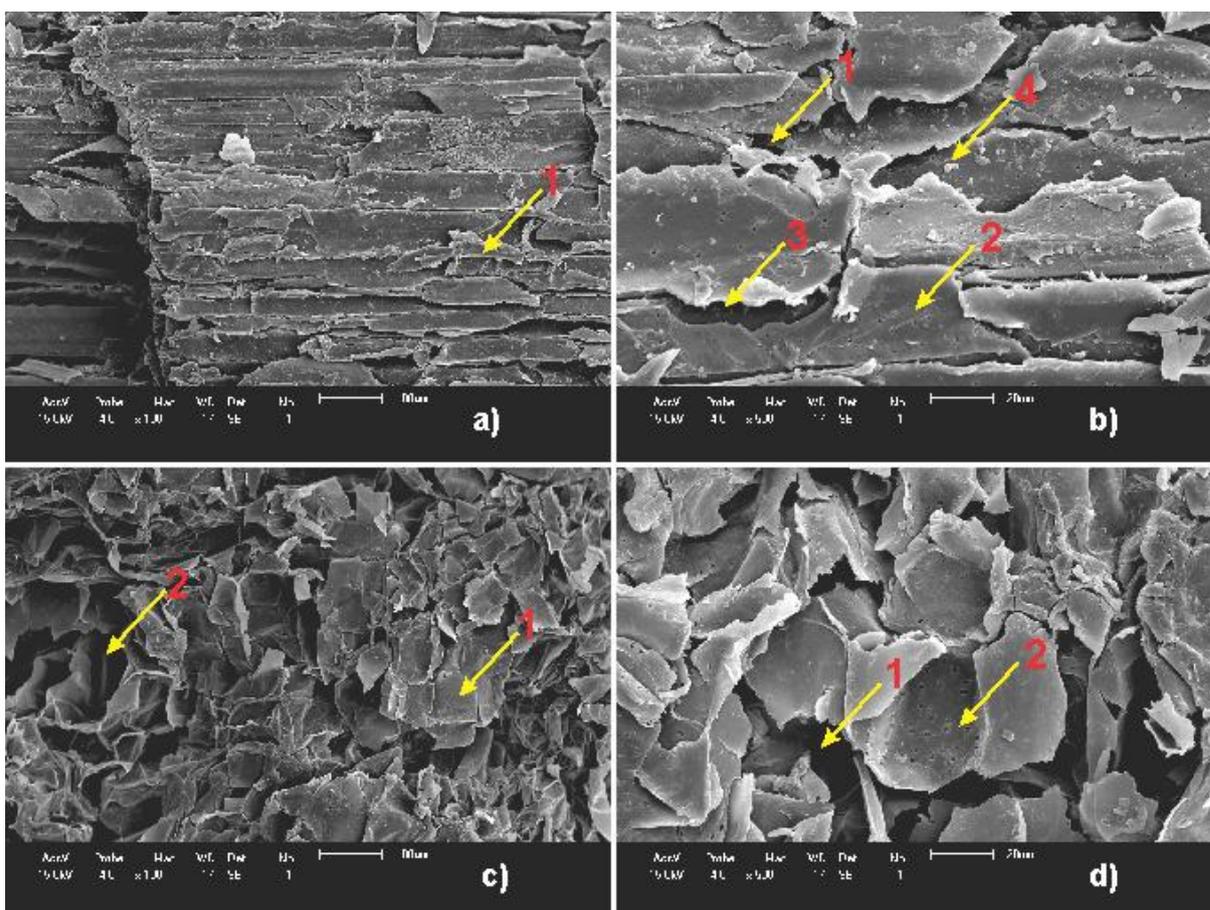


Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 29 mostram as fibras expostas com espaçamentos entre as fibrilas (a1), mostra a presença de fissuras (c1, d2) e fragmentação das fibras (a2), gerando “módulos” fibrosos (a2), que são removidos deixando lacunas e as fibrilas internas expostas (a3) observa-se as estruturas tubulares totalmente expostas (b1), a fragmentação das estruturas (a3 e c2), os canais vasculares sem deposição de material (b2) e uma superfície rugosa (d1) com a presença de glóbulos na superfície (d3).

A Figura 30 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 5, tempo de 22 min e temperatura de 175°C.

Figura 30 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 22 min a 175°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500



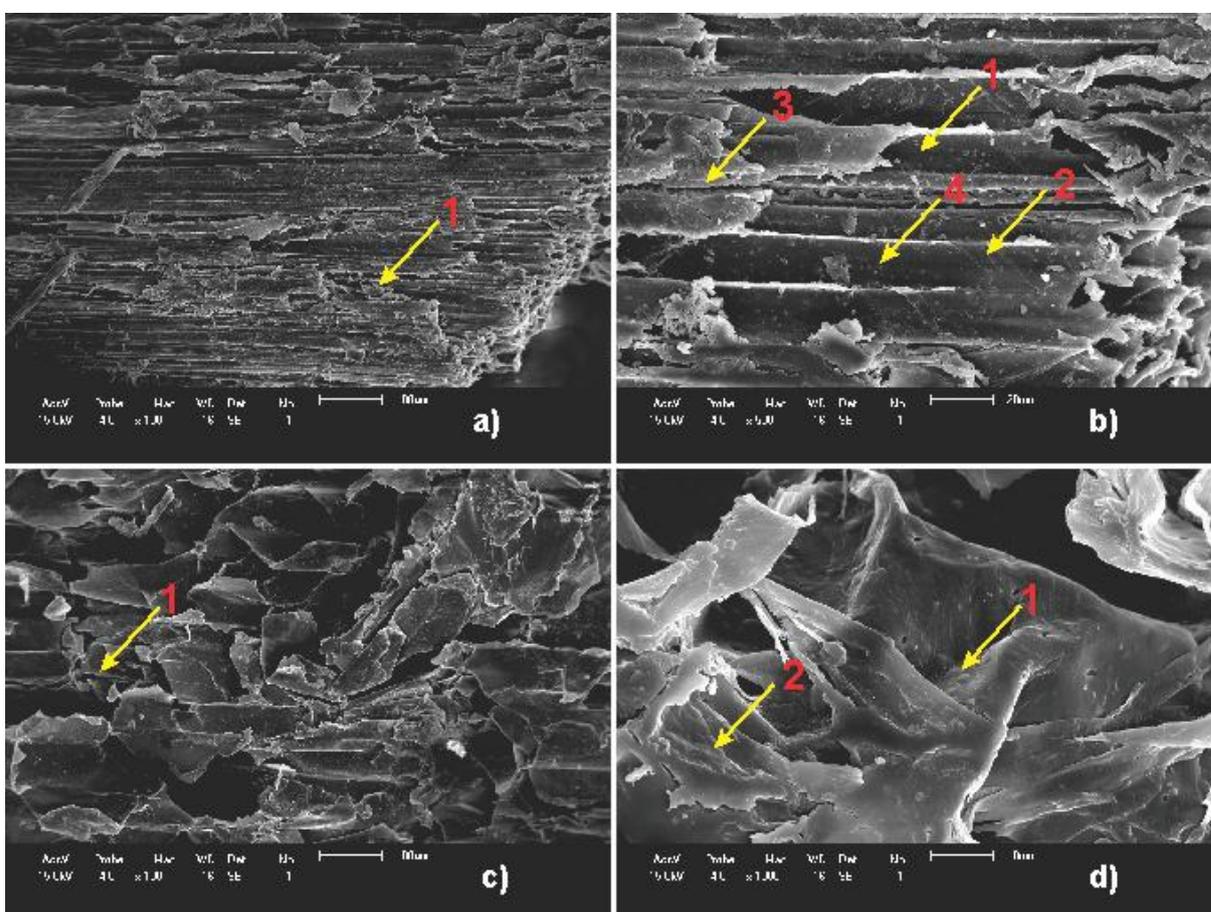
Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 30 mostram a fragmentação da estrutura externa protetora (a1 e b1), a presença de pequenas fissuras (b2) e

grandes fissuras (b3), fibras expostas apresentam glóbulos na superfície (b4), observa-se também outros efeitos distintos, onde a superfície aparenta ser um pouco rugosa (c1) com presença de grandes espaçamentos na estrutura (a1 e d1), formação de grandes poros (d2) e não se observa deposição ou glóbulos na superfície desta estrutura (d2).

A Figura 31 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 6, tempo de 8 min e temperatura de 205°C.

Figura 31 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 8 min a 205°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000



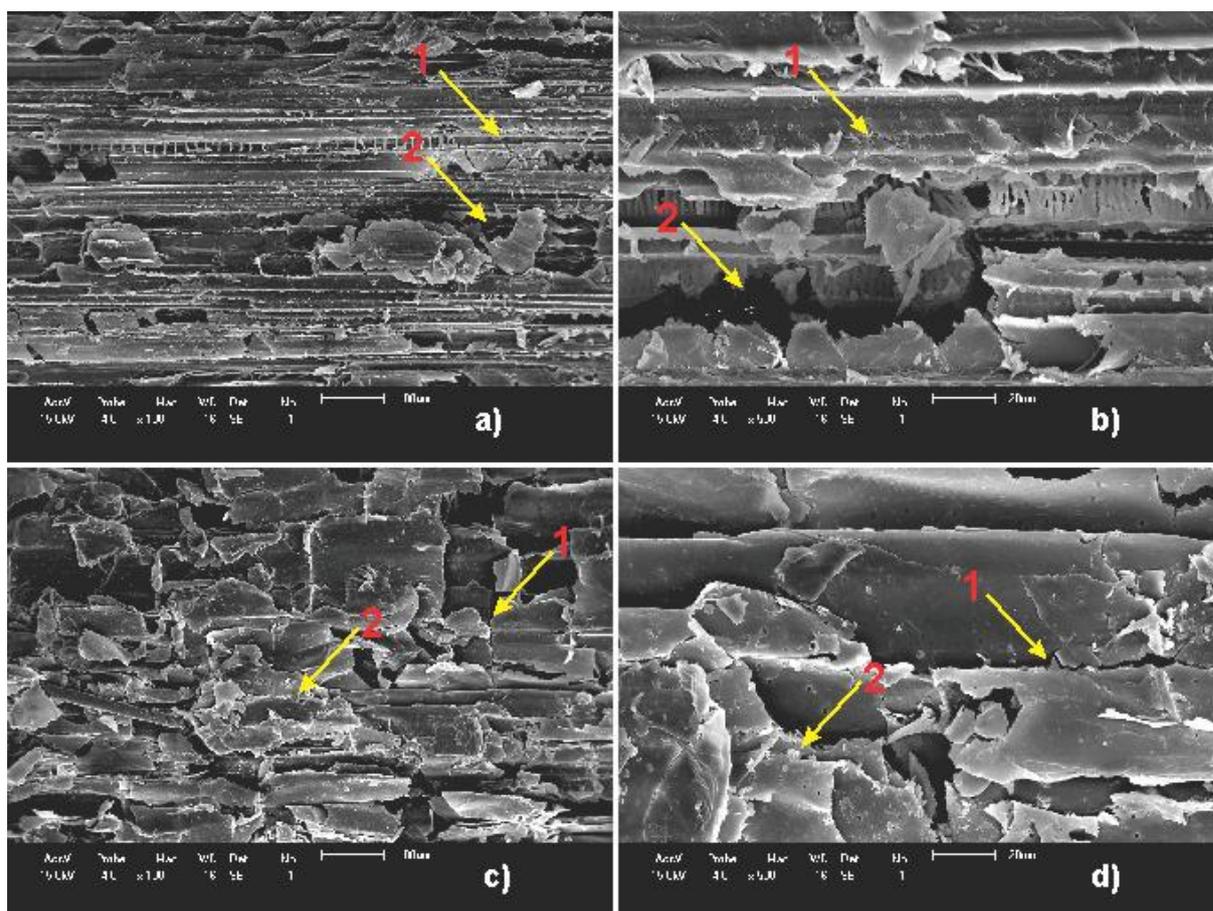
Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 31 mostram fragmentação mais acentuada das estruturas (a1, c1), com rompimento das estruturas tubulares (b1), a presença de pequenas fissuras (b2) e grandes fissuras (b3) sobre as estruturas tubulares, observa-se também a presença de diversos pequenos glóbulos sobre a

superfície das estruturas (b4, d1), a superfície se tornou rugosa com um aparente “inchamento” da estrutura (d2).

A Figura 32 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 7, tempo de 5 min e temperatura de 190°C.

Figura 32 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 5 min a 190°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x500

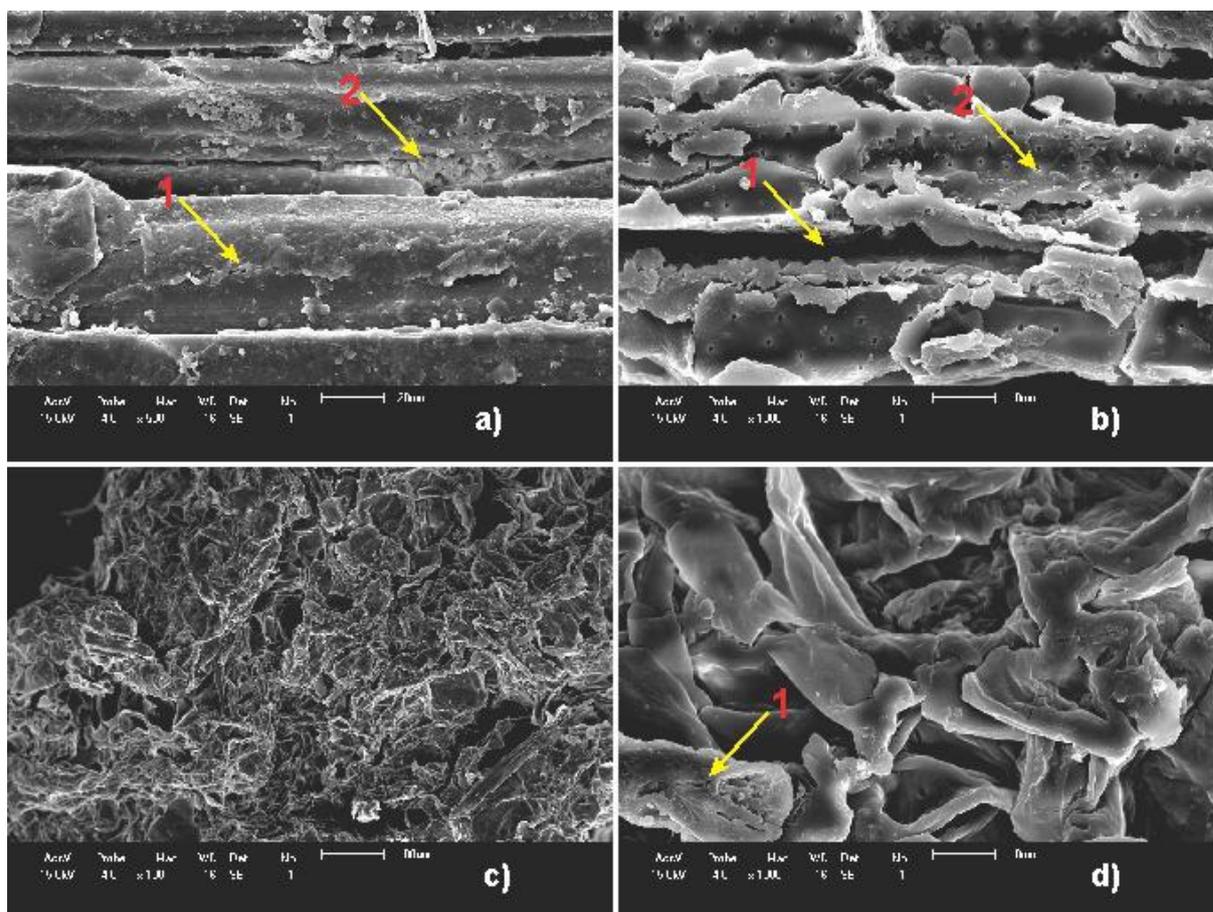


Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 32 mostram o rompimento das estruturas com presença de pequenas fissuras (b1, c2) e grandes fissuras (b2, c1 e d1), causando à presença de espaçamentos (a1), os quais expõem as fibras internas. É possível observar que há uma quantidade muito pequena de glóbulos sobre a superfície (d2).

A Figura 33 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 8, tempo de 25 min e temperatura de 190°C.

Figura 33 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 25 min a 190°C: a) x500; b) x1000; c) x100; d) x1000



Fonte: o autor (2012).

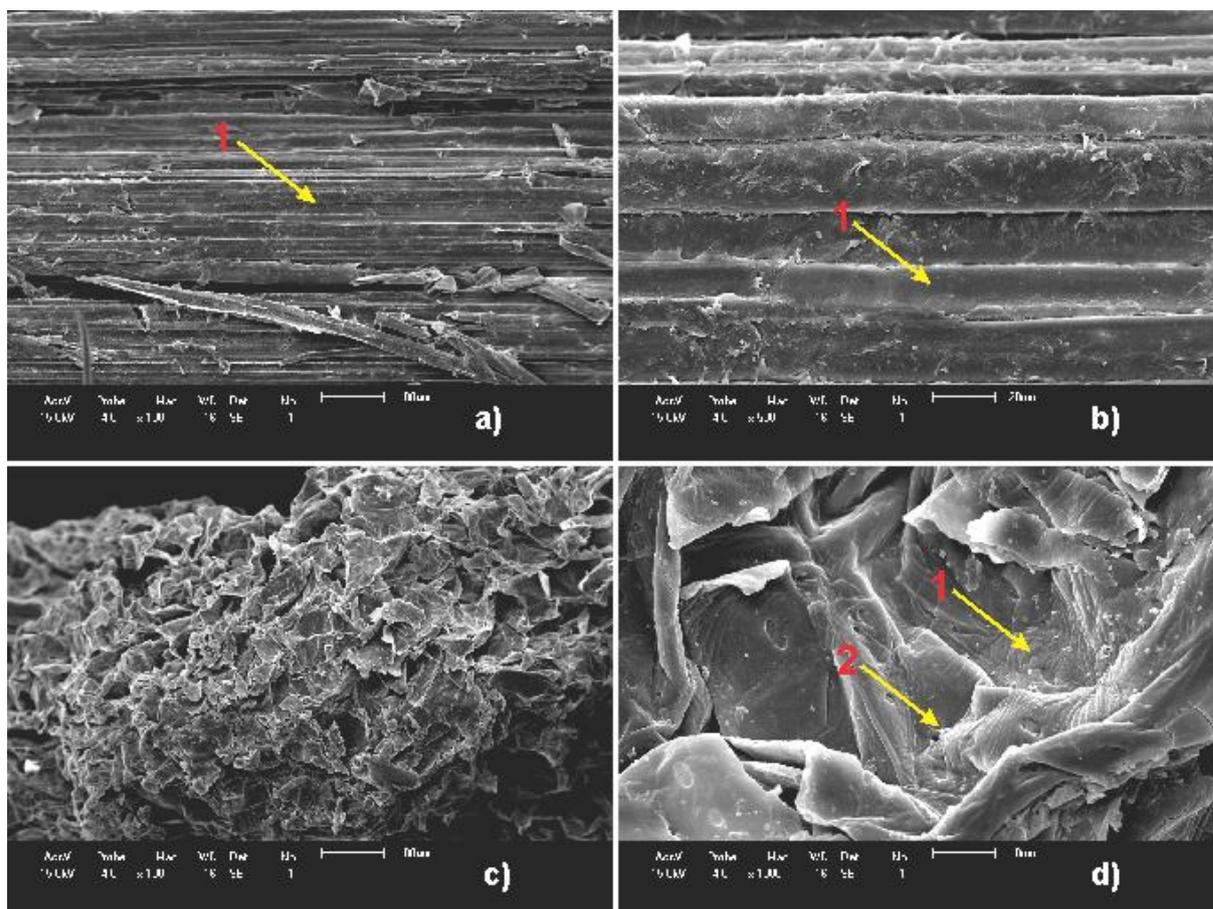
As micrografias apresentadas na Figura 33 mostram dois efeitos distintos sobre os diferentes componentes presentes na estrutura da cana-de-açúcar, nota-se que as estruturas tubulares foram totalmente rompidas e fragmentadas (b), apresentando fissuras (b1) e microporos de maior tamanho (b2) em relação ao bagaço *in natura*, nota-se também que a superfície das fibras ficou irregular (a1) com uma grande quantidade de pequenos glóbulos sobre a superfície (a2), lignina.

Observa-se também que houve a degradação de uma parte dos constituintes da composição do bagaço, a micrografia 'c' característica de processo de degradação das fibras por temperatura. Na micrografia 'd' observa-se que as fibras

perderam as suas características e se deformaram formando uma superfície rugosa (d1) e aparentemente com poucas fissuras (d1).

A Figura 34 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 9, tempo de 15 min e temperatura de 169°C.

Figura 34 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 169°C: a) x100; b) x500; c) x100; d) x1000



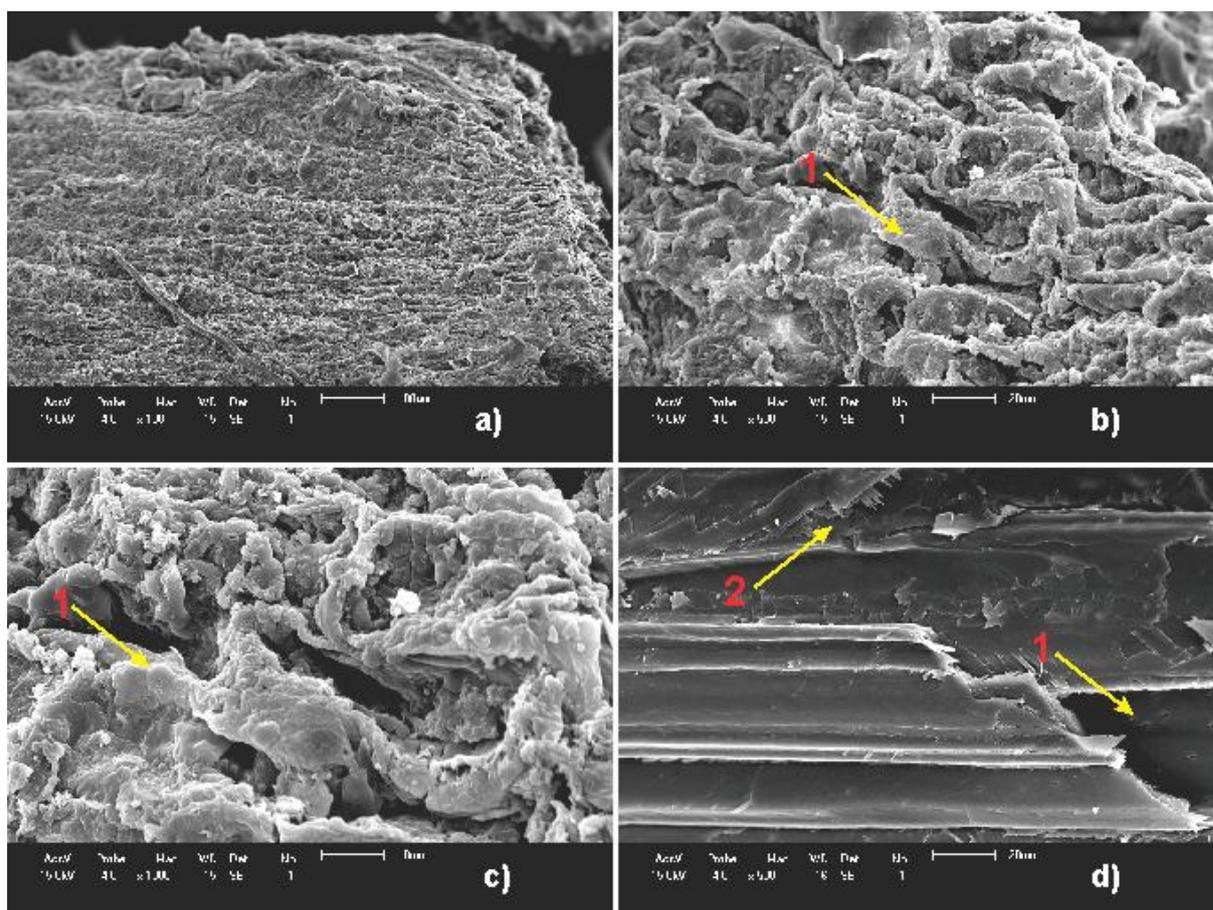
Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 34 mostram que não houve grandes modificações morfológicas das estruturas, nota-se que as fibras permaneceram compactas (a1), sem espaçamentos, sem fissuras ou rompimento (a1 e b1) e com as camadas protetoras de materiais não fibrosos intacta (b1). Observam-se algumas modificações na estrutura mais “esponjosa” (c), observa-se que não há muitos “poros” abertos na estrutura, devido às camadas protetoras ainda intactas, as alterações observadas são mostradas na micrografia d, onde se observa uma

superfície irregular com muita rugosidade (d1) e a presença de alguns glóbulos de lignina na superfície (d2) e um aparente “inchamento” da estrutura.

A Figura 35 mostra as mudanças estruturais ocorridas nos constituintes do bagaço de cana-de-açúcar, decorrentes do pré-tratamento hidrotérmico nas condições experimentais 10, tempo de 15 min e temperatura de 211°C.

Figura 35 - MEV para amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente por 15 min a 211°C: a) x100; b) x500; c) x1000; d) x500



Fonte: o autor (2012).

As micrografias apresentadas na Figura 35 mostram que a superfície está totalmente descaracterizada e que grande parte da camada externa de fibras foi removida ou sofreu degradação (a), a superfície se tornou irregular com rugosidades e uma grande quantidade de glóbulos sobre a superfície (b1 e c1), já as paredes das estruturas tubulares foram rompidas (d1) e ficaram expostas, apresentando ainda pequenas fissuras (d2).

4.3.3 Composição Química das Amostras Pré-tratadas Hidrotérmicamente

A composição química das amostras após o pré-tratamento hidrotérmico, conforme condições definidas no planejamento experimental foram quantificadas pelo método sequencial de Van Soest para determinação de fibras, os resultados obtidos estão organizados na Tabela 8 em porcentagens baseadas em matéria seca definitiva, juntamente com o quantitativo percentual médio obtido na caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura (Experimento 0).

Tabela 8 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento hidrotérmico em diferentes tempos e temperatura de pré-tratamento

Exper.	t (min)	T (°C)	FDN (%)	FDA (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Conteúdo Celular (%)	Cinzas (%)
0	-	-	93,14	86,13	46,22	25,15	19,70	6,86	2,05
1	15	190	67,73	56,29	45,78	11,45	8,38	32,27	2,13
2	15	190	71,07	56,43	45,20	14,64	8,88	28,93	2,35
3	22	205	76,84	70,44	55,28	6,40	12,53	23,16	2,63
4	8	175	81,39	60,50	47,79	20,89	10,40	18,61	2,32
5	22	175	75,94	60,75	47,94	15,19	10,78	24,06	2,03
6	8	205	66,61	66,46	53,36	0,15	10,64	33,39	2,46
7	5	190	76,75	57,64	45,93	19,11	9,69	23,25	2,02
8	25	190	63,50	44,41	33,70	19,09	8,57	36,50	2,14
9	15	169	86,40	63,92	49,29	22,49	12,60	13,60	2,03
10	15	211	71,25	65,31	49,93	5,95	12,73	28,75	2,64

Fonte: o autor (2012).

Nota: Pré-tratamentos realizados com água deionizada com pH medido em aproximadamente 6,5

Analisando a Tabela 8 pode-se constatar que o método de Van Soest para determinação de fibras não é adequado para a determinação dos constituintes da biomassa pré-tratada, pois se observa um grande aumento percentual na quantidade de conteúdo celular que estaria presente na amostra, pode-se atribuir este efeito observado ao método de análise, devido ao pré-tratamento hidrotérmico que provoca a desestruturação e fragmentação das fibras, deixando estas mais suscetíveis a serem removidas da matriz lignocelulósica.

Fica evidente ao analisar a coluna de FDN e FDA, uma grande redução na porcentagem de fibras restantes após a digestão do bagaço de cana-de-açúcar nas

soluções de FDN e de FDA, concluindo assim que estas removem mais constituintes além do conteúdo celular, resultando no aumento numérico de conteúdo celular observado.

Como o método de Van Soest é um método sequencial, os valores percentuais de celulose e hemicelulose, não representam a real quantidade destes constituintes no bagaço de cana-de-açúcar, pode-se deduzir que estes valores obtidos são representativos para a porcentagem dos constituintes que não sofreram grandes perturbações no pré-tratamento, permanecendo na matriz lignocelulósica.

Observa-se redução na porcentagem de lignina e hemicelulose mais significativamente, possibilitando afirmar que o pré-tratamento foi efetivo na remoção ou desestruturação destas frações, e ao analisarmos as porcentagens de lignina intacta restante na matriz lignocelulósica pode-se concluir que há uma tendência há haver um limite mínimo do constituinte no bagaço de cana-de-açúcar, matriz lignocelulósica, e que o pré-tratamento nas diversas condições estudadas provavelmente o atingiu, não sendo possível afirmar com certeza qual é este limite, devido às limitações do método de Van Soest.

4.3.3.1 Constituintes Principais do Bagaço de Cana-de-açúcar Removidos no Pré-tratamento Hidrotérmico

Para melhor analisar o método de Van Soest e os resultados obtidos, calculou-se a porcentagem mássica em base seca dos constituintes que foram removidos do bagaço de cana-de-açúcar pelo pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 9).

A Tabela 9 é resultado da verificação quantitativa da massa removida para cada constituinte, utilizando as porcentagens obtidas pelo método de Van Soest, para o bagaço *in natura* e para as amostras pré-tratadas. A quantidade mássica introduzida no reator em base seca foi comparada a quantidade mássica resultante, em base seca, levando-se em conta a perda mássica da amostra decorrente do pré-tratamento hidrotérmico.

Tabela 9 - Quantitativo percentual removido dos principais constituintes do bagaço de Cana-de-açúcar pelo pré-tratamento hidrotérmico

Exper.	t (min)	T (°C)	FDN (%)	FDA (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Conteúdo Celular (%)	Cinzas (%)
1	15	190	34,52	25,62	10,83	59,02	61,70	-323,44	6,39
2	15	190	32,21	26,42	13,12	48,28	59,94	-274,56	-1,79
3	22	205	35,38	19,02	6,32	80,06	50,17	-164,37	-0,34
4	8	175	17,89	16,56	2,85	21,97	50,42	-154,85	-6,15
5	22	175	25,61	18,65	5,37	44,89	50,07	-219,96	9,56
6	8	205	39,19	17,06	1,84	99,49	54,07	-313,82	-1,84
7	5	190	22,78	20,72	6,87	28,78	53,93	-217,56	7,76
8	25	190	42,01	44,56	37,99	35,43	62,98	-352,47	11,32
9	15	169	11,45	10,45	-0,39	14,66	38,96	-89,16	5,43
10	15	211	48,51	35,49	27,29	84,09	56,50	-182,00	13,20

Fonte: o autor (2012).

Ao analisarmos as perdas em fibras determinadas por FDN, atingindo até 48,51% no pré-tratamento 10 (Experimento 10) e por FDA, atingindo até 44,56% no pré-tratamento 8 (Experimento 8) fica evidente que há certa quantidade de fibras suscetíveis à ação dos reagentes empregados na análise, este efeito como anteriormente mencionado gera grande aumento percentual do conteúdo celular, houve um aumento de até 352,47% para o pré-tratamento 8 (Experimento 8) e sabe-se que o pré-tratamento reduz o conteúdo celular a níveis muito baixos ou até mesmo nulos.

Porém fica evidente que as soluções empregadas (FDN e FDA) removem estas quantidades das fibras mais suscetíveis, ao analisarmos as porcentagens para FDN e FDA observa-se que o efeito de remoção é muito mais significativo nos pré-tratamentos em que se obtiveram as maiores modificações morfológicas, tendo como tendência a aumentar a perda percentual de FDN e FDA com o aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento.

Analisando a coluna de celulose observa-se que não houveram grandes perdas com exceção dos pré-tratamentos mais severos, sendo o pré-tratamento 8 por 25min a 190°C com as maiores perdas, atingindo 37,99% e o pré-tratamento 10 15min a 250°C, atingindo 27,29%.

Observa-se uma grande perda mássica de hemicelulose no pré-tratamento 6, por 8min a 205°C, atingindo 99,49% de perda, os demais pré-tratamentos ficaram

abaixo dos 85%, observa-se também que o pré-tratamento 9, por 15 min a 169°C, teve a menor perda, atingindo 14,66% de perda de hemicelulose e este também se pode dizer que não teve perdas mássica de celulose, sendo o valor percentual encontrado de -0,39% considerado como erro proveniente do método analítico.

Observa-se que a perda de lignina atingiu um nível estável, na faixa dos 50% embora tenha havido uma grande quantidade de hemicelulose removida no pré-tratamento 6, por 8min a 205°C, observa-se que não houve um aumento em relação aos demais pré-tratamentos na remoção de lignina, pode-se afirmar que o limite máximo para remoção de lignina do bagaço de cana-de-açúcar no pré-tratamento hidrotérmico está na faixa dos 50% ($54,96 \pm 7,88\%$), sendo o máximo valor percentual encontrado de 62,98% para o pré-tratamento 8, por 25min a 190°C.

Analisando a coluna com os resultados para porcentagem de cinzas removidas no pré-tratamento pode-se observar que há valores negativos e não é possível atribuir estes valores a efeitos do pré-tratamento, aparentemente a grandeza dos valores são significativos, porém ao analisar quantitativamente observa-se que mesmo no experimento 10, maior porcentagem, a quantidade mássica aparentemente removida no pré-tratamento hidrotérmico é de 0,0027 g/g de biomassa analisada, e ainda não foi observado, conforme a Tabela 8, uma redução no teor de cinzas após o pré-tratamento, e sim um aumento do teor em relação ao teor do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento (*in natura*).

Pode-se atribuir os valores encontrados para a porcentagem de cinzas removidas a margem de erro experimental, pois a análise de FDA é realizada sequencialmente com diversas etapas, podendo haver pequenas perdas nas etapas de filtração e erros de medição de massa nas diversas etapas, todos estes efeitos somam-se e pequenos erros que são observados nas últimas etapas com mais ênfase. Não se pode descartar a possibilidade de remoção de certa quantidade de cinzas em alguns experimentos, porém não é possível afirmar a ocorrência deste pelas análises realizadas.

4.3.3.2 Superfícies de Resposta para os Efeitos Observados com a Aplicação do Pré-tratamento Hidrotérmico Sobre as Amostras de Bagaço de Cana-de-açúcar

Para melhor visualizar os resultados do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi construída superfícies de resposta para o modelo

CCDR para a celulose, hemicelulose e lignina, principais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar e de interesse.

Para a composição da equação que modela o fenômeno observado analisou-se os efeitos e sua significância, possibilitando assim ajustar o modelo para uma melhor resposta. Realizou-se a análise de variância para avaliar, sua predição, a significância do modelo proposto e a relação estatística entre a resposta e as variáveis para uma confiança de 90%.

4.3.3.2.1 Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Celulose no Pré-tratamento Hidrotérmico

Para verificar a relação entre a perda mássica percentual de celulose no pré-tratamento hidrotérmico com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 9.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a perda mássica percentual de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente pode ser visualizada na Tabela 10.

Tabela 10 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	-300,418	11,9772	1,145000	10,46	0,060675	4,748	19,206
(1)Tempo (L)	-5,583	15,6248	1,139202	13,71	0,046334	8,432	22,817
Tempo (Q)	0,051	4,9949	1,488548	3,35	0,184387	-4,403	14,393
(2)Temperatura (L)	3,301	12,5823	1,150768	10,94	0,058063	5,317	19,848
Temperatura (Q)	-0,009	-3,9888	1,541001	-2,59	0,23701	-13,718	5,741
1L* 2L	0,032	6,8200	1,619275	4,21	0,148405	-3,404	17,044
R ² = 69,38%	R ² ajuste = 31,10%						

Fonte: o autor (2012).

Analisando-se a Tabela 10 percebe-se que o fator de interação dos fatores lineares das variáveis tempo e temperatura e os fatores quadráticos das variáveis tempo e temperatura não se mostram estatisticamente significativos a 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão, somente com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores, obteve-se um ajuste pouco significativo, sendo os valores de 59,87% para R^2 e 48,41% para R^2 ajuste.

Diante disto realizou-se novamente a análise dos coeficientes de regressão suprimindo o fator quadrático da variável temperatura, menos significativo conforme a Tabela 10, obtendo-se uma redução do ajuste. Repetiu-se a análise suprimindo outros fatores e o melhor resultado foi obtido suprimindo os fatores linear e quadrático da variável temperatura, a análise de coeficiente de regressão para este modelo é mostrada na Tabela 11.

Tabela 11 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	8,24874	2,868033	2,88	0,213025	-9,8593	26,3558
(1)Tempo (L)	-6,31606	0,623544	-10,13	0,062646	-10,2530	-2,3792
Tempo (Q)	0,06782	0,013723	4,94	0,127106	-0,0188	0,1545
1L * 2L	0,02841	0,002427	11,70	0,054262	0,0131	0,04373
R ² = 68,02%		R ² ajuste = 52,02%				

Fonte: o autor (2012).

Observa-se que há dois fatores não significativos a 90%. Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância conforme a Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica percentual de celulose no pré-tratamento hidrotérmico

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	916,487	3	305,4957	4,254
Resíduo	430,892	6	71,8153	
Falta de ajuste	427,492	4	106,873	40,760
Erro puro	2,622	1	2,622	
Total	1347,379	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(3,6)} = 3,288$ para 90% tabelado

$F_{(4,1)} = 55,83$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 6 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 4,254, maior que o valor tabelado para $F_{(3,6)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 40,760, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(4,1)}$. O modelo proposto consegue explicar apenas cerca de 68,02 % da variância (R^2).

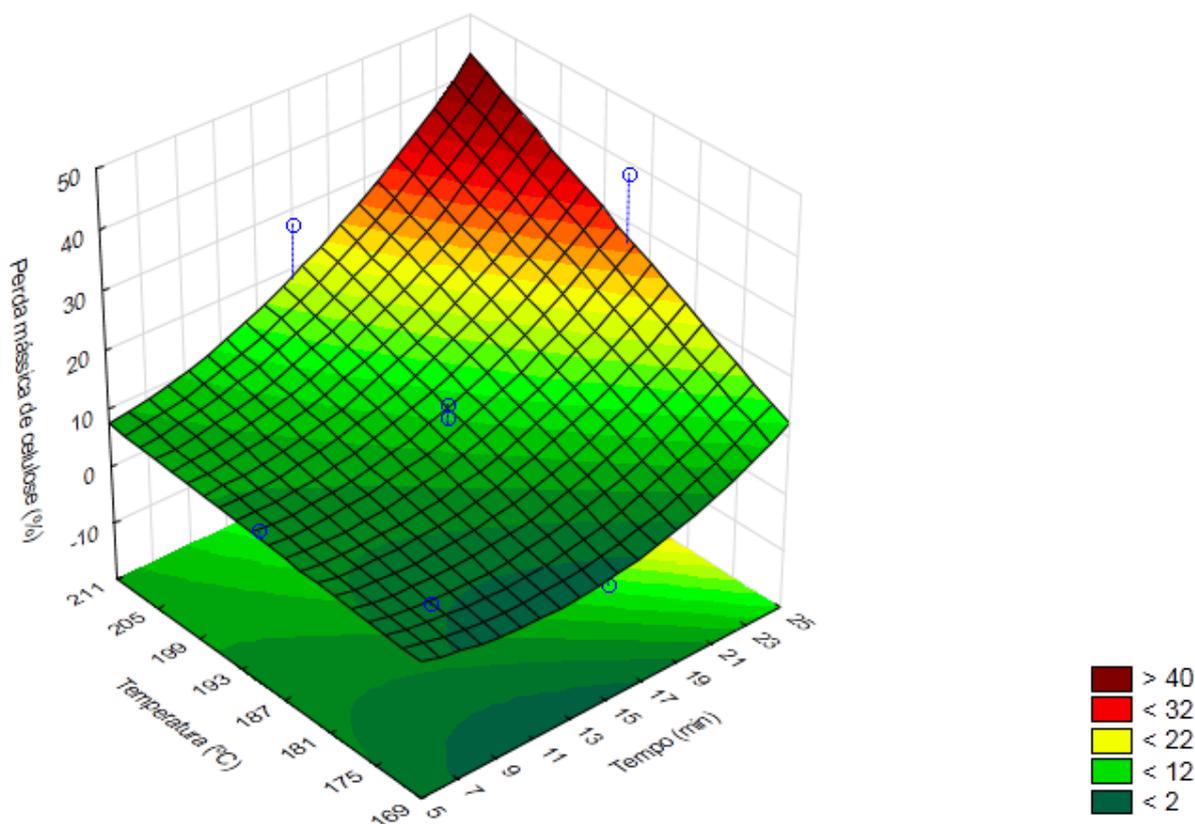
A porcentagem de perda mássica de celulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pode ser descrita através da Equação 26 considerando apenas os fatores significativos.

$$\%PMC = 8,24874 - 6,31606t + 0,06782t^2 + 0,02841T \quad (26)$$

Onde, $\%PMC$ é a porcentagem de perda mássica de celulose no pré-tratamento hidrotérmico, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}C$).

A Figura 36 apresenta a superfície de resposta para a perda mássica percentual de celulose no pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca $105^{\circ}C$) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 36 - Superfície de resposta para a perda mássica de celulose do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 36 que a perda mássica de celulose é sensível tanto ao aumento da temperatura quanto ao aumento de tempo do pré-tratamento, sendo que para altos tempos e temperatura de pré-tratamento se encontram as maiores perda mássicas de celulose.

4.3.3.2.2 Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Hemicelulose no Pré-tratamento Hidrotérmico

Para verificar a relação entre a perda mássica percentual de hemicelulose no pré-tratamento hidrotérmico com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 9.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente pode ser visualizada na Tabela 13.

Tabela 13 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	-84,334	53,6458	5,37000	9,989	0,063515	19,741	87,550
(2)Temperatura (L)	-2,133	53,000	5,39705	9,821	0,064601	18,827	87,079
1L* 2L	-0,101	-21,175	7,59432	-2,78	0,219224	-69,124	26,774
Tempo (Q)	-0,114	-11,178	6,98123	-1,60	0,355400	-55,256	32,899
Temperatura (Q)	0,014	6,410	7,22723	0,886	0,538126	-39,221	52,040
(1)Tempo (L)	-22,810	3,215	5,34281	0,602	0,666169	-30,518	36,948
R ² = 87,11%		R ² ajuste = 70,99%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando-se a Tabela 13 percebe-se que apenas o fator média e o fator linear da variável temperatura são estatisticamente significativos para uma confiança de 90%, também se observa que os fatores linear da variável tempo e o fator quadrático da variável temperatura são pouco significantes.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão, e obteve-se como resultado os valores de 76,25% para R² e 73,28% para R² ajuste, com significância de 90% para os dois fatores, analisando-se o modelo com a supressão do fator linear da variável tempo e do fator quadrático da variável temperatura percebeu-se um melhor ajuste, suprimindo apenas o fator quadrático da variável temperatura, embora com variáveis com menor significância, para este realizou-se a análise de regressão (Tabela 14), a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores.

Tabela 14 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	-601,006	109,4160	-5,49	0,114644	-129,830	89,820
(1) Tempo (L)	23,622	7,147	3,31	0,187048	-21,500	68,792
(2)Temperatura (L)	3,279	0,5715	5,74	0,109846	-0,330	6,887
Tempo (Q)	-0,141	0,0644	-2,19	0,27372	-0,550	0,265
1L * 2L	-0,101	0,0362	-2,79	0,219224	-0,330	0,1275
R ² = 86,48		R ² ajuste = 76,68%				

Fonte: o autor (2012).

Observa-se que não há fatores significativos a 90%, sendo utilizado, portanto, o modelo completo para a representação da superfície. Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância conforme a Tabela 15.

Tabela 15 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica de hemicelulose no pré-tratamento hidrotérmico

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	6354,504	5	1270,9008	5,406
Resíduo	940,300	4	235,0751	
Falta de ajuste	882,701	3	294,234	5,102
Erro puro	57,674	1	57,674	
Total	7294,804	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(5,4)} = 4,05$ para 90% tabelado

$F_{(3,1)} = 53,59$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 15 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 5,406, maior que o valor tabelado para $F_{(5,4)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 5,102, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(3,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 87,11% da variância (R^2).

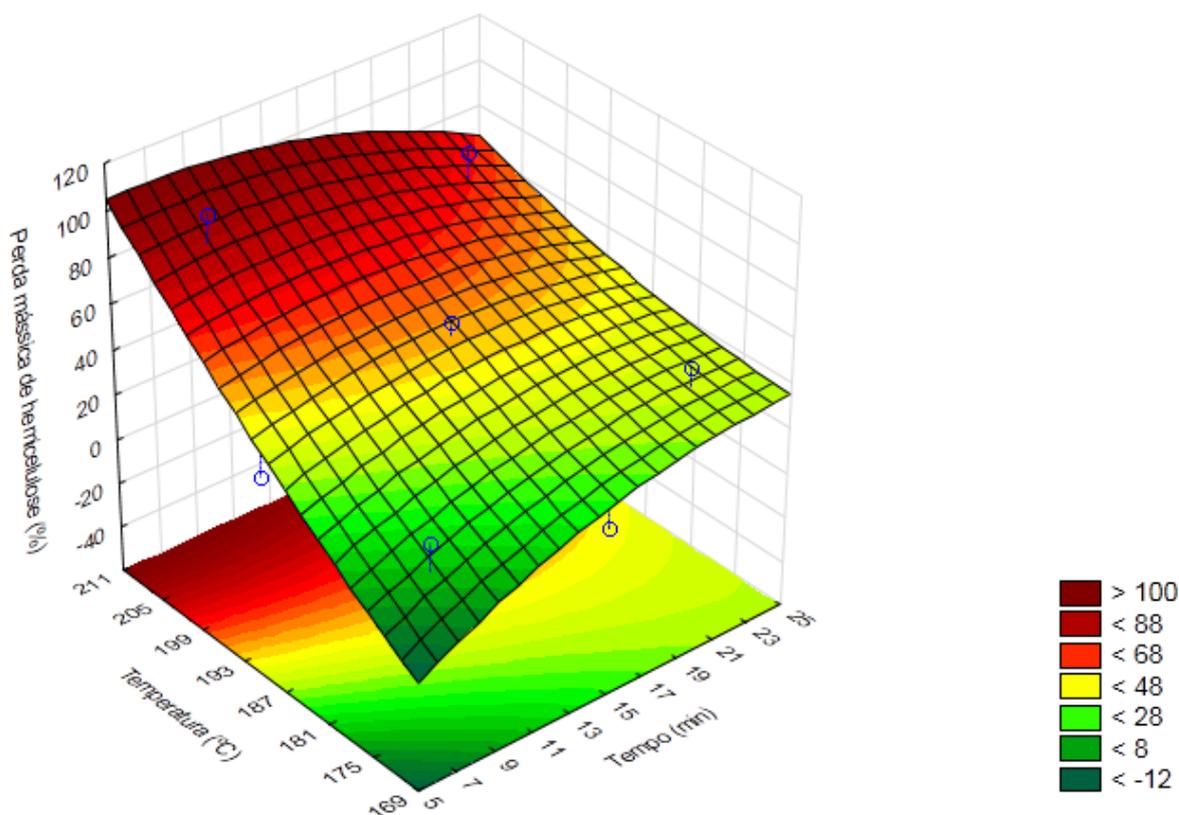
A porcentagem de perda mássica de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pode ser descrita através da Equação 27 considerando todos os fatores.

$$\%PMH = -84,3341 + 22,8099t - 2,1333T - 0,1141t^2 - 0,1008tT + 0,0142T^2 \quad (27)$$

Onde, $\%PMH$ é a porcentagem de perda mássica de hemicelulose no pré-tratamento hidrotérmico, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}C$).

A Figura 37 apresenta a superfície de resposta para a perda mássica percentual de celulose no pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca $105^{\circ}C$) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 37 - Superfície de resposta para a perda mássica percentual de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 36 que a perda mássica de hemicelulose aumenta com o aumento da temperatura mais significativamente do que com o tempo de pré-tratamento.

4.3.3.2.3 Superfície de Resposta para Perda Mássica Percentual de Lignina no Pré-tratamento Hidrotérmico

Para verificar a relação entre a perda mássica percentual de lignina no pré-tratamento hidrotérmico com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 9.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a perda de mássica percentual de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente pode ser visualizada na Tabela 16.

Tabela 16 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de perda mássica percentual de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	-1140,78	60,8204	0,880000	69,11	0,009211	55,264	66,376
(1)Tempo (L)	2,73	2,1477	0,875544	2,453	0,246431	-3,380	7,675
Tempo (Q)	-0,03	-3,1821	1,144037	-2,78	0,219718	-10,41	4,041
(2)Temperatura (L)	12,44	7,1480	0,884433	8,08	0,078372	1,564	12,732
Temperatura (Q)	-0,03	-14,2943	1,184350	-12,1	0,052627	-21,772	-6,817
1L* 2L	-0,01	-1,7750	1,244508	-1,43	0,38983	-9,632	6,082
R ² = 77,72%		R ² ajuste = 49,88%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando-se a Tabela 16 percebe-se que o fator de interação dos fatores lineares da variável tempo e temperatura e os fatores linear e quadrático da variável tempo não se mostram estatisticamente significativos para uma confiança de 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão (Tabela 17), somente com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão para o modelo de perda mássica percentual de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	-1019,75	85,60290	-11,91	0,053316	-1560,22	-479,274
(2)Temperatura (L)	11,12	0,90408	12,30	0,051660	5,41	16,825
Temperatura (Q)	-0,03	0,00238	-12,04	0,052759	-0,04	-0,014
R ² = 72,29%		R ² ajuste = 64,37%				

Fonte: o autor (2012).

Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância conforme a Tabela 18.

Tabela 18 - Análise de variância da superfície de resposta para perda mássica percentual de lignina no pré-tratamento hidrotérmico

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	325,628	2	162,8140	9,131
Resíduo	124,819	7	17,8313	
Falta de ajuste	113,9343	5	22,7869	14,7126
Erro puro	1,5488	1	1,5488	
Total	450,4468	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(2,7)} = 3,26$ para 90% tabelado

$F_{(5,1)} = 57,24$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 18 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 9,131, maior que o valor tabelado para $F_{(2,7)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 14,7126, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(5,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 72,29% da variância (R^2).

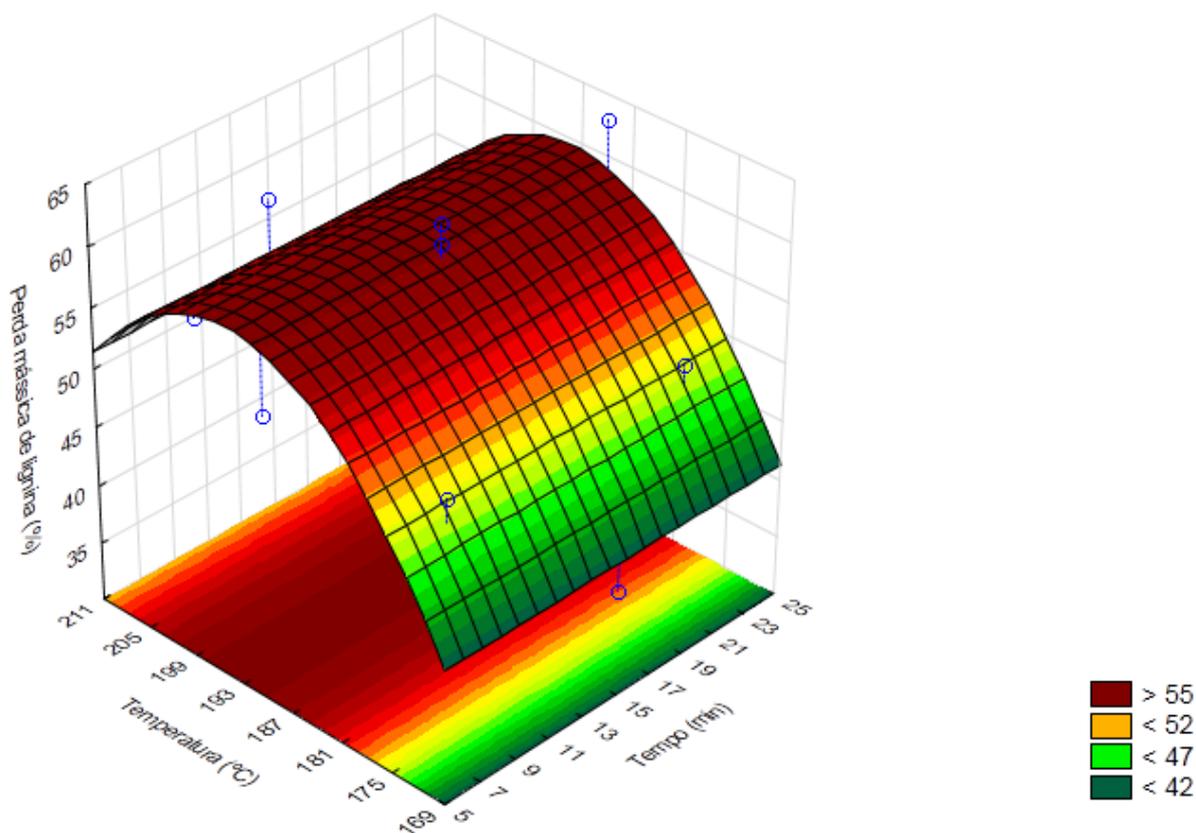
A porcentagem de perda mássica de lignina do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pode ser descrita através da Equação 28 considerando apenas os fatores significantes.

$$\%PML = -1019,75 + 11,12T - 0,03T^2 \quad (28)$$

Onde, $\%PML$ é a porcentagem de perda mássica de lignina no pré-tratamento hidrotérmico, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}C$).

A Figura 38 apresenta a superfície de resposta para a perda mássica percentual de lignina no pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca $105^{\circ}C$) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 38 - Superfície de resposta para a perda mássica de lignina do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 38 que a perda mássica de lignina é sensível a temperatura e possui uma faixa de máxima perda percentual em função da temperatura, decaindo após esta com o aumento da temperatura, os fatores linear e quadrático da variável tempo não possuem grande influência sobre o comportamento da perda de lignina no pré-tratamento hidrotérmico.

4.3.4 Componentes Presentes na Fase Líquida Resultante do Pré-tratamento Hidrotérmico das Amostras de Bagaço de Cana-de-açúcar

Do pré-tratamento hidrotérmico das amostras de bagaço de cana-de-açúcar obteve-se a quantidade em volume de aproximadamente 250 mL de líquido (hidrolisado) para cada pré-tratamento, estas amostras foram analisadas por CLAE, principalmente para identificação de açúcares e inibidores da atividade enzimática e microbiológica.

Foram identificados de 18 a 22 picos (sinais) nos cromatogramas, sendo que destes foram analisados apenas os principais componentes (Tabela 19).

Tabela 19 - Tempo de retenção (min) para os compostos analisados, obtido por CLAE com utilização de padrões, na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

N	Tempo de retenção (min)	Compostos monitorados (Analitos)
1	7,487	Celobiose
2	9,142	Glicose
3	9,81	Xilose
4	28,55	5-HMF
5	42,485	Furfural

Fonte: o autor (2012).

Nota: Os tempos de retenção (min) podem variar ligeiramente de uma amostra, analisada, para outra.

Os cromatogramas resultantes da análise por CLAE estão ilustrados no Apêndice A, com a identificação dos principais sinais, componentes analisados. Os sinais obtidos foram convertidos para concentração em g/L do referente composto a partir de soluções contendo os analitos alvos (padrões), componentes em análise, os resultados em concentração foram organizado na Tabela 20.

Tabela 20 - Concentrações de componentes, analisadas por HPLC, presentes na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico das amostras de bagaço de cana-de-açúcar

Exper.	t (min)	T (°C)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ácido acético (g/L)	5-HMF (g/L)	Furfural (g/L)
1	15	190	1,497	2,870	0,184	0,443	0,060	0,240
2	15	190	1,389	2,667	0,068	0,596	0,160	0,346
3	22	205	1,961	2,627	0,359	1,845	0,830	2,002
4	8	175	1,939	3,450	0,218	0,289	0,014	0,067
5	22	175	1,497	2,870	0,184	0,443	0,060	0,240
6	8	205	2,142	3,831	0,068	0,741	0,249	0,357
7	5	190	2,186	3,942	0,243	0,339	0,036	0,090
8	25	190	1,020	1,613	0,167	1,207	0,311	1,040
9	15	169	1,606	2,875	0,185	0,298	0,018	0,079
10	15	211	2,037	2,868	0,413	1,957	0,902	1,909

Fonte: o autor (2012).

Nota: Pré-tratamentos realizados com água deionizada com pH medido em aproximadamente 6,5

Avaliando os componentes presentes na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 20), verifica-se que os pré-tratamentos com maior temperatura apresentaram maiores concentrações de furanos e ácido acético, pré-tratamento 3 (Experimento3), por 22 min a 205°C, apresentou concentração de 1,845 g/L de ácido acético, 0,830 g/L de 5-HMF e 2,002 g/L de furfural e o pré-tratamento 10 (Experimento 10) apresentou concentração de 1,957 g/L de ácido acético, 0,902 g/L de 5-HMF e 1,909 g/L de furfural, indicando que os açúcares foram degradados em maior quantidade, durante o processo de pré-tratamento hidrotérmico, observa-se também que estes mesmos pré-tratamentos possuem ainda significativas concentrações de açúcares.

Observa-se também que com o aumento da temperatura do pré-tratamento ocorre um aumento da concentração de celobiose na fase líquida, indicando maior perda mássica de celulose da fase sólida (biomassa), impactando sobre o rendimento em açúcares na hidrólise da biomassa pré-tratada, e devido à presença em grandes concentrações de furanos a recuperação ou fermentação destes açúcares da fase líquida torna-se mais onerosa, e até mesmo inviável.

Os pré-tratamentos que apresentaram maior concentração em glicose e xilose são os pré-tratamentos 6, por 8min a 205°C, apresentando 2,142 g/L de glicose e 3,831 g/L de xilose e 7, por 5 min a 190°C, apresentando 2,186 g/L de glicose e 3,942 g/L de xilose, destaca-se não somente estas concentrações, mas a baixa presença de produtos da degradação, como furanos, sendo o pré-tratamento 6 apresentando 0,249 g/L de 5-HMF e 0,357 g/L de furfural e o pré-tratamento 7 apresentando apenas 0,036 g/L de 5-HMF e 0,090 g/L de furfural, sendo estes açúcares passíveis de recuperação ou fermentação.

Do total das concentrações dos compostos analisados para os pré-tratamentos hidrotérmicos observa-se que as condições extremas de tempo (Experimento 3) e as condições extremas de temperatura (Experimento 10), provocam a degradação das estruturas e dos açúcares presentes na constituição do bagaço de cana-de-açúcar, conseqüentemente se obtém as maiores perdas globais em açúcares fermentescíveis.

4.3.4.1 Superfície de Resposta para concentração de Glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Para verificar a relação entre a concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 20.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 21.

Tabela 21 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	40,43051	1,4429	0,054000	26,72	0,023813	1,1022	1,7839
(1)Tempo (L)	-0,23155	-0,5664	0,053727	-10,5	0,060207	-0,9056	-0,227
Temperatura (Q)	0,00106	0,47485	0,072676	6,53	0,096684	0,0160	0,9337
(2)Temperatura (L)	-0,39961	0,32081	0,054272	5,91	0,106689	-0,0218	0,6635
Tempo (Q)	0,00243	0,23855	0,070202	3,99	0,182206	-0,2047	0,6818
1L* 2L	0,00062	0,13050	0,076368	1,71	0,337065	-0,3517	0,6126
R ² = 85,32%	R ² ajuste = 66,98%						

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 21 percebe-se que o fator de interação dos fatores lineares das variáveis tempo e temperatura, o fator quadrático da variável tempo e o fator linear da variável temperatura não se mostram estatisticamente significativos para uma confiança de 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão, somente com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores, obtendo-se como resultando um ajuste de 52,92 % (R² ajuste) e 63,81% da variância explicada (R²). Observa-se pela Tabela 21 que o fator de interação dos fatores lineares das variáveis tempo e temperatura é menos significativo, repetindo-se o método de análise de coeficiente

de regressão (Tabela 22), removendo apenas este fator, a fim de se obter o modelo mais adequado para a superfície de resposta.

Tabela 22 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	P	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	38,65943	5,870007	6,586	0,095931	1,5976	75,7212
(2) Temperatura (L)	-0,39029	0,061398	-6,357	0,099334	-0,7779	-0,0026
(1)Tempo (L)	-0,11348	0,021830	-5,198	0,120988	-0,25131	0,0243
Tempo (Q)	0,00243	0,000716	3,398	0,182206	-0,00209	0,0070
Temperatura (Q)	0,00106	0,000162	6,534	0,096684	-0,00004	0,0021
R ² = 84,07%		R ² ajuste = 71,25%				

Fonte: o autor (2012).

Observa-se pela Tabela 22 que desconsiderando apenas o fator de interação dos fatores lineares da variável tempo e temperatura, o modelo proposto se ajustou melhor que o modelo apenas com as variáveis anteriormente tidas como significativas a 90%, e melhor que o modelo com todos os fatores, porém com dois termos não significativos a 90%. Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância, para o modelo proposto, conforme a Tabela 23.

Tabela 23 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	0,951	4	0,2378	6,597
Resíduo	0,180	5	0,0360	
Falta de ajuste	0,203941	4	0,050985	8,742
Erro puro	0,005832	1	0,005832	
Total	1,131328	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(4,5)} = 3,52$ para 90% tabelado

$F_{(4,1)} = 55,83$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 23 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 6,597 maior que o valor tabelado para $F_{(4,5)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 8,742, sendo este menor

que o valor tabelado $F_{(4,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 84,07% da variância (R^2).

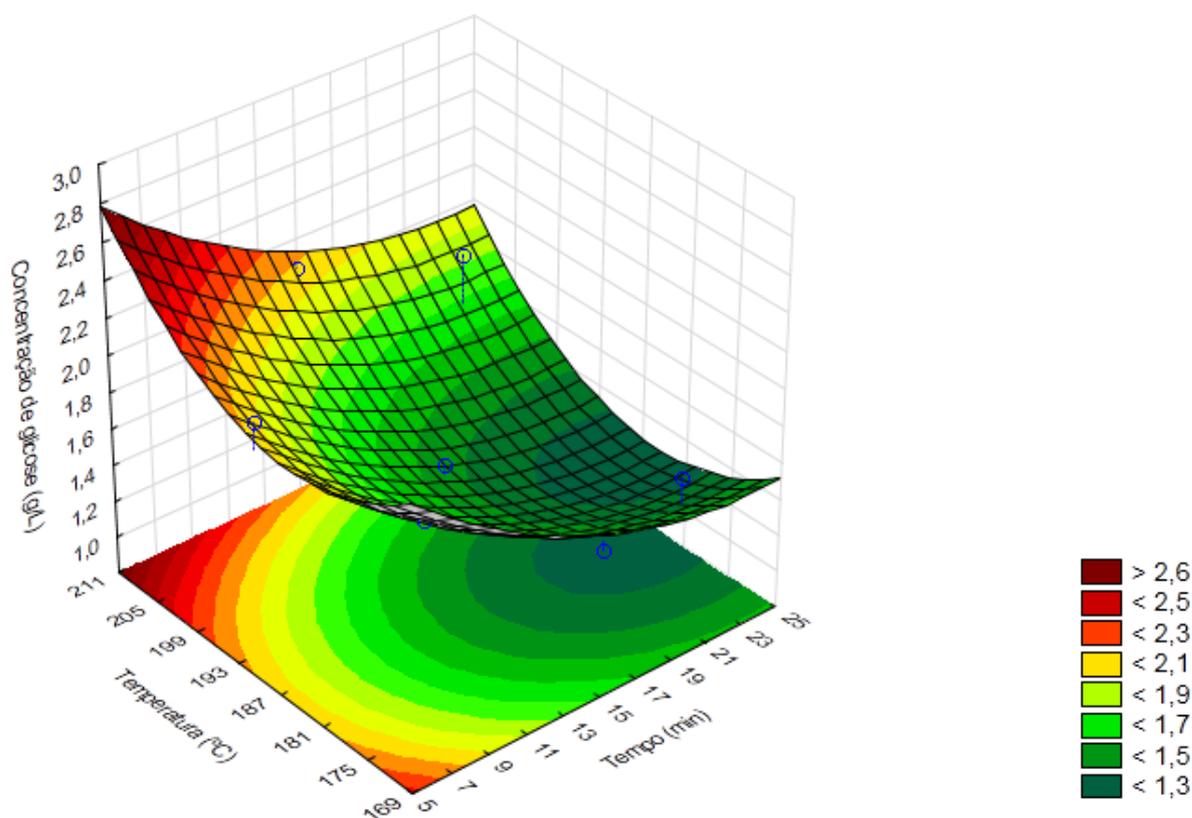
A concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser descrita através da Equação 29, que desconsidera apenas o fator de interação dos fatores lineares da variável tempo e temperatura.

$$CGL = 38,69543 - 0,11348t - 0,39029T + 0,00243t^2 + 0,00106T^2 \quad (29)$$

Onde, CGL é a concentração de glicose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}\text{C}$).

A Figura 39 apresenta a superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca 105°C) de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 39 - Superfície de resposta para a concentração de glicose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 39 que a concentração de glicose decai com o aumento do tempo de pré-tratamento e possui um leve aumento com a temperatura de pré-tratamento, efeito explicado pela degradação dos açúcares. Para maiores temperaturas e menores tempos ocorre um aumento da concentração, porém em tempos menores percebe-se a menor concentração de glicose, explica-se devido à concentração de glicose ser muito maior em temperaturas maiores mesmo havendo maior degradação desta.

4.3.4.2 Superfície de Resposta para concentração de Xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Para verificar a relação entre a concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 20.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 24.

Tabela 24 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	23,95576	2,76842	0,101500	27,27	0,023330	2,1276	3,4093
(1)Tempo (L)	0,13499	-1,26488	0,100986	-12,5	0,050719	-1,9025	-0,627
Tempo (Q)	0,00190	0,18603	0,131954	1,401	0,392757	-0,6471	1,0192
(2)Temperatura (L)	-0,22763	0,03237	0,102011	0,317	0,804366	-0,6117	0,6764
Temperatura (Q)	0,00066	0,29723	0,136604	2,174	0,274258	-0,5653	1,1597
1L* 2L	-0,00149	-0,31200	0,143543	-2,17	0,274510	-1,2183	0,5942
R ² = 85,75%		R ² ajuste = 67,94%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 24 percebe-se que o fator de interação dos fatores lineares das variáveis tempo e temperatura, o fator quadrático da variável tempo e os fatores linear e quadrático da variável temperatura não se mostram estatisticamente significativos para uma confiança de 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão, somente com estes fatores, e observou-se que não houve grandes alterações, obtendo-se um ajuste de 80,74 % (R² ajuste) e 75,24% da variância explicada (R²). Segundo dados da Tabela 24 o fator linear da variável temperatura e o fator quadrático da variável tempo são menos significativos, portanto repetiu-se o método de análise de coeficiente de regressão (Tabela 25), removendo estes fatores, a fim de se obter o resultado mais adequado para a equação de superfície de resposta.

Tabela 25 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	P	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	1,925669	1,032469	1,865	0,014761	-4,5931	8,4442
(1)Tempo (L)	0,211091	0,129450	1,631	0,050709	-0,6062	1,0284
1L * 2L	-0,01587	0,000680	-2,332	0,257870	-0,0059	0,0027
Temperatura (Q)	0,000066	0,000028	2,331	0,258015	-0,0001	0,0002
R ² = 84,68%		R ² ajuste = 77,01%				

Fonte: o autor (2012).

Observa-se pela Tabela 25 que o ajuste foi melhor que o ajuste considerando somente os fatores antes tidos como significativamente a 90% e, comparando-se com os resultados da Tabela 24, tiveram um ajuste melhor que o modelo completo (todos os fatores), embora alguns dos fatores não estejam significativamente a 90%, há uma melhora na significância destes. Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância, para o modelo proposto, conforme a Tabela 26.

Tabela 26 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	3,392	3	1,1308	11,055
Resíduo	0,614	6	0,1023	
Falta de ajuste	0,593305	5	0,118661	5,759
Erro puro	0,020605	1	0,020605	
Total	4,006084	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(3,6)} = 2,289$ para 90% tabelado

$F_{(5,1)} = 57,24$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 26 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 11,055, maior que o valor tabelado para $F_{(3,6)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 5,759, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(5,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 84,68% da variância (R^2).

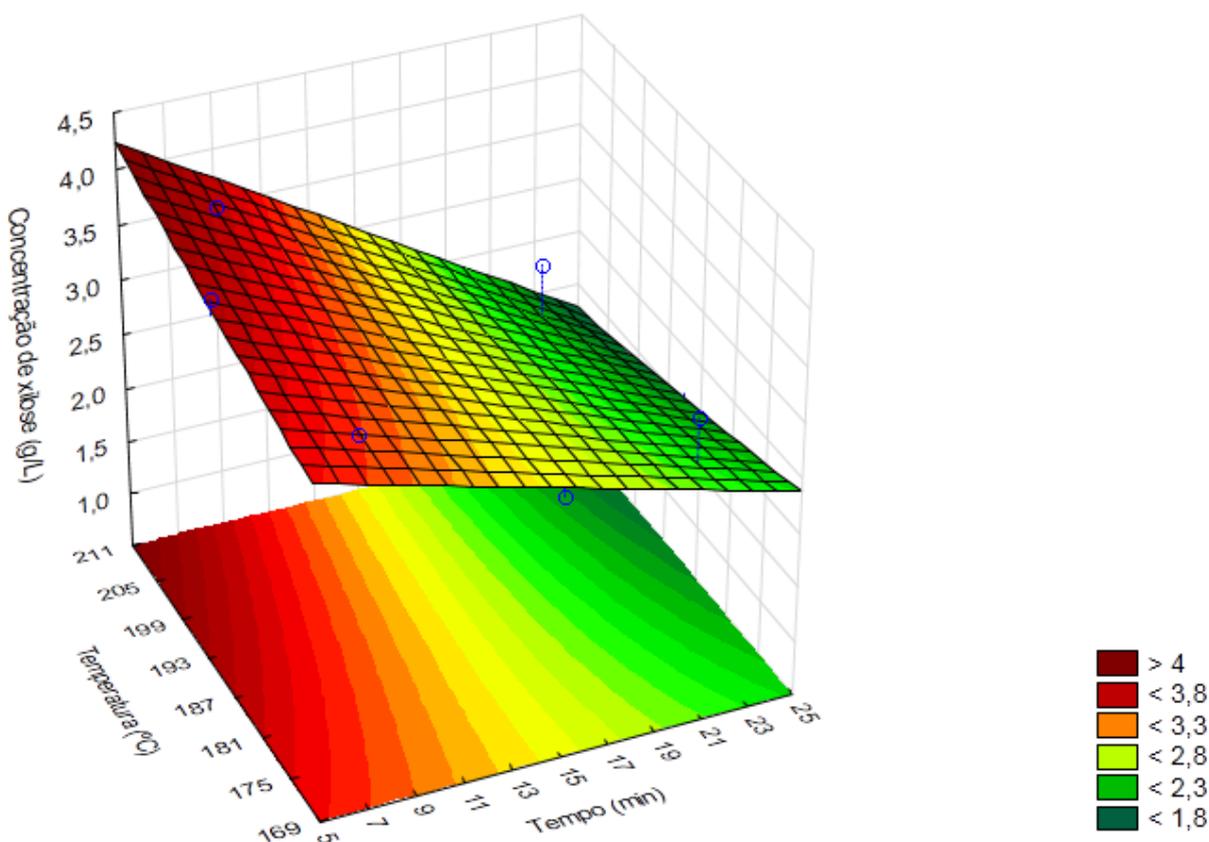
A concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar pode ser descrita através da Equação 30.

$$CXL = 1,925669 + 0,211091t - 0,001587tT - 0,000066T^2 \quad (30)$$

Onde, CXL é a concentração de xilose na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}\text{C}$).

A Figura 40 apresenta a superfície de resposta para a concentração de xilose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca 105°C) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 40 - Superfície de resposta para a concentração de xilose (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Observar-se analisando a Figura 40 que a concentração de xilose decai com o aumento do tempo de pré-tratamento e possui um leve aumento com o aumento da temperatura de pré-tratamento.

4.3.4.3 Superfície de Resposta para concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico

Para verificar a relação entre a concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 20.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 27.

Tabela 27 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	27,32937	0,56631	0,050252	11,27	0,056343	0,249	0,883
(1)Tempo (L)	-0,28000	0,34077	0,067293	5,06	0,124115	-0,084	0,766
Tempo (Q)	-0,23842	0,26750	0,070711	3,78	0,164520	-0,179	0,714
(2)Temperatura (L)	0,00127	0,25239	0,049747	5,07	0,123892	-0,062	0,566
Temperatura (Q)	0,00076	0,11000	0,050000	2,20	0,271586	-0,205	0,426
1L* 2L	0,00048	0,04713	0,065002	0,72	0,600595	-0,363	0,458
R ² = 97,74%	R ² ajuste = 94,91%						

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 27 percebe-se que apenas o fator média se mostra estatisticamente significativo para uma confiança de 90%.

Como não há fatores, além da média, significantes a 90% realizaram-se regressões, e observou-se que não houve grandes alterações nos resultando, o fator de interação dos fatores lineares das variáveis tempo e temperatura é o menos significativos, portanto suprimiu-se este fator do modelo e repetiu-se o método de análise de coeficiente de regressão (Tabela 28).

Tabela 28 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	P	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	25,57078	4,957855	4,16	0,121920	-5,7319	56,8734
(2) Temperatura (L)	-0,27034	0,051616	-5,23	0,120106	-0,5962	0,0555
(1)Tempo (L)	-0,22400	0,064075	-3,49	0,177371	-0,6286	0,1806
1L * 2L	-0,00127	0,000337	3,78	0,164520	-0,0008	0,0034
Temperatura (Q)	0,00071	0,000135	5,26	0,119580	-0,0001	0,0016
R ² = 97,48%		R ² ajuste = 95,45%				

Fonte: o autor (2012).

Observa-se pela Tabela 28 que o ajuste foi melhor que o ajuste considerando somente o fator antes tido como significativamente a 90% e, comparando-se com os resultados da Tabela 27, tiveram um ajuste melhor que o modelo completo (todos os fatores), embora não estejam significativamente a 90%, obtiveram uma melhora na significância dos fatores, com exceção da média. Para analisar a predição do modelo foi realizada a análise de variância, para o modelo proposto, conforme a Tabela 29.

Tabela 29 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	0,974	4	0,2434	48,353
Resíduo	0,025	5	0,0050	
Falta de ajuste	0,020226	4	0,005057	1,0113
Erro puro	0,005000	1	0,020605	
Total	0,998882	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(4,5)} = 3,52$ para 90% tabelado

$F_{(4,1)} = 55,83$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 29 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo, pois o valor calculado para o teste F é de 48,353 maior que o valor tabelado para $F_{(4,5)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 1,0113, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(4,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 97,48% da variância (R²).

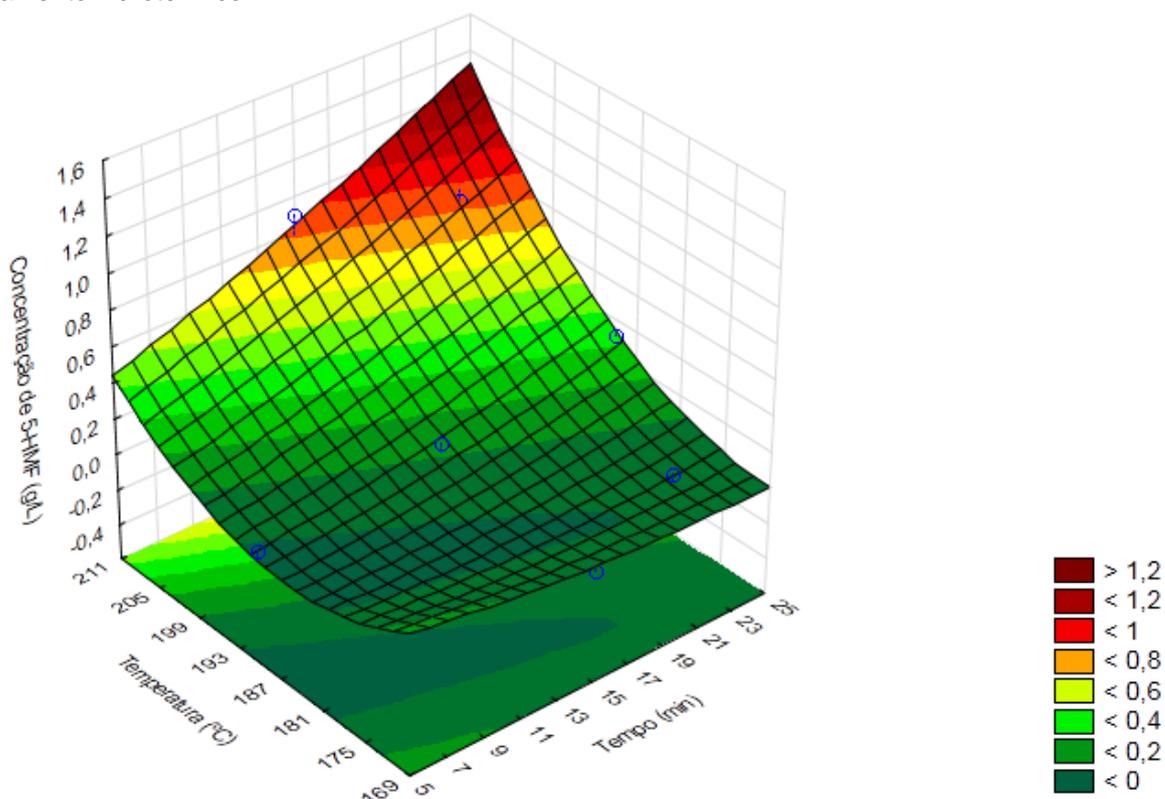
A concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar pode ser descrita através da Equação 31.

$$CHMFL = 25,57078 - 0,22400t - 0,27034T + 0,00127tT + 0,00071T^2 \quad (31)$$

Onde, $CHMFL$ é a concentração de 5-HMF na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}\text{C}$).

A Figura 41 apresenta a superfície de resposta para a concentração de 5-HMF (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca 105°C) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 41 - Superfície de resposta para a concentração de 5-HMF (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Observa-se analisando a Figura 41 que a concentração de 5-HMF aumenta com o tempo de pré-tratamento apenas para temperatura elevadas de pré-tratamento, para tempos abaixo de 10 min e temperaturas menores que 190°C não aparenta possuir significativas concentrações de 5-HMF.

4.3.4.4 Superfície de Resposta para concentração de Furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico

Para verificar a relação entre a concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os dados da Tabela 20.

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para a concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 30.

Tabela 30 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratado hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
(2)Temperatura (L)	-0,56614	1,16515	0,053267	21,87	0,029084	0,8288	1,5015
(1)Tempo (L)	-0,67412	0,78578	0,052732	14,90	0,042659	0,4528	1,1187
1L* 2L	0,00350	0,73600	0,074953	9,81	0,064610	0,2627	1,2092
Temperatura (Q)	0,00145	0,65417	0,071330	9,17	0,069143	0,2038	1,1045
Média	55,02183	0,29302	0,053000	5,53	0,113915	-0,042	0,6276
Tempo (Q)	0,00214	0,21017	0,068902	3,05	0,201682	-0,225	0,6452
R ² = 97,98%		R ² ajuste = 95,45%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando-se a Tabela 30 percebe-se que apenas o fator média e o fator quadrático da variável tempo não se mostram estatisticamente significativos para uma confiança de 90%, e, além disto, observou-se que na análise de coeficiente de regressão, o fator média se mostrou significativa com $p = 0,067438$.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão (Tabela 31), com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores.

Tabela 31 - Coeficientes de regressão para o modelo de concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	47,18034	5,255326	8,98	0,070621	13,9995	80,3612
(1)Tempo (L)	-0,60978	0,067919	-8,98	0,070618	-1,0386	-0,1809
(2)Temperatura (L)	-0,48740	0,054713	-8,91	0,071166	-0,8328	-0,1419
1L * 2L	0,00350	0,000357	9,82	0,064640	0,0012	0,0058
Temperatura (Q)	0,00125	0,000143	8,70	0,072825	0,0003	0,0215
R ² = 96,94%		R ² ajuste = 94,50%				

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 31 observa-se que suprimindo o fator linear da variável tempo, o ajuste diminui pouco, portanto podem-se utilizar os dois modelos, embora se busque o melhor ajuste e predição. Para analisar a predição do modelo proposto foi realizada a análise de variância conforme a Tabela 32.

Tabela 32 - Análise de variância da superfície de resposta para concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	4,904	4	1,2260	40,004
Resíduo	0,153	5	0,0306	
Falta de ajuste	0,149030	4	0,037257	6,632
Erro puro	0,005618	1	0,005618	
Total	5,057390	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(4,5)} = 3,52$ para 90% tabelado

$F_{(4,1)} = 55,83$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 32 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 40,004, maior que o valor tabelado para $F_{(4,5)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 6,632, sendo este menor

que o valor tabelado $F_{(4,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 96,94 % da variância (R^2).

A concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar pode ser descrita através da Equação 32 para o modelo completo (todos os fatores) ou pela Equação 33 (sem o fator quadrático da variável tempo).

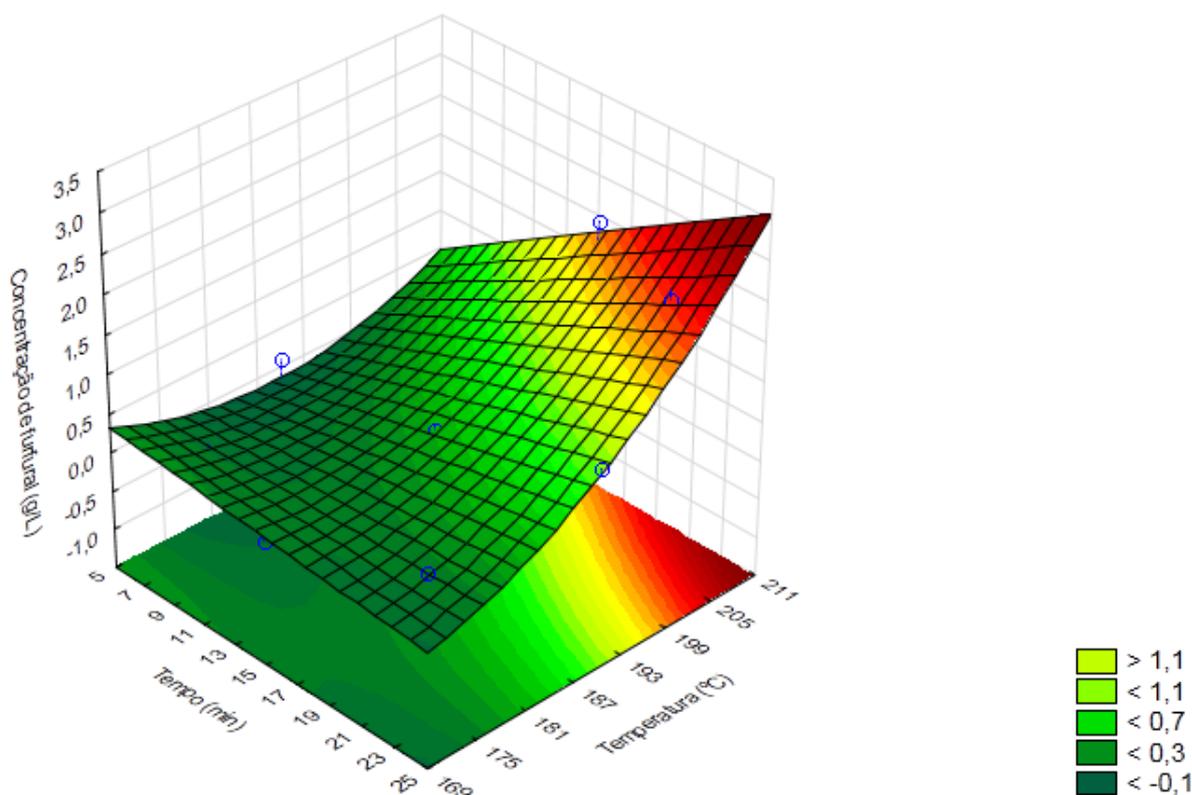
$$CFL = 55,02183 - 0,67412t - 0,56614T + 0,0035tT + 0,00214t^2 + 0,00145T^2 \quad (32)$$

$$CFL = 47,18034 - 0,60978t - 0,48740T + 0,00350tT + 0,00125T^2 \quad (33)$$

Onde, CFL é a concentração de furfural na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico.

A Figura 42 apresenta a superfície de resposta para a concentração de furfural (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico (porcentagem em base seca 105°C) do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 42 - Superfície de resposta para a concentração de furfural (g/L) na fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 42 que a concentração de 5-HMF aumenta com o tempo de pré-tratamento apenas para temperatura elevadas de pré-tratamento e aumenta com o aumento da temperatura de pré-tratamento, para tempos abaixo de 10 min e temperaturas menores que 190°C não aparenta possuir significativas concentrações de 5-HMF.

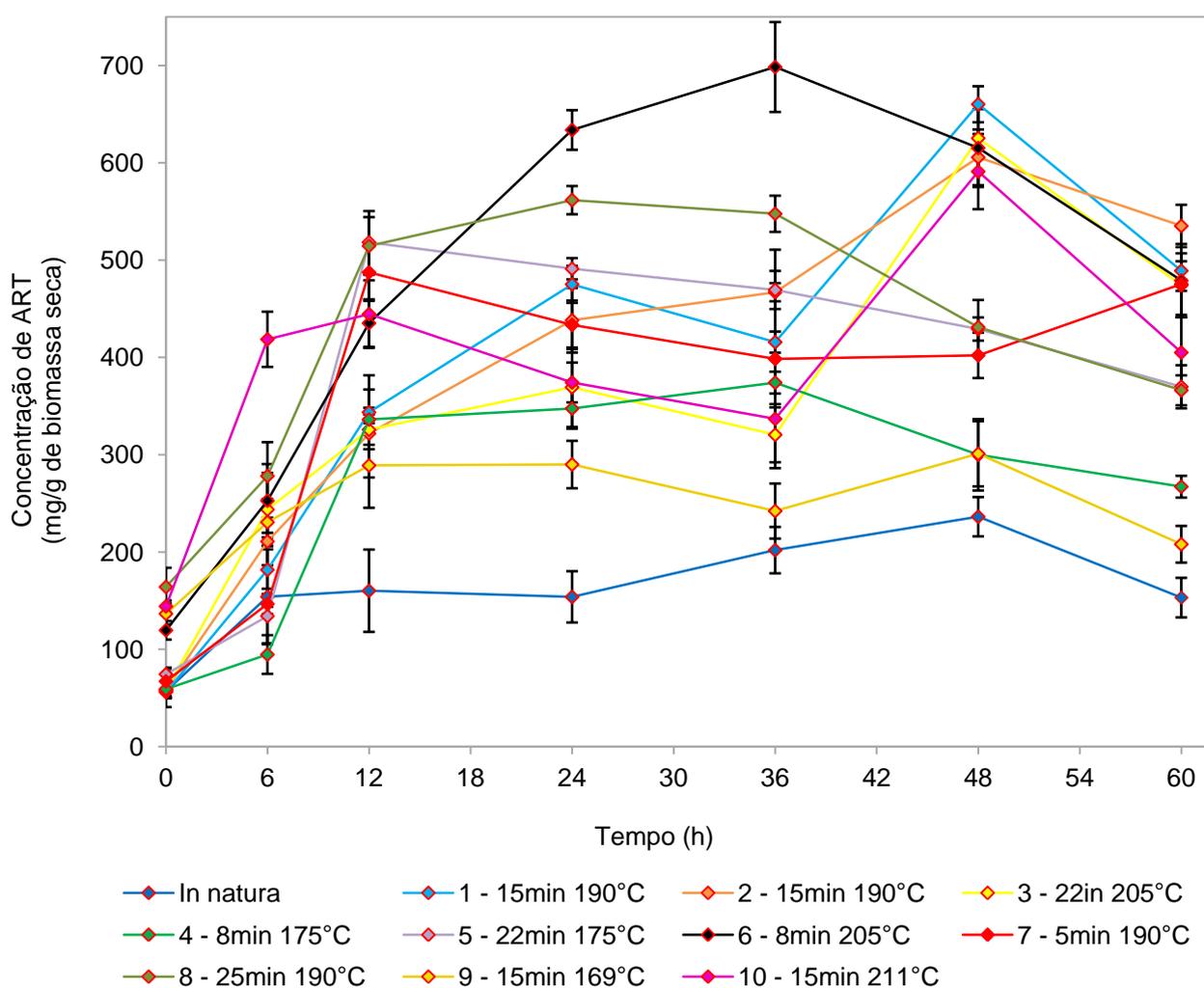
4.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após o pré-tratamento hidrotérmico segundo as condições descritas na Tabela 2, para os dez experimentos propostos, foi realizada a hidrólise enzimática das frações sólidas (biomassa) resultantes destes pré-tratamentos, e juntamente foi realizada a hidrólise enzimática de uma amostra sem pré-tratamento (*in natura*). Realizaram-se as hidrólises de 1,000 g em base seca de cada amostra, e os resultados foram obtidos pelas análises de ARTs liberados e de glicose.

4.4.1 Concentração de ARTs no Hidrolisado Enzimático

Os resultados obtidos para concentrações de ARTs liberados por grama de biomassa seca hidrolisada estão ilustrados na Figura 43, a qual apresenta o “perfil da hidrólise” para as hidrólises das amostras de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e pré-tratadas hidrotérmicamente.

Figura 43 - Perfil de ART liberados por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Analisando a Figura 43 é possível afirmar que o pré-tratamento hidrotérmico melhorou o rendimento da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pelas enzimas produzidas pelo microrganismo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1,

evidenciando assim a importância da etapa do pré-tratamento na liberação dos açúcares fermentescíveis presentes no bagaço.

Observa-se que as condições de pré-tratamento escolhidas apresentaram uma ampla diferença nos resultados de quantificação de ARTs. Houve condições de pré-tratamentos que auxiliaram na liberação de açúcares fermentescíveis de forma mais significativa e outras condições próximas às quantidades de ARTs liberados pela amostra *in natura*.

Destaca-se o pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C, que apresentou maiores liberações de ARTs na hidrólise enzimática, sendo no tempo de 36h de hidrólise obtido $698,5 \pm 46,2$ mg ARTs/g de biomassa seca hidrolisada, observa-se que este mesmo, obteve altas concentrações no tempo de 12h, com $435,3 \pm 24,4$ mg ARTs/g de biomassa seca hidrolisada, obteve as maiores concentrações no tempo de 24h, com $633,8 \pm 20,4$ mg ARTs/g de biomassa seca hidrolisada e altas concentrações no tempo de 48h de hidrólise, com $615,3 \pm 40,1$ mg ARTs/g biomassa seca hidrolisada.

Observa-se que no período das primeiras 12h de hidrólise houve um rápido acréscimo em ARTs, efeito que advém do pré-tratamento hidrotérmico, pois a estrutura está mais suscetível à ação enzimática e há uma grande quantidade de estruturas aptas a serem hidrolisadas, após este período observa-se que o processo de hidrólise “diminui o ritmo”, e está mais suscetível e dependente da atividade enzimática das diferentes enzimas aplicadas e da inibição destas.

No período de 48h de hidrólise enzimática nota-se que além dos resultados da hidrólise do pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C, outros quatro pré-tratamentos também obtiveram bons resultados, sendo obtidas concentrações para a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar nas condições do pré-tratamento 1 de $660,3 \pm 18,5$ mg ARTs/g biomassa seca hidrolisada, do pré-tratamento 2 de $605,7 \pm 28,6$ mg ARTs/g biomassa seca hidrolisada, do pré-tratamento 3 de $625,3 \pm 34,5$ mg ARTs/g biomassa seca hidrolisada e do pré-tratamento 10 de $591,1 \pm 38,6$ mg ARTs/g biomassa seca hidrolisada.

Com a finalidade de melhor visualizar as diferenças obtidas com a aplicação do pré-tratamento hidrotérmico realizou-se o cálculo do ganho percentual em ARTs (Tabela 33), comparando-se o resultado em concentração de ARTs obtido na hidrólise das amostras pré-tratadas hidrotérmicamente com os resultados obtidos na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento (*in natura*), hidrólise de controle.

Tabela 33 - Ganho percentual em ARTs para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente em diferentes condições.

Exper.	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ganho (%) por tempo de hidrólise enzimática						
			0h	6h	12h	24h	36h	48h	60h
1	15	190	- 1,6	18,0	114,5	208,7	105,9	179,4	219,4
2	15	190	3,0	37,0	100,9	184,7	131,3	156,3	249,5
3	22	205	1,8	58,3	103,3	140,0	58,7	164,6	209,6
4	8	175	3,8	- 38,5	109,8	125,8	85,3	26,9	74,5
5	22	175	30,7	- 12,9	223,5	219,2	132,4	81,6	141,5
6	8	205	110,0	64,2	171,7	311,8	245,9	160,4	212,8
7	5	190	17,9	- 4,8	204,2	181,7	97,4	70,2	210,5
8	25	190	188,4	80,6	221,2	265,0	171,2	82,4	139,2
9	15	169	139,9	49,8	80,4	88,4	19,9	27,4	35,8
10	15	211	153,3	171,9	177,5	143,2	66,8	150,1	164,5

Fonte: o autor (2012).

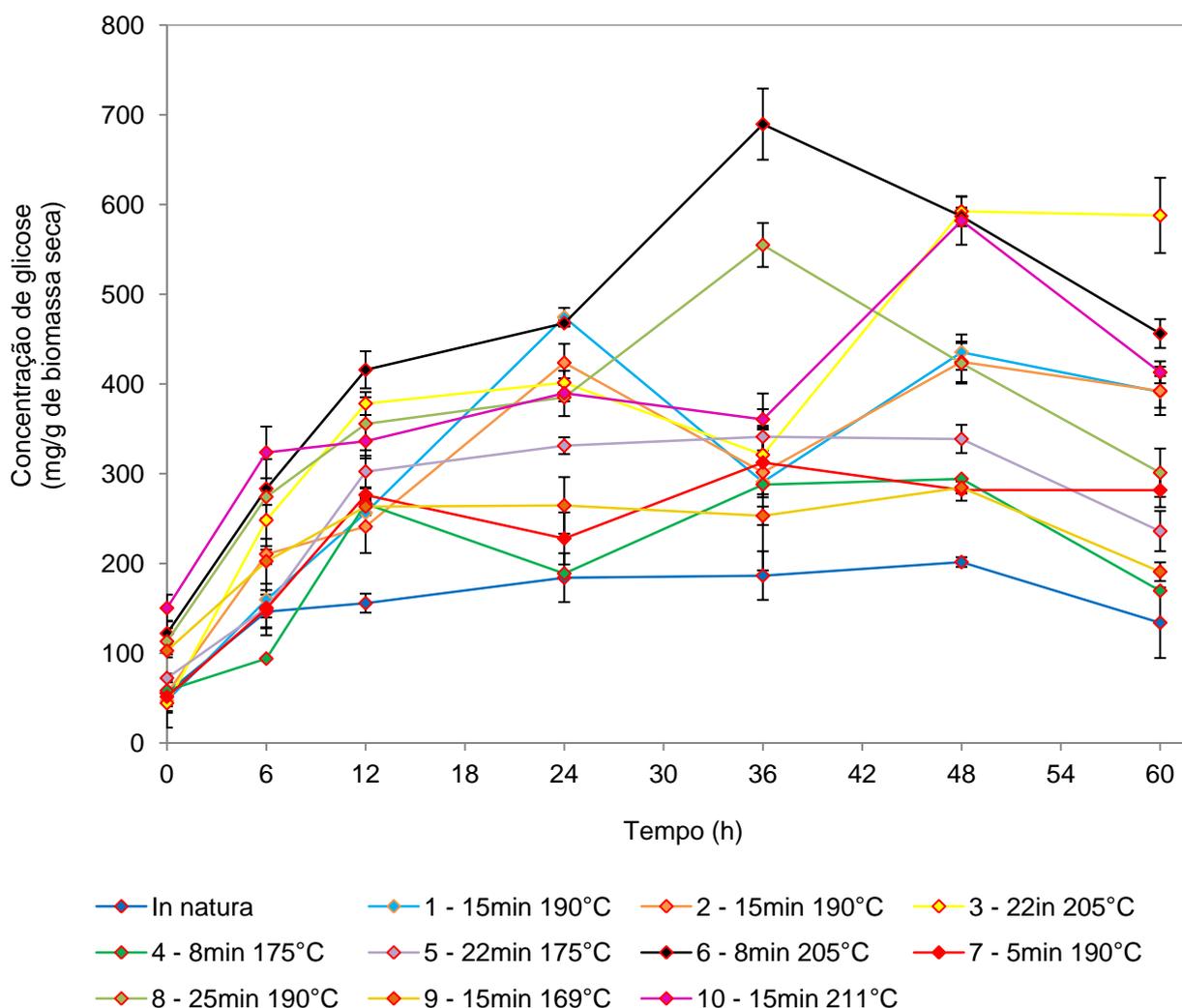
Observa-se que inicialmente já se obteve ganhos significativos para as amostras pré-tratadas em maiores temperaturas ou tempos, como é o caso da amostra 8 pré-tratada por 25 min a 190°C, este ganho inicial é resultado do pré-tratamento que hidrolisou uma certa quantidade de celulose e hemicelulose que permaneceram adsorvidos na estrutura, e não foram retirados na fase líquida resultante do pré-tratamento, observa-se uma variação nas primeiras 6h, resultante de uma soma de fatores, pré-tratamento, atividade enzimática, presença de inibidores, e outros.

Observa-se que o maior ganho em relação ao bagaço de cana-de-açúcar não pré-tratado foi para a amostra hidrolisada 6 com 311,8% em 24h de hidrólise, em 36h, onde se obteve a maior concentração em ARTs, o ganho desta amostra foi de 245,9%. Os menores ganhos são observados nas amostras hidrolisadas 4 com apenas 125,8% em 24h de hidrólise e na amostra 9 com apenas 88,4% em 24h de hidrólise.

4.4.2 Concentração de Glicose no Hidrolisado Enzimático

Os resultados obtidos para concentrações de glicose liberadas por grama de biomassa seca hidrolisada estão ilustrados na Figura 44, para as hidrólises das amostras de bagaço de cana-de-açúcar, *in natura* e pré-tratadas hidrotérmicamente.

Figura 44 - Perfil de glicose liberada (mg/g de biomassa seca) por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Analisando a Figura 44 é possível afirmar que na quantificação dos açúcares presentes no hidrolisado enzimático das amostras pré-tratadas hidrotérmicamente há predominância de glicose, hexose, os valores obtidos para glicose no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pelas enzimas produzidas pelo microrganismo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1, evidenciam que o pré-tratamento é eficiente na remoção de hemicelulose, fonte de pentoses, para algumas condições de pré-tratamento, mesmo esta sendo fonte de açúcares fermentescíveis, os melhores rendimentos em ARTs são para as amostras que apresentaram maior perda de hemicelulose no pré-tratamento hidrotérmico e consequentemente apresentaram maiores rendimentos em glicose.

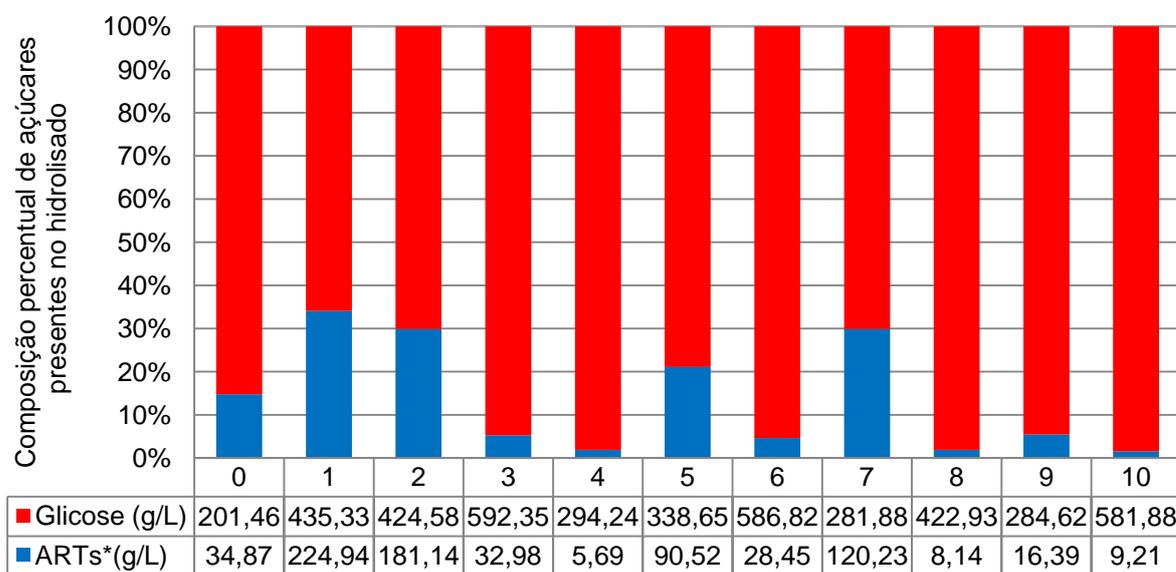
Observa-se que as condições de pré-tratamento escolhidas apresentaram uma ampla diferença nos resultados, com comportamento semelhante à quantificação de ARTs. Houve condições de pré-tratamentos em que se obtiveram quantidades de glicose próximas as concentrações de ARTs para a amostra e alguns pontos obteve-se nesta análise valores maiores que as concentrações de ARTs obtidas, principalmente para os tempos abaixo de 12h de hidrólise, indicando que há desvios nas medições, porém estes desvios na maioria dos pontos se encontram dentro dos desvios mensurados para as concentrações de ARTs e de glicose.

Destaca-se o pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C, que apresentou maiores liberações de ARTs na hidrólise enzimática, e a maioria destes açúcares é de glicose, no tempo de 36h de hidrólise obteve-se 689,4±39,7 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada, observa-se que este mesmo, obteve as maiores concentrações no tempo de 24h, com 467,7±3,8 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada, juntamente com a hidrólise da amostra 1 pré-tratada hidrotérmicamente por 15 min a 190°C que resultou em 473,4±10,3 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada.

No período de 48h de hidrólise enzimática nota-se que três resultados com bons rendimentos em glicose, sendo a hidrólise do bagaço pré-tratado 6, por 8 min a 205°C, apresentando 586,8±9,7 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada, a hidrólise do bagaço pré-tratado 3, por 22 min a 205°C, apresentando 592,3±16,6 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada e a hidrólise do bagaço pré-tratado 10, por 15 min a 211°C, apresentando 412,9±12,2 mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada.

Para melhor visualizar a composição do hidrolisado quanto à presença de ARTs e a quantidade destes que é glicose, ilustrou-se os dados das hidrólises de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados e da hidrólise do bagaço *in natura*, na Figura 45.

Figura 45 - Composição do hidrolisado das amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratadas, em diferentes condições de tempo e temperatura, para 48h de hidrólise enzimática.



Amostras de bagaço de cana-de-açúcar (Hidrólise)

Fonte: o autor (2012).

* Considera-se ARTs todos os açúcares presentes com exceção da glicose para esta representação.

Analisando a Figura 45 e comparando-se com os resultados obtidos nas caracterizações químicas das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, Tabela 9, observa-se que as amostras que tiveram as maiores perdas de hemicelulose são as que possuem as maiores porcentagem de glicose presente, obteve-se para o pré-tratamento 3, por 22 min a 205°, uma perda de 80,06% da hemicelulose, para o pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C uma perda de 99,49% da hemicelulose.

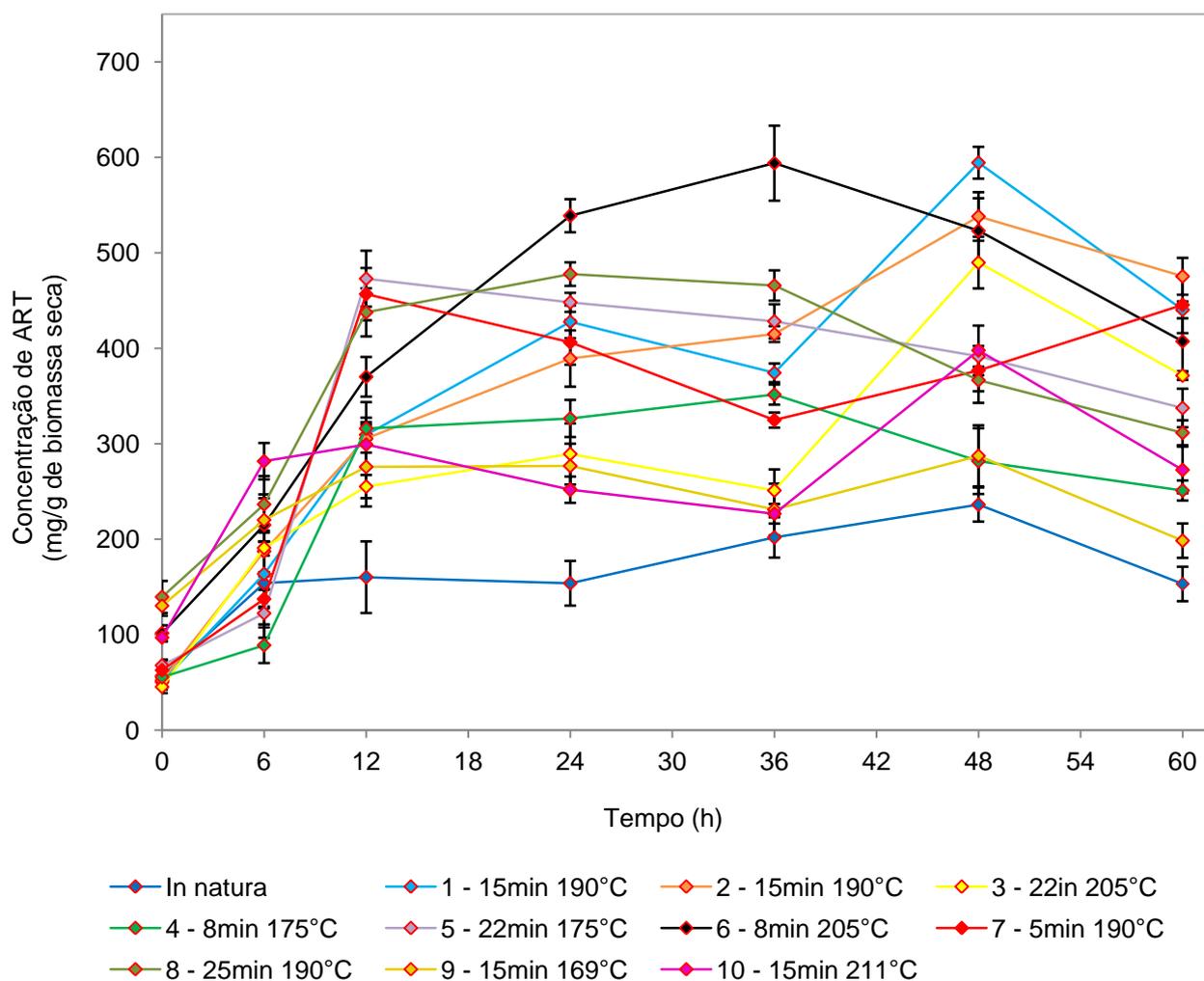
Observa-se que o pré-tratamento 4, por 8 min a 175°, tem a maior partes dos ARTs como sendo glicose, embora tenha sido removido apenas 21,97% da Hemicelulose, este efeito se da pelo fato do pré-tratamento sobre esta amostra não ter sido eficiente para 48h de hidrólise, conforme a Figura 43, provavelmente a estrutura hemicelular não tenha sofrido grandes alterações, ou houve inibição da atividade enzimática das hemicelulases, este mesmo efeito pode ser observado no hidrolisado da amostra pré-tratada 9, por 15 min a 169°C, da qual foi removido apenas 14,66% da hemicelulose. Comparando-se com a composição do hidrolisado da amostra de bagaço de cana-de-açúcar *in natura* observa-se que esta possui menos glicose na composição, podendo assim deduzir que o pré-tratamento 4 (Experimento 4) e 9 (Experimento 9) removeram apenas a fração de hemicelulose

mais suscetível ou fragilizada, deixando apenas a estrutura hemicelular mais fortemente ligada a matriz lignocelulósica.

4.4.3 Rendimento Global do Processo em Concentrações de ARTs

Anteriormente mencionaram-se apenas resultados para os rendimentos referentes à hidrólise propriamente dita, porém para o rendimento global do processo deve-se levar em conta a perda mássica resultante do pré-tratamento hidrotérmico (Tabela 4), reduzindo assim o rendimento de ARTs por massa de bagaço bruto (matéria seca a 105°C), quantidade antes do pré-tratamento, foi realizada uma correção na curva de “perfil da hidrólise” (Figura 46).

Figura 46 - Perfil de ART liberados (mg/g de biomassa seca bruta) por tempo de hidrólise enzimática para diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico



Fonte: o autor (2012).

Analisando a Figura 46, observa-se que os resultados em concentração de ARTs a partir das 12h de hidrólise enzimática ainda são superiores ao resultado obtido com a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, demonstrando que o pré-tratamento hidrotérmico é eficiente, porém para algumas condições não seja viável economicamente devido ao baixo rendimento e baixo ganho percentual em açúcares em relação à hidrólise do bagaço *in natura*.

Destaca-se ainda o pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C, que apresentou maiores rendimentos em ARTs, no tempo de 36h de hidrólise, obteve-se 594,0±39,3 mg ARTs/g de biomassa seca bruta, observa-se que este mesmo obteve as maiores concentrações no tempo de 24h, com 538,9±17,3 mg ARTs/g de biomassa seca bruta.

No período de 48h de hidrólise enzimática nota-se que os rendimentos em ARTs levando-se em conta as perdas mássicas do pré-tratamento hidrotérmico para as hidrólises das amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratadas nas condições 1 e 2 (duplicata), por 15 min a 190°C, obtiveram rendimentos elevados, sendo para o pré-tratamento 1 obtido 594,4±16,7 mg ARTs/g de biomassa seca bruta, e para o pré-tratamento 2 obtido 538,1±25,4 mg ARTs/g de biomassa seca bruta.

Observa-se que o rendimento em ARTs para o pré-tratamento 10, por 15 min a 211°C, em 48h de hidrólise foi reduzido de 591,1±38,6 mg ARTs/g de biomassa seca hidrolisada para 397,8±26,0 mg ARTs/g de biomassa seca bruta, reduzido para 67,3% do rendimento em ARTs obtido na hidrólise enzimática.

4.4.4 Superfície de Resposta para Concentração de ARTs no Hidrolisado de Bagaço de Cana-de-açúcar Pré-tratada Hidrotérmicamente após 48h de Hidrólise Enzimática

Para verificar a relação entre a concentração de ARTs presentes no hidrolisado após 48h de hidrólise enzimática, com celulasas e hemicelulasas, com o tempo e a temperatura do pré-tratamento realizaram-se análises estatísticas utilizando os rendimentos em ARTs globais (Figura 46).

A análise dos principais fatores e de interação das variáveis para o rendimento global em ARTs obtidos com o pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 34.

Tabela 34 - Estimativa de efeitos para os principais fatores e de interação das variáveis para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente regressão	Efeito	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
						-90%	+90%
Média	-17184,9	556,262	28,16500	20,11	0,031638	388,43	744,09
Temperatura (Q)	-0,400	-194,546	37,90593	-5,13	0,122506	-433,87	44,78
Tempo (Q)	-1,600	-159,548	36,61569	-4,36	0,143615	-390,73	71,63
(2)Temperatura (L)	173,600	124,815	28,30689	4,41	0,141978	-53,91	303,54
1L* 2L	-0,300	-71,550	39,83132	-1,80	0,323382	-323,03	179,93
(1)Tempo (L)	114,7	15,309	28,02239	0,55	0,681676	-161,62	192,24
R ² = 85,25%		R ² ajuste = 66,81%					

Fonte: o autor (2012).

Analisando a Tabela 34 percebe-se que apenas o fator média é estatisticamente significativo para uma confiança de 90%.

Identificados os fatores significativos, foi realizada a análise de coeficiente de regressão, com estes fatores, a fim de determinar a equação da superfície de resposta e a significância destes fatores, obtiveram-se ajustes menores que o do modelo completo, portanto realizou-se a análise de coeficiente de regressão (Tabela 35), com todos os fatores, embora não significativos a 90%.

Tabela 35 - Coeficientes de regressão para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(1)	p	Limite de Confiança	
					-90%	+90%
Média	-17184,9	3108,999	-5,52	0,113941	-36814,4	2444,519
Temperatura (Q)	-0,400	32,149	5,40	0,116606	-29,4	376,539
Tempo (Q)	-1,600	37,794	3,03	0,202684	-124,0	353,291
(2)Temperatura (L)	173,600	0,374	-4,36	0,143615	-4,0	0,731
1L* 2L	-0,300	0,084	-5,13	0,122506	-1	0,100
(1)Tempo (L)	114,7	0,190	-1,80	0,323382	-1,5	0,857
R ² = 85,25%		R ² ajuste = 66,81%				

Fonte: o autor (2012).

Para analisar a predição do modelo proposto foi realizada a análise de variância conforme a Tabela 36.

Tabela 36 - Análise de variância da superfície de resposta para o modelo de rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente

Causa de Variação	SQ	g.l	MQ	Teste F
Regressão	87279,803	5	17455,9605	4,624
Resíduo	15101,198	4	3775,2994	
Falta de ajuste	13516,6	3	4505,52	2,84
Erro puro	1586,5	1	1586,53	
Total	102381	9		

Fonte: o autor (2012).

$F_{(5,4)} = 4,05$ para 90% tabelado

$F_{(3,1)} = 53,59$ para 90% tabelado

De acordo com a análise de variância da Tabela 36 observa-se que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança, pois o valor calculado para o teste F é de 4,624, maior que o valor tabelado para $F_{(5,4)}$. O modelo não apresenta falta de ajuste, pois o valor calculado para o teste F é de 2,84, sendo este menor que o valor tabelado $F_{(3,1)}$. O modelo proposto consegue explicar cerca de 85,25% da variância (R^2).

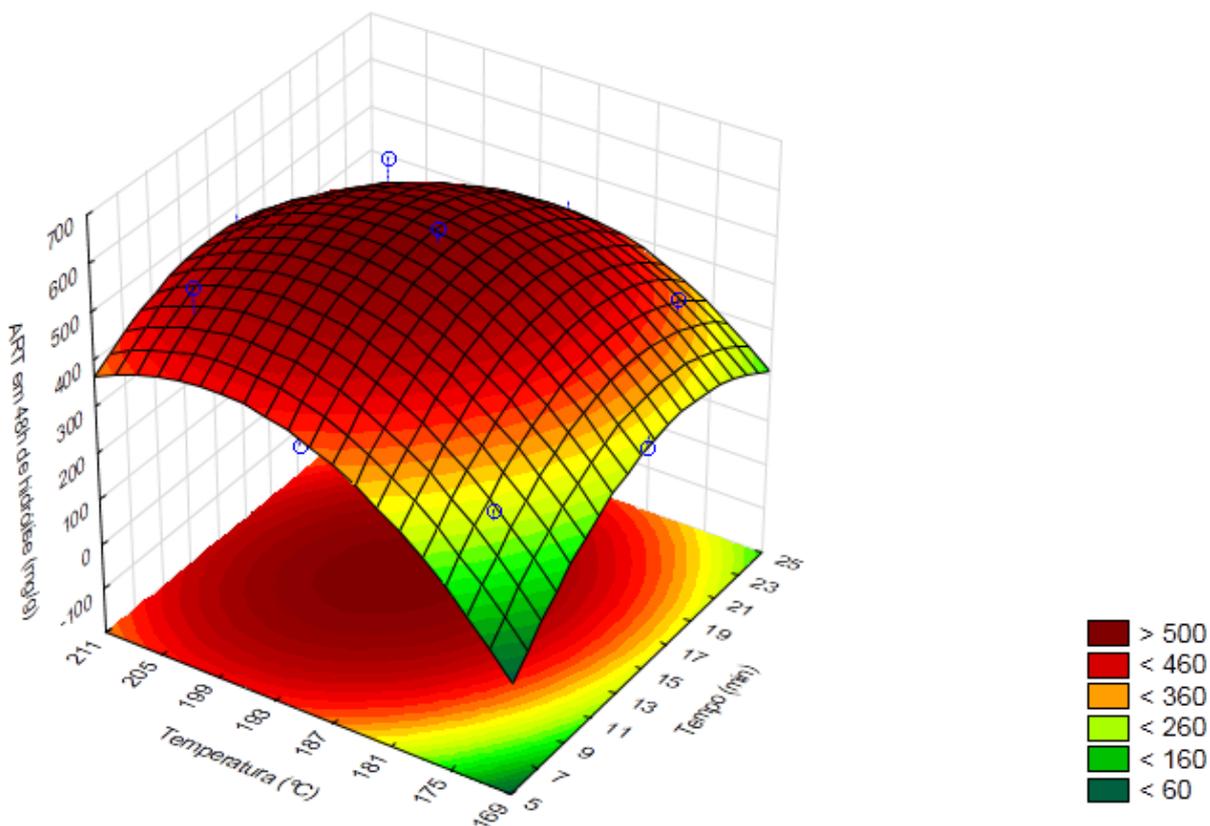
O rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente pode ser descrito através da Equação 34 considerando todos os fatores.

$$ARTs = -17184,9 + 114,7t + 173,6T - 1,6t^2 - 0,3tT - 0,04T^2 \quad (34)$$

Onde, $ARTs$ (g ARTs/g de biomassa seca bruta.) é o rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente, t é o tempo de pré-tratamento hidrotérmico (min) e T é a temperatura de pré-tratamento hidrotérmico ($^{\circ}C$).

A Figura 47 apresenta a superfície de resposta para o rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.

Figura 47 - Superfície de resposta para o rendimento global em ARTs obtido em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente em função do tempo e temperatura do pré-tratamento hidrotérmico.



Fonte: o autor (2012).

Pode-se observar analisando a Figura 47 que o rendimento global em ARTs obtidos em 48h de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente encontra seu valor máximo um pouco deslocado da região central do planejamento experimental CCDR, em tempos menores que 15 min e temperaturas maiores que 190°C, não é possível analisar somente estes dados para obtenção de parâmetros de pré-tratamento, as superfícies se modificam para outros tempos de hidrólise enzimática.

5 CONCLUSÕES

O efeito do pré-tratamento hidrotérmico utilizando vapor saturado, sem descompressão explosiva, na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado, através de planejamento CCDR para MSR, em relação às variáveis tempo (min) e temperatura (T) do pré-tratamento hidrotérmico, com desempenho medido pela liberação de ARTs e glicose.

As amostras pré-tratadas tiveram perdas mássicas variando de 6,04% para as condições mais brandas de pré-tratamento e atingindo 32,70% para condições mais severas de pré-tratamento.

A quantificação dos compostos químicos presentes nas amostras de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotérmicamente, realizada pelo método de Van Soest, não se mostraram confiáveis e conclui-se que este método não é o mais adequado para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente, pois os reagentes para determinação de FDN e FDA removeram quantidades significativas de fibras, provavelmente devido aos efeitos do pré-tratamento de fragmentação e fragilização das estruturas, deixando-as suscetíveis a estes reagentes.

Porém é possível observar que o pré-tratamento foi efetivo na remoção de hemicelulose e que a remoção de lignina é limitada a uma faixa de $54,96 \pm 7,88\%$ do total de lignina presente no bagaço *in natura*.

A caracterização morfológica das estruturas do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente mostrou uma grande variedade de efeitos para as condições de pré-tratamento avaliadas, sendo possível observar que para determinadas condições de pré-tratamento hidrotérmico há a ocorrência de efeitos distintos sobre as diferentes partes que constituem a cana-de-açúcar, e conseqüentemente o bagaço analisado.

A fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico, hidrolisado, avaliada quanto a sua composição por HPLC, apresentou de 18 a 22 componentes, sendo avaliados apenas os açúcares e inibidores principais. Observou-se através deste que os açúcares degradaram em temperaturas mais elevadas e em tempos mais elevados de pré-tratamento gerando principalmente furanos, já a concentração de celobiose se relaciona ao aumento de temperatura e a perda mássica de fibras no pré-tratamento hidrotérmico, sendo estes fortes inibidores enzimáticos.

As enzimas produzidas pelo micro-organismo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1, com carga de 15 FPU/g biomassa seca, obtiveram bons resultados na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente para determinadas condições de pré-tratamento, da análise de ARTs observou-se que todas as condições de pré-tratamento obtiveram ganhos em ARTs em relação ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. A hidrólise do bagaço *in natura* teve rendimento máximo de $236,3 \pm 20,2$ mg/g de biomassa hidrolisada em 48h de hidrólise.

Destacou-se o pré-tratamentos 6, por 8min a 205°C , com rendimentos em ARTs em 36h de hidrólise de $698,5 \pm 46,2$ mg ARTs/g de biomassa seca hidrolisada, sendo $594,0 \pm 39,3$ mg glicose/g de biomassa seca hidrolisada, com ganhos em 36h de hidrólise de 245,9% de ARTs e ganhos em 24h de hidrólise de 311,8% de ARTs em relação às amostras de bagaço *in natura* hidrolisadas nos mesmos tempos.

Levando em conta as perdas mássicas do pré-tratamento hidrotérmico nos rendimentos em ARTs e glicose, rendimento global do processo, o pré-tratamento 6, por 8 min a 205°C , com perda mássica de 14,97% no pré-tratamento apresentou rendimento global em ARTs, para 36h de hidrólise de $594,0 \pm 39,3$ mg ARTs/g de biomassa seca bruta, e para 24h de hidrólise de $538,9 \pm 17,3$ mg ARTs/g de biomassa seca bruta. Porém os pré-tratamentos 1, com perda mássica de 9,97% e o pré-tratamento 2, com perda mássica de 11,16% (duplicata ponto central do CCDR), realizados por 15 min a 190°C , tiveram perda de mássica menor em relação ao pré-tratamento 6, e no período de 48h de hidrólise enzimática obtiveram rendimentos globais elevados, sendo para o pré-tratamento 1 de $594,4 \pm 16,7$ mg ARTs/g de biomassa seca bruta, e para o pré-tratamento 2 de $538,1 \pm 25,4$ mg ARTs/g de biomassa seca bruta.

Devido à perda mássica de 32,7 % no pré-tratamento 10, por 15 min a 211°C , que demonstrou ser promissor na hidrólise enzimática, o rendimento global em ARTs foi reduzindo significativamente, inviabilizando o processo de pré-tratamento hidrotérmico sob estas condições.

O pré-tratamento hidrotérmico com vapor saturado, sem descompressão explosiva mostrou-se promissor para tornar o substrato bagaço de cana-de-açúcar suscetível à digestão enzimática, de celulasas e hemicelulasas produzidas pelo micro-organismo *Penicillium echinulatum* linhagem 9A02S1, com altos rendimentos em curto período de hidrólise (24h à 36h). Porém, a eficiência do pré-tratamento

depende, principalmente do tempo de residência da biomassa no reator e relativamente da temperatura deste, sendo a adequação destes parâmetros juntamente com a viabilidade e atratividade econômica um desafio.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVAY, Ricardo (Org.). **Biocombustíveis**: A energia da controvérsia. São Paulo: Senac, 2009. 186 p.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.

BARP, L. B.; DILLON, A. J. P.; PAESI-TORESAN, S. Isolation of cellulase - producing mutants from *Penicillium* sp. strains denominated 3MUV3424. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão preto, v. 15, n.3, p. 491-498, 1992.

BIOENZIMA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA. (BR/PE); FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL (BR/RS). Aldo José Pinheiro Dillon; Alexandra Amorim Salgueiro; Carlos Fernandes das Chagas; Henrique Macedo Baudel; José Augusto Travassos Rios Tomé; Marli Camassola. **Processo de obtenção de enzimas hidrolíticas, processo hidrolítico para a produção de açúcares fermentescíveis, aditivos compreendendo açúcares fermentescíveis, e processo de produção de etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. BR n. PI0703302-8, jul. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Política Agrícola; Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. **Cadeia produtiva da agroenergia**. Brasília, DF: IICA, MAPA/SPA, 2007. 112 p. (Série Agronegócios – MAPA, v. 3).

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; Secretaria de Produção e Agroenergia. **Balanco Nacional da Cana-de-Açúcar e Agroenergia**. ed. esp. Brasília, DF: MAPA/SPAE, 2007. 139 p.

_____. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Álcool Combustível**. [s.l.], [2011?]. Não paginado. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=999>>. Acesso em: 11 maio 2012.

BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, W.D.; SOUZA, A.P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: CORTEZ, L. A. B. (Org.). **Bioetanol de cana-de-açúcar**: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher, 2010. p. 365-380.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, Londres, v. 28, n. 3, p. 237-259, nov. 2008.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, p 2196-2204, dez. 2007.

_____. Cellulases e xylanases production by *Penicillium echinulatum* grown sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, p. 1889-1900, nov. 2010.

CAMASSOLA, M. et al. Characterization of the cellulase complex of *Penicillium echinulatum*. **Biocatalysis and Biotransformation**, Londres, v. 22, p. 391-396, dez. 2004.

CANILHA, L. et al. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007. **Anais ...** Natal: ABQ-RN, 2007. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-570-713.htm>>. Acesso em: 13 abr. 2012.

CARVALHO, W.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. Topochemistry, Porosity and Chemical Composition Affecting Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 5, p. 53-59, il., color.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana-de-Açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011**. Brasília: Conab, dez. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2012.

_____. **A Geração Termoelétrica com a Queima do Bagaço de Cana-de-Açúcar no Brasil: Análise do Desempenho da Safra 2009-2010, março/2011**. Brasília: Conab, mar. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_05_05_15_45_40_geracao_termo_baixa_res..pdf>. Acesso em: 30 mar. 2012.

CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA. **Cana-de-Açúcar: Avanço científico beneficia o País**. 1. ed. São Paulo: CIB, set. 2009. v. 1. 20 p. (Guia).

DEMIRBAS, A; GUPTA, R. B. **Gasoline, Diesel and Ethanol Biofuels from Grasses and Plants**. New York: Cambridge, 2010. 246 p.

DILLON, A. J. P. et al. Use of 2-deoxyglucose in liquid media for the selection of mutant strains of *Penicillium echinulatum* producing increased cellulase and b-glucosidase activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 70, p. 740-746, mai. 2006.

DOMÍNGUEZ, H.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J. C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **Holz als Roh- und Werkstoff**, Berlin, v. 57, n. 3, p. 191-202, jun. 1999. (versão eletrônica). Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/p9gcq0r3h809edbu/>>. Acesso em: 23 mar. 2012.

FULLER, M. F. (Ed.) et al. Acid-detergent fibre (ADF). In: _____. **The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition**. ed. il. Cambridge: CABI, 2004. p. 4. (CABI séries).

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 3, p. 4775-4800, jul. 2010.

GOLDEMBERG, J. The Role of Biomass in the World's Energy system. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 1, p. 3-14, il., color.

GOLDMAN, G. H. Genetic Improvement of Xylose Utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 10, p. 153-163, il., color.

GUPTA, R.; KIM, T. H.; LEE, Y. Y. Pretreatment of Biomass by Aqueous Ammonia for Bioethanol Production. In: MIELENZ, J. R. (Ed.). **Biofuels: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Humana Press, 2009. cap. 6, p. 78-91. (Série Methods in Molecular Biology, v. 581).

HAYASHI, T.; KAIDA, R. Hemicelluloses as Recalcitrant Components for Saccharification in Wood. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 4, p. 45-52, il., color.

HAMES, B. R. Biomass Compositional Analysis for Energy Applications. In: MIELENZ, J. R. (Ed.). **Biofuels: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Humana Press, 2009. cap. 11, p. 145-167. (Série Methods in Molecular Biology, v. 581).

KAKUTA, S. O RS pode, sim, produzir etanol!. **ZERO HORA**, Porto Alegre, ano 48, n. 16.974, 28 mar. 2012. Artigos, p. 15.

KIM et al. Liquid Hot Water Pretreatment of Cellulosic Biomass. In: MIELENZ, J. R. (Ed.). **Biofuels: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Humana Press, 2009. cap. 7, p. 93-102. (Série Methods in Molecular Biology, v. 581).

KAPLAN, W. D.; SCHEU, C. Introduction to Scanning Electron Microscopy. In: DEHM, G.; HOWE, J. M.; ZWECK, J. (Eds.). **In-situ Electron Microscopy: Applications in Physics, Chemistry and Materials Science**. Weinheim: John Wiley & Sons, 2012. p. 3-37.

LOUREIRO, M. E. et al. Sugarcane Breeding and Selection for more Efficient Biomass Conversion in Cellulosic Ethanol. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 13, p. 199-239, il., color.

LUCCHESI, A. A. Cana-de-açúcar. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (Coord.). **Ecofisiologia de culturas extrativas: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira**. Cosmópolis: Stoller Brasil, 2001. p. 13-45.

MANDAL, A.; CHAKRABARTY, D. Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 86, p.1291-1299, jul. 2011.

MARTINS, L. F. **Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 139 f. Tese (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARTINS, L.F. et al. Comparison between *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 1417-1424, abr. 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, mar. 1959.

MONTGOMERY, D. C. Response Surface Methods and Other Approaches to Process Optimization. In: _____. **Design and analysis of experiments**. 5. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2001. cap. 11, p. 427-500, il., monocr.

MOREIRA, L. R. S. A. Enzymology of plant Cell Wall Breakdown: An Update. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 6, p. 63-93, il., color.

NIKLAS, K. J. SPATZ, H. C. Scanning Electron Microscopes. In: _____. **Plant Physics**. Chicago: The University of Chicago Press, 2012. p. 326.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, M. A. B. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: _____. **Análise química de açúcares: métodos qualitativos e quantitativos**. Cachoeira do Itapemirim: Noryam, 2009, p. 28-35.

POLIKARPOV, I; SERPA, V. I. Enzymes in Bioenergy. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 7, p. 94-107, il., color.

POLIZELI, M. L. T. M., et al. A. Hydrolases from Microorganisms used for Degradation of Plant Cell Wall and Bioenergy. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 5, p. 53-59, il., color.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Campinas: UNICamp, 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2007. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acesso em: 26 mai. 2012.

RODRIGUES, R. C. **Métodos de Análises Bromatológicas de Alimentos: Métodos Físicos, Químicos e Bromatológicos**. 1. ed. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, dez. 2010. 117 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 306).

SAMUEL, R. et al. Structural changes in switchgrass lignin and hemicelluloses during pretreatments by NMR analysis. **Polymer Degradation Stability**, [S.l.], v. 96, n. 11, p. 2002-2009, ago. 2011.

SANTOS F. A et al. Potencial da Palha de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol. **Química Nova**, São Paulo, v. XY, n. 0, p. 1-7, 2012. (no prelo).

SCHÄDEL, C. et al. Quantification and monosaccharide composition of hemicelluloses from different plant functional types. **Plant physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 1, p. 1-8, jan. 2010.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 2. ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002.

STICKLEN, M. B. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. **Nature reviews genetics**, Londres, v. 9, p. 433-443, jun. 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Etanol e Bioeletricidade: A cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: UNICA, 2009.

VAN SOEST, P.J.; WINE, R.H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 51, p.780-785, jan. 1968.

WARD, R. J. Cellulase Engineering for Biomass Saccharification. In: BUCKERIDGE, Marcos S.; GOLDMAN, Gustavo H. (Eds.). **Route to Cellulosic Ethanol**. New York: Springer, 2011. v. 1, cap. 9, p. 135-151, il., color.

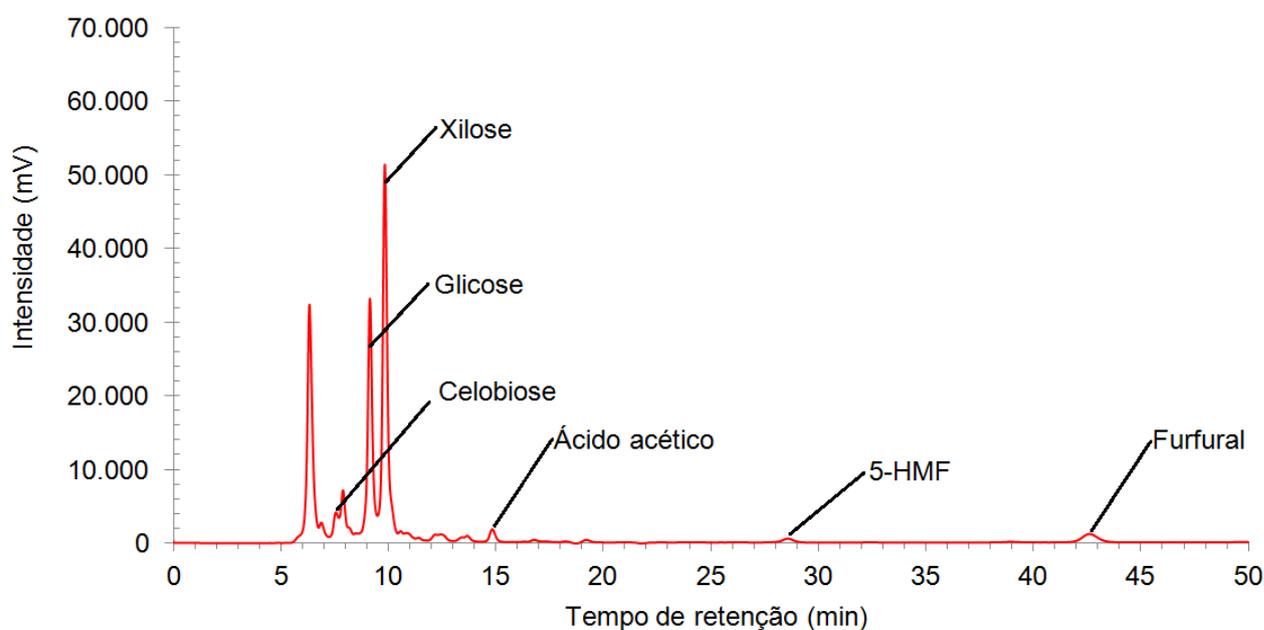
WYMAN, E. C.; YANG, B. Dilute Acid and Autohydrolysis Pretreatment. In: MIELENZ, J. R. (Ed.). **Biofuels: Methods and Protocols**. 1. ed. New York: Humana Press, 2009. cap. 8, p. 103-114. (Série Methods in Molecular Biology, v. 581).

ZHONG, L. et al. Computational Molecular Modeling for Biofuel Research. **SciDAC Review**, San Diego, v. 6, p. 4, winter 2007. Disponível em: <<http://www.scidacreview.org/0704/html/news1.html>>. Acesso em: 03 jun. 2012.

ZHOU, Y. et al. The use of natural abundance stable isotopic ratios to indicate the presence of oxygen-containing chemical linkages between cellulose and lignin in plant cell walls. **Phytochemistry**, New York, v. 71, p. 982-993, mar. 2010.

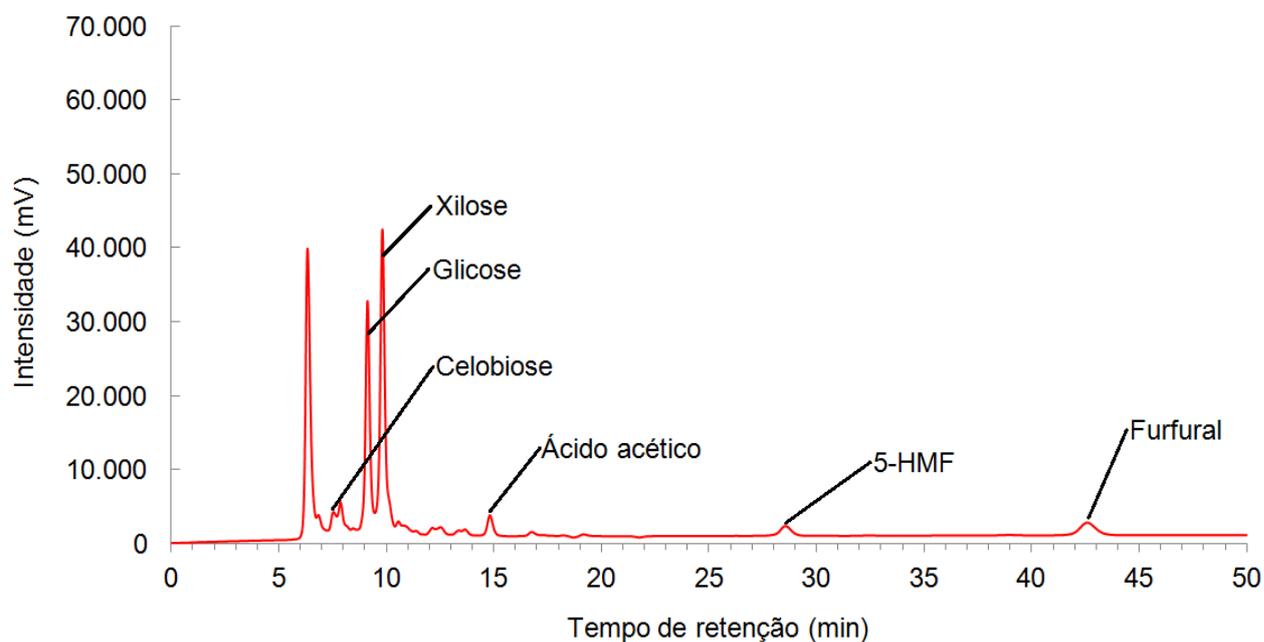
APÊNDICE A – Cromatogramas resultantes da análise por HPLC da fase líquida resultante do pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar com os principais picos observados (assinalados e identificados)

Figura 48 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 15 min (Experimento 1)



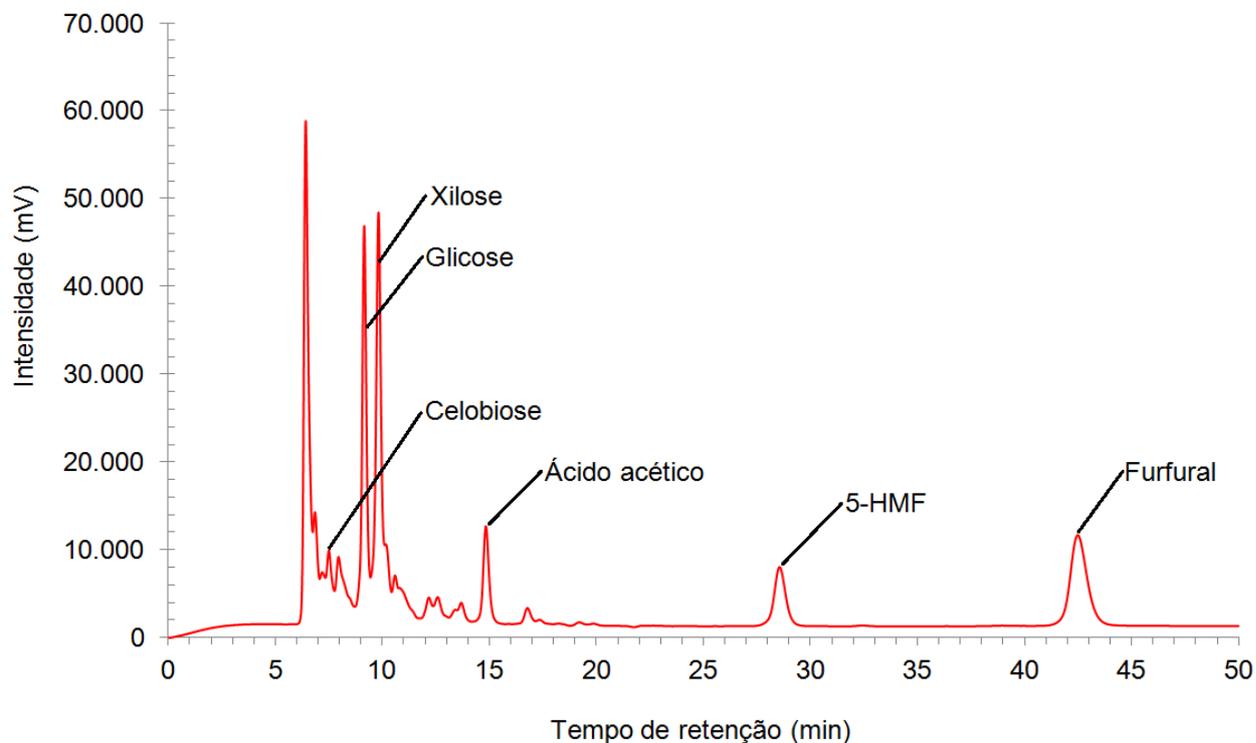
Fonte: o autor (2012).

Figura 49 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 15 min (Experimento 2)



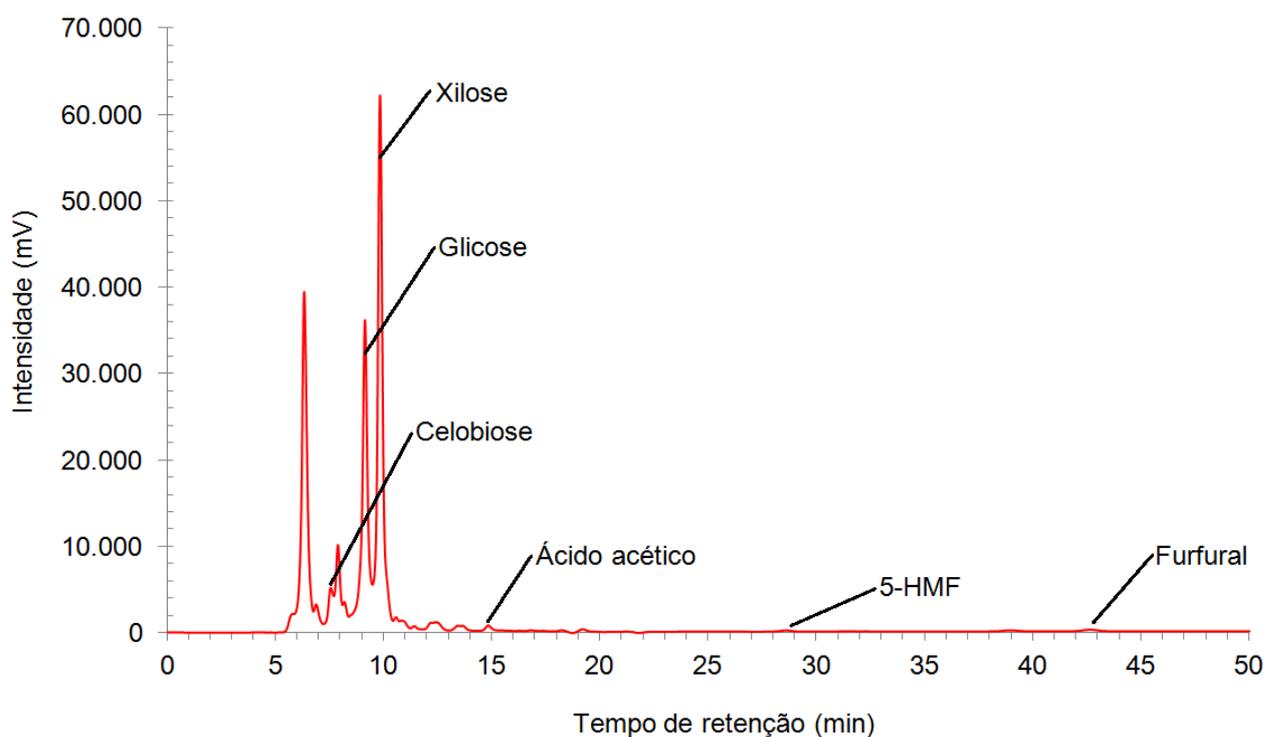
Fonte: o autor (2012).

Figura 50 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 205°C por 22 min (Experimento 3)



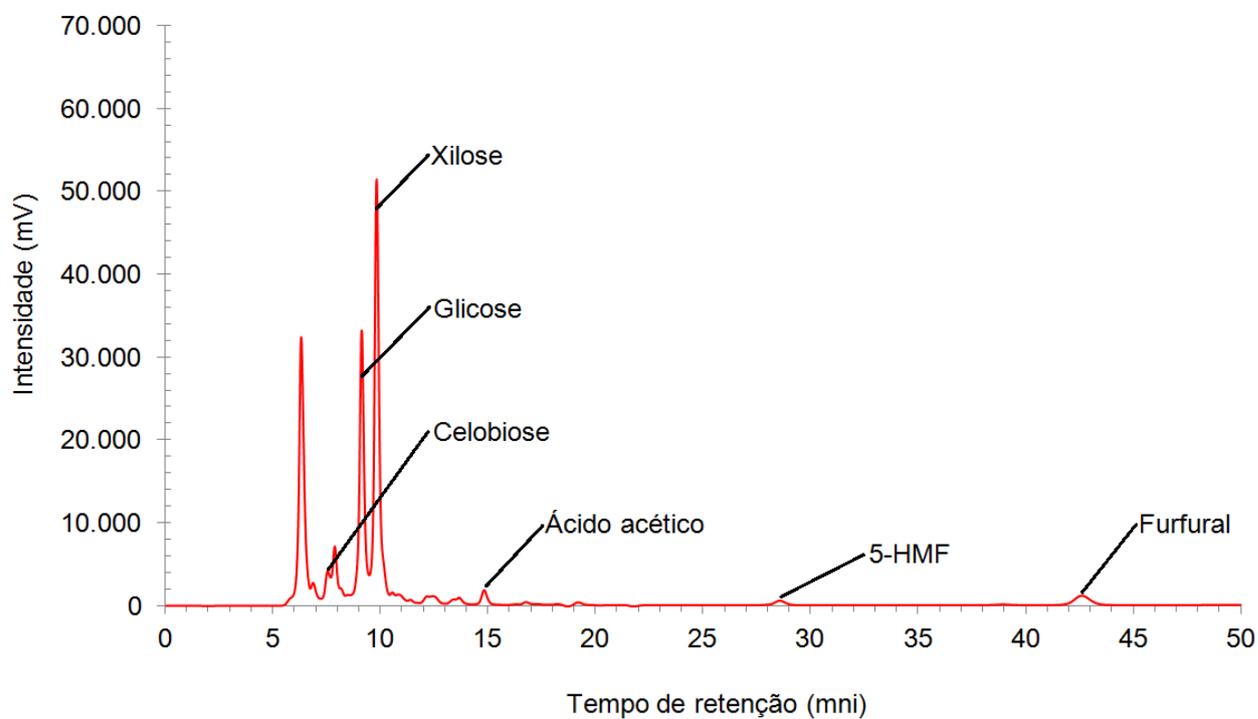
Fonte: o autor (2012).

Figura 51 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 175°C por 8 min (Experimento 4)



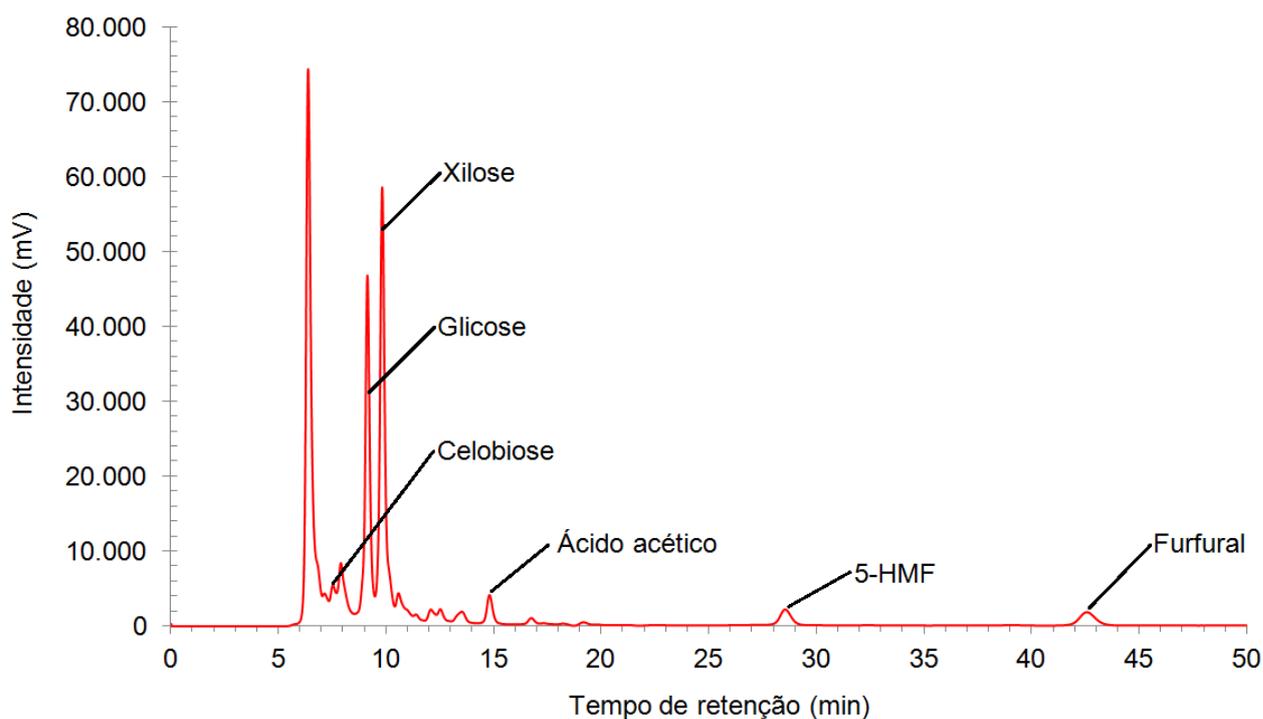
Fonte: o autor (2012).

Figura 52 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 175°C por 22 min (Experimento 5)



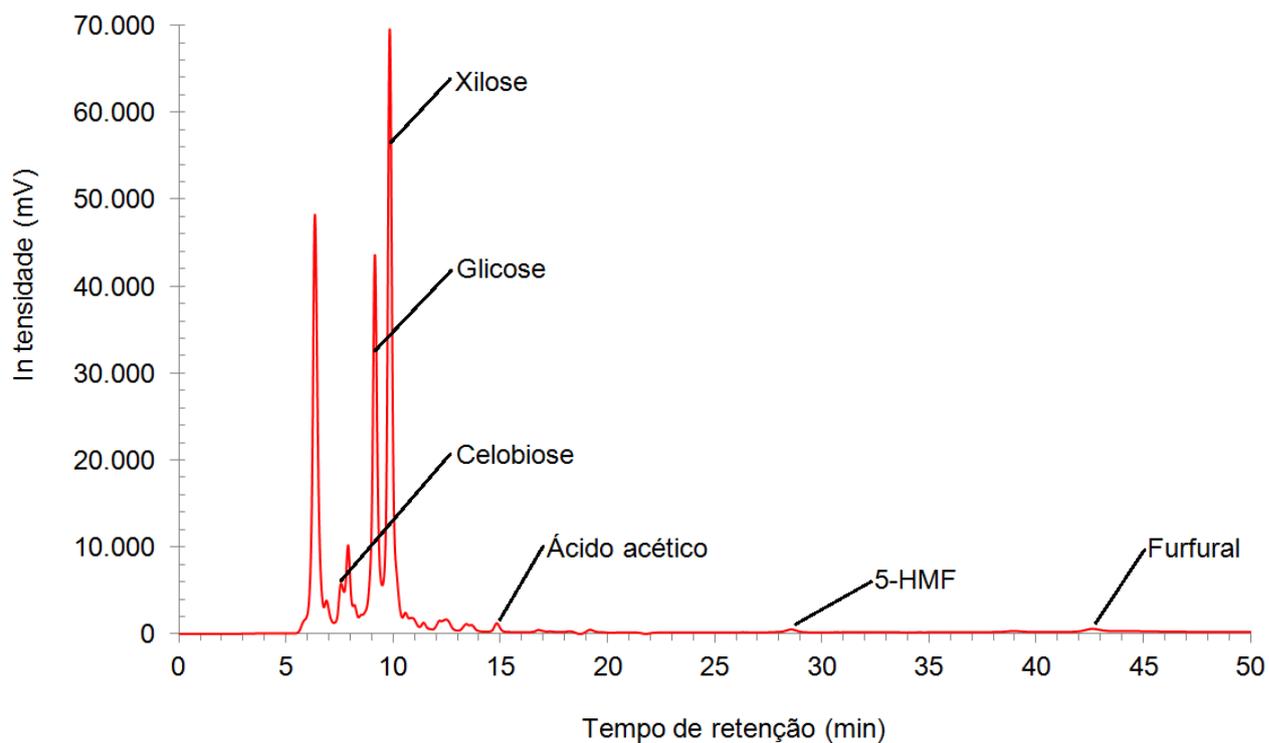
Fonte: o autor (2012).

Figura 53 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 205°C por 8 min (Experimento 6)



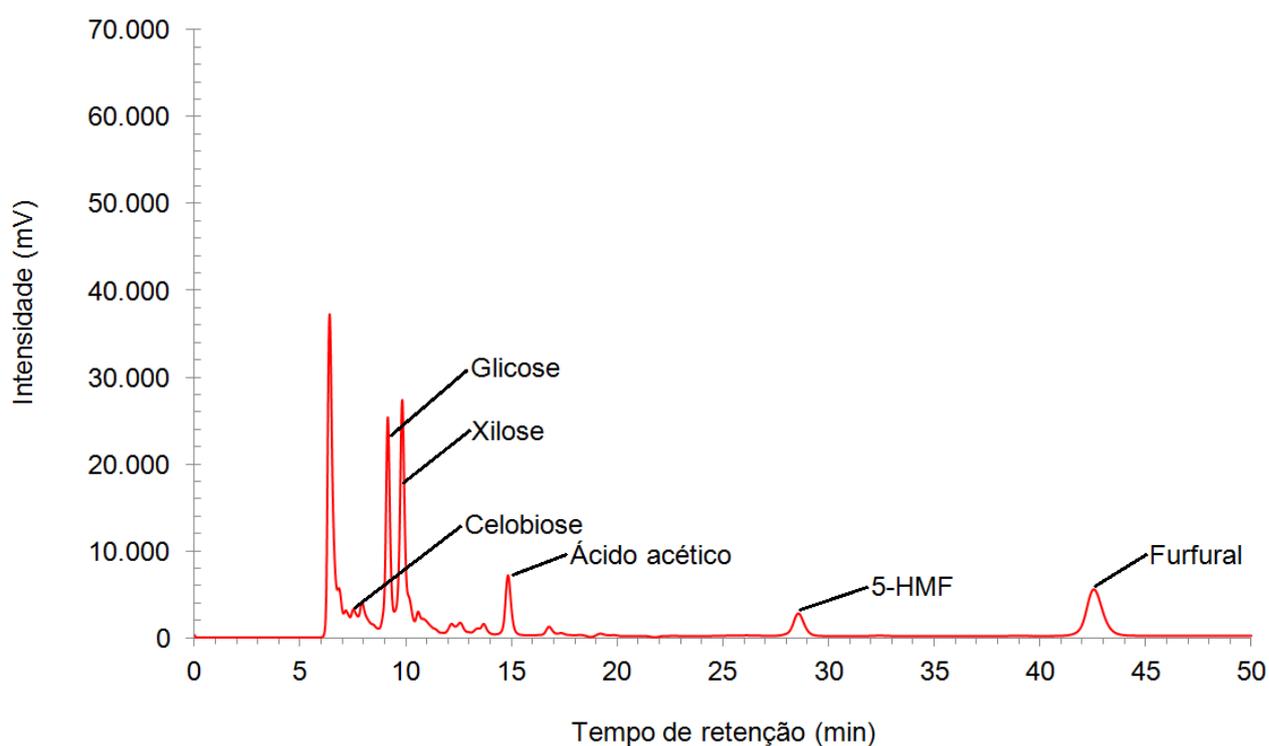
Fonte: o autor (2012).

Figura 54 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 5 min (Experimento 7)



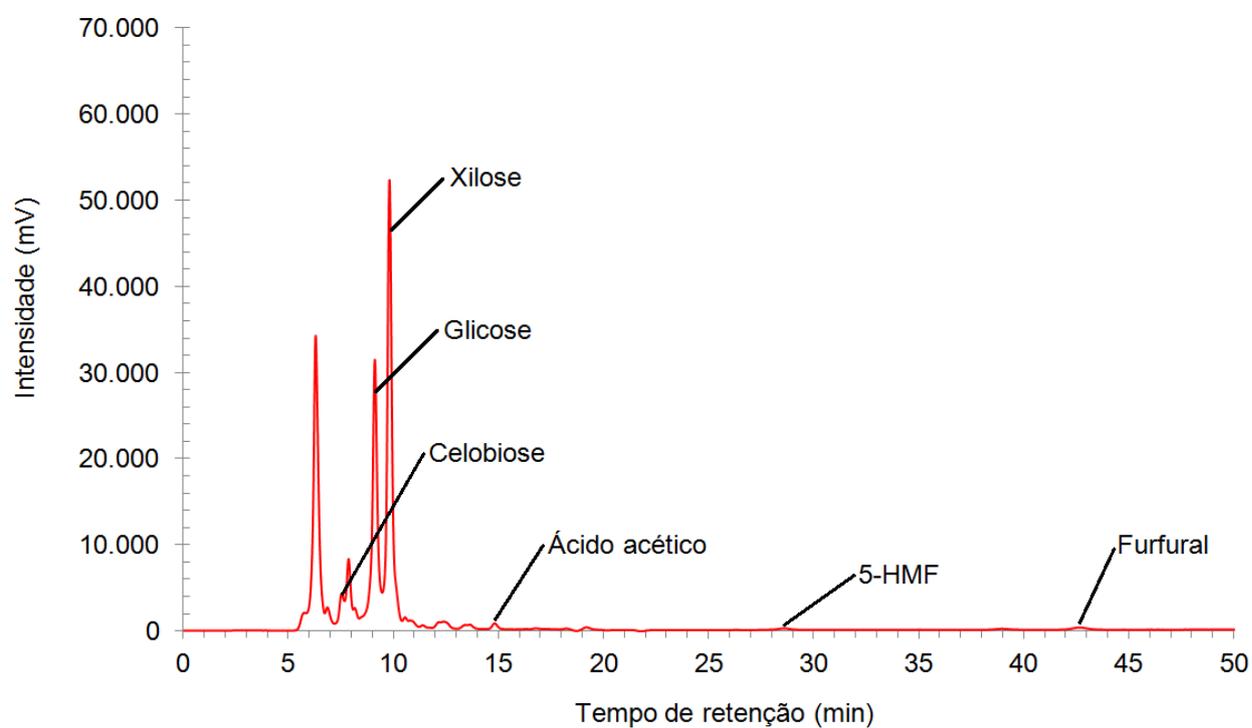
Fonte: o autor (2012).

Figura 55 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 190°C por 25 min (Experimento 8)



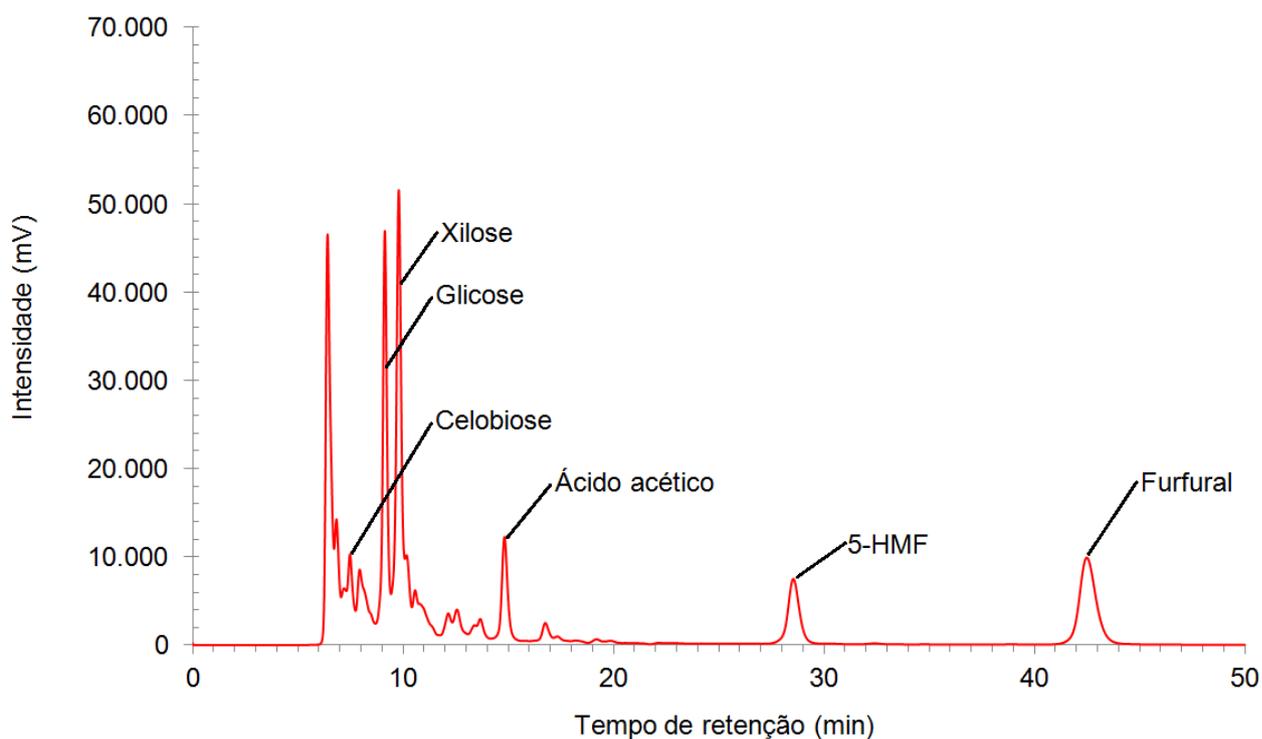
Fonte: o autor (2012).

Figura 56 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 169°C por 15 min (Experimento 9)



Fonte: o autor (2012).

Figura 57 - Cromatograma representativo da fase líquida resultante do pré-tratamento a 211°C por 15 min (Experimento 10)



Fonte: o autor (2012).