

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MAIRA PREARO GRIMALDI

EFEITO DOS PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

ARARAQUARA
2013

MAIRA PREARO GRIMALDI

**EFEITO DOS PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E FÍSICOS DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

**Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia**

Orientador: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado

ARARAQUARA

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

G861e	Grimaldi, Maira Prearo Efeito dos pré-tratamentos químicos e físicos do bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática / Maira Prearo Grimaldi. – Araraquara : [s.n], 2013 75 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado 1. Biotecnologia. 2. Bagaço de cana. 3. Hidrólise enzimática. 4. Pré-tratamento alcalino. I. Título.
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

MAIRA PREARO GRIMALDI

Formação Acadêmica (2006/2010)

Bacharelado em Biotecnologia

Universidade Federal de São Carlos

Bolsista Fapesp TT3 – Projeto BIOEN-FAPESP (2010/2011)

Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Trabalhos publicados em Anais de Congresso

GRIMALDI, M. P. ; BORGES. M.T.M.R. . Estudo da hidrólise enzimática da sacarose de caldo de cana-de-açúcar, visando padronização na produção de melado. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, 17., 2009, São Carlos. Anais...São Carlos: UFSCar, 2009.

MARQUES, M. P.; PEREIRA, T. A. V.; GRIMALDI, M. P.; BERLINCK, R. G. S.; SPONCHIADO, S. R. P. . Determining cellulolytic activity in fungal isolates grown in different conditions using congo red agar method. In. TERCEIRO CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA, Fortaleza. Resumos...Brasília: SBBIOTEC, 2010.

GRIMALDI, M. P.; MARQUES, M. P.; CILLI, E. M.; LALUCE, C.; SPONCHIADO, S. R. P. Comparison of acid and alkaline methods for pretreatments of sugar cane bagasse. In: BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE, 1 , 2011, Campos do Jordão. Procedeengs...São Paulo: Fapesp, 2011.

GRIMALDI, M. P. ; SPONCHIADO, S. R. P. . Avaliação do efeito sinérgico de métodos químicos e físicos de pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUIMICA, 52., 2012, Recife. Anais...Rio de Janeiro: ABQ, 2012.

E-mail: ma.prearo@gmail.com

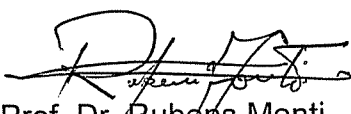
MAIRA PREARO GRIMALDI

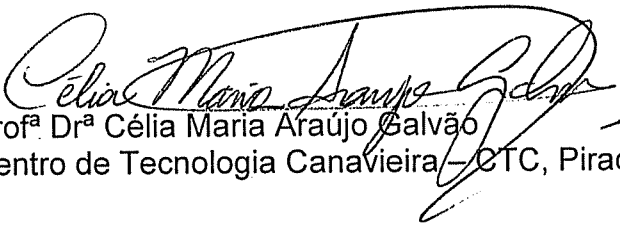
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 28 de janeiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a Dr^a Sandra Regina Pombeiro Sponchiado (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Rubens Monti
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara


Prof^a Dr^a Célia Maria Araújo Galvão
Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, Piracicaba

Dedico este trabalho
aos meus avós e aos meus pais,
com muito amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me guiado, me protegido, me dado força, sabedoria e saúde para concluir mais uma das etapas da minha vida.

Também gostaria de agradecer aos meus avós e a minha mãe pelo carinho, amor e apoio durante a realização desse projeto. A decisão de iniciar essa etapa da minha vida e seguir adiante foi por incentivo de vocês, que me conduziram na busca de novos caminhos para um crescimento moral e intelectual.

Nesta pesquisa contei com a colaboração e incentivo de várias pessoas, sendo todas fundamentais na realização desse estudo tanto no sentido de me prestarem informação quanto no incentivo pessoal.

Agradeço as minhas amigas; Marina, Fátima, Natália, Mariana, Josiane, Bruna e Pâmela pela ajuda, amizade e alegrias proporcionadas.

Em especial as minhas amigas Marina e Fátima que além da amizade sempre me ajudaram durante os momentos mais difíceis.

A Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, pela orientação e aprendizado.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica pela convivência e os bons momentos ao longo desta jornada.

Aos amigos Ademir, Waldenir, Zilda e Luíza por tudo que me ensinaram e me ajudaram.

A Cristina pela ajuda com as correções da escrita e formatação.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que infelizmente não estão escritos aqui, mas que com seu auxílio e colaboração, tornaram possível a realização desse trabalho.

Muito obrigada !

EPÍGRAFE

Eu tenho uma espécie de dever,
dever de sonhar, de sonhar sempre,
pois sendo mais que um espectador de mim mesmo,
eu tenho que ter o melhor espetáculo que posso...

Fernando Pessoa

RESUMO

Com a crescente demanda por fontes alternativas de combustíveis, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos torna-se uma opção interessante. Esse processo permite o aumento da produção de etanol sem a necessidade de crescimento da área plantada dos cultivares utilizados. Para a produção do etanol celulósico é necessário o fracionamento da biomassa de forma a disponibilizar a maior quantidade de carboidratos possível para o processo de fermentação alcoólica, porém essa biomassa precisa de um pré-tratamento para desorganizar a estrutura recalcitrante do material. Neste sentido, o principal objetivo deste projeto foi avaliar os métodos de pré-tratamentos alcalino, utilizando hidróxido de cálcio, e hidrotérmico, utilizando água, nos bagaços de cana-de-açúcar *in natura* (obtido diretamente da moenda) e explodido (submetido a explosão a vapor). Foram testados os tempos de 7, 30 e 60 minutos em ambos os tratamentos a uma temperatura de 120 °C em autoclave. Foram realizados planejamentos fatoriais completos a fim de analisar a influência do hidróxido de cálcio e do tempo no desempenho da hidrólise, quantificando a liberação de glicose e açúcares redutores totais (ART). Dessa maneira foram realizadas análises da composição química do bagaço pré-tratado a fim de avaliar uma possível correlação entre as modificações na estrutura do material e a eficiência da hidrólise. Os resultados mostraram que os melhores rendimentos foram obtidos com o bagaço *in natura* pré-tratado com hidróxido de cálcio em todos os tempos testados, a hidrólise enzimática desse material resultou em um rendimento mais alto, de 3,2 a 4,3 vezes, em comparação com a hidrólise no bagaço *in natura* sem pré-tratamento. Um novo planejamento foi realizado, delineamento composto central superfície resposta, para determinar as condições de hidrólise que levam a máxima liberação de glicose. Nessa etapa foi realizada a hidrólise do bagaço *in natura* submetido ao pré-tratamento alcalino, com a adição de um surfactante não-iônico (Tween 80). A melhor condição encontrada nesse processo de otimização para o bagaço submetido ao pré-tratamento alcalino por 30 minutos, foi de 10 FPU/g bagaço e 5% (m/m) de tween em 24 horas de hidrólise, atingindo uma produção média de 328 mg de glicose por grama de bagaço. Essa condição obteve aproximadamente o mesmo rendimento de glicose comparado com a hidrólise realizada no mesmo material utilizando 15 FPU/g bagaço e um tempo de 72 horas. Assim com este estudo foi possível concluir que o pré-tratamento com Ca(OH)_2 no BCA *in natura* tornou o material mais acessível às enzimas celulolíticas e que o uso do surfactante Tween 80 (5% m/m) favoreceu a hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Biotecnologia. Bagaço de cana. Hidrólise enzimática. Pré-tratamento alcalino.

ABSTRACT

Due to the growing demand for alternative sources of fuel, ethanol production from lignocellulosic materials became an interesting option. This process allows the increase of ethanol production without the need of growth of the planted area of the cultivars used. For the production of cellulosic ethanol is necessary to fractionate the biomass to provide the largest possible amount of carbohydrates to ethanol fermentation process, but this biomass needs a pretreatment to disrupt the recalcitrant structure of the material. In this sense, the main objective of this project was to evaluate the methods of alkaline pretreatments, using calcium hydroxide, and hydrothermal, using water, in sugar cane bagasses *in natura* (obtained directly from the mill) and exploded (subjected to steam explosion). We tested different times (7, 30 and 60 minutes) in both treatments at a temperature of 120 °C in autoclave. Complete factorial designs were performed to examine the influence of calcium hydroxide and hydrolysis time performance by quantifying the release of glucose and total reducing sugars (TRS). Thus were analyzed the chemical composition of the pretreated bagasse to evaluate a possible correlation between changes in material structure and efficiency of hydrolysis. The results showed that the best yields were obtained with the *in natura* bagasse pretreated with calcium hydroxide at all times tested and the enzymatic hydrolysis increased from 3.2 to 4.3 fold compared to untreated *in natura* bagasse. A new schedule was conducted, a central composite design surface response, to determine the hydrolysis conditions which lead to maximal glucose release. In this step was done the hydrolysis of *in natura* bagasse subjected to alkaline pretreatment, with the addition of a nonionic surfactant (Tween 80). The best condition found in this optimization process for the bagasse subjected to alkaline pretreatment (30 minutes), was 10 FPU/g bagasse and 5% (m/m) Tween in 24 hours of hydrolysis, reaching an average production of 328 mg of glucose per gram of biomass. This condition obtained the same glucose yields compared to the hydrolysis conducted in the same material using 15 FPU/g bagasse and a time of 72 hours. This study concluded that the pretreatment with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ in the *in natura* BCA becomes the material more accessible to cellulolytic enzymes and the use of surfactant Tween 80 (5% w/w) favored the enzymatic hydrolysis.

Keywords: Biotechnology. Sugarcane bagasse. Enzymatic hydrolysis. Alkaline pretreatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A estrutura da celulose.	18
Figura 2	A estrutura de uma xilana de gramínea.	19
Figura 3	Precursores da lignina.	20
Figura 4	A estrutura da lignina do <i>Fagus, sp.</i> (árvore de madeira mole)	21
Figura 5	Esquema mostrando as etapas de bioconversão de açúcares em bioetanol.	22
Figura 6	Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.	23
Figura 7	Efeito da temperatura e pH no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.	26
Figura 8	Fatores limitantes da eficiência na hidrólise da celulose.	28
Figura 9	Bagaço <i>in natura</i> .	31
Figura 10	Bagaço explodido.	31
Figura 11	Reação de oxidação da carbonila para o reagente de DNS.	32
Figura 12	Reações enzimáticas ocorridas para a quantificação da glicose, quando utiliza-se o método descrito por Henry et al., (1974).	33
Figura 13	Reação do furfural com o orcinol na presença do ácido e FeCl ₃ como catalisador.	34
Figura 14	Diagrama da análise composicional do bagaço	35
Figura 15	Açúcares redutores totais (ART) liberados no filtrado do pré-tratamento alcalino a 120°C para os tempos de 7, 30 e 60 minutos no BCA <i>in natura</i> separado em três granulometrias (pó, fibra e ambos).	41
Figura 16	Liberação de glicose após hidrólise enzimática do BCA <i>in natura</i> , submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120 °C.	46

Figura 17	Liberação de glicose após hidrólise enzimática do BCA explodido, submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino(ALC) nos tempos de 7 , 30 e 60 minutos a 120°C.	47
Figura 18	Gráfico dos principais efeitos sobre a porcentagem de digestão da celulose.	50
Figura 19	Gráfico do efeito das interações sobre a variável de resposta porcentagem de digestão da celulose.	51
Figura 20	Análise composicional para o BCA <i>in natura</i> (IN) e explodido (EXP) para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 7 minutos.	53
Figura 21	Análise composicional para o BCA <i>in natura</i> (IN) e explodido (EXP) para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 30 minutos.	53
Figura 22	Análise composicional para o BCA <i>in natura</i> (IN) e explodido (EXP) para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 60 minutos.	54
Figura 23	Valores de pH após pré-tratamento alcalino (ALC) ou hidrotérmico (HID), no bagaço <i>in natura</i> (IN) e explodido (EXP).	56
Figura 24	Fotomicrografia do BCA <i>in natura</i> sem pré-tratamento.	57
Figura 25	Fotomicrografia do BCA explodido sem pré-tratamento.	57
Figura 26	Fotomicrografia do BCA explodido com pré-tratamento alcalino por 60 minutos.	58
Figura 27	Fotomicrografia do BCA <i>in natura</i> com pré-tratamento alcalino por 30 minutos.	58
Figura 28	Avaliação do efeito do pré-tratamento nas diferentes formas do BCA.	59
Figura 29	Curva de nível descrita pela Equação 4.	63
Figura 30	Superfície resposta descrita pela Equação 4.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Matriz de planejamento (sem repetição) para a etapa de pré-tratamento sacarificação.	39
Tabela 2	Composição dos materiais utilizados como controle: BCA <i>in natura</i> e BCA explodido.	40
Tabela 3	Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina para o BCA <i>in natura</i> , após os tratamentos hidrotérmicos (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120°C.	42
Tabela 4	Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina para o BCA explodido, após os tratamentos hidrotérmicos (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120°C.	44
Tabela 5	Hidrólise enzimática (72 h) do BCA <i>in natura</i> submetido aos pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) nos tempo de 7, 30 e 60 minutos e os respectivos resultados de liberação de açúcares redutores totais (ART), glicose e porcentagem de digestão de celulose.	48
Tabela 6	Hidrólise enzimática (72 h) do BCA explodido submetido aos pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) nos tempo de 7, 30 e 60 minutos e os respectivos resultados de liberação de açúcares redutores totais (ART), glicose e porcentagem de digestão de celulose.	48
Tabela 7	Matriz de planejamento apresentando os rendimentos de glicose e açúcares redutores totais (ART) após hidrólise do BCA <i>in natura</i> pré-tratado com hidróxido de cálcio por 30 minutos a 120°C.	62
Tabela 3a	Análise de variância para a porcentagem de celulose para o BCA <i>in natura</i> no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.	66
Tabela 3b	Análise de variância para a porcentagem de hemicelulose para o BCA <i>in natura</i> no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.	66
Tabela 3c	Análise de variância para a porcentagem de lignina para o BCA <i>in natura</i> no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.	66

Tabela 4a	Análise de variância para a porcentagem de celulose para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.	66
Tabela 4b	Análise de variância para a porcentagem de hemicelulose para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.	66
Tabela 4c	Análise de variância para a porcentagem de lignina para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico	67
Tabela 8	Análise de variância para a porcentagem de digestão de celulose.	67
Tabela 9	Análise de variância para o ajuste do modelo.	67
Tabela 10	Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento superfície resposta para a massa de glicose liberada.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	absorbância
ALC	pré-tratamento alcalino
ART	açúcar redutor total
BCA	bagaço de cana-de-açúcar
Ca(OH)₂	hidróxido de cálcio
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
EXP	pré-tratamento por explosão a vapor
FPase	filter papers (atividade enzimática da celulase)
GOD-PAP	método enzimático para determinação de glicose
g/g	grama por grama
g/mL	grama por mililitro
g/L	grama por litro
HID	pré-tratamento hidrotérmico
IN	<i>in natura</i>
°C	Graus Celsius
kV	Kilovolt
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mM	milimolar
mm	milímetro
m/V	massa por volume
m/m	massa por massa
mL.mg⁻¹.cm⁻¹	unidade utilizada para o coeficiente de absorvidade
nm	nanômetro
U/g	unidades por grama
U/mL	unidades por mililitro
UV	espectrofotometria de absorção no ultravioleta
rpm	rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Cana-de-açúcar	16
1.2	Bagaço de cana-de-açúcar	17
1.3	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	23
1.4	Hidrólise enzimática	27
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Material utilizado	30
3.2	Métodos de pré-tratamento	31
3.3	Análise dos açúcares	32
3.3.1	Determinação de açúcares redutores totais (ART)	32
3.3.2	Determinação de glicose	33
3.3.3	Determinação de xilose	33
3.4	Análise da composição química do bagaço	34
3.5	Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado (Sacarificação)	36
3.5.1	Determinação da atividade enzimática	37
3.6	Planejamento de experimentos	38
3.7	Análise estrutural dos bagaços pré-tratados por MEV	39
3.8	Análise estatística	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Composição do bagaço de cana-de-açúcar	40
4.2	Pré-tratamento do bagaço <i>in natura</i>	40
4.3	Pré-tratamento do bagaço explodido	44
4.4	Hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados	45
4.5	Efeito da composição do material na hidrólise enzimática	52

4.6	Análise estrutural do bagaço pré-tratado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	56
4.7	Avaliação do efeito sinérgico entre os pré-tratamentos	58
4.8	Otimização da sacarificação	60
5	CONCLUSÕES	65
6	APÊNDICE	66
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A conversão de energia solar em energia química, que se realiza nos vegetais durante a fotossíntese, é um dos fenômenos mais fascinantes da natureza. Na planta, a radiação solar se transforma em produtos estáveis, absolutamente essenciais para a vida em nosso planeta. E desde o início da humanidade, foi a simbiose com o mundo vegetal que lhe garantiu o suprimento de alimentos, energia e matérias-primas de amplo uso, permitindo, ao longo dos milênios, a evolução dos padrões de conforto e produtividade econômica. Depois de um breve intervalo nos últimos séculos, durante os quais a energia solar fossilizada passou a ser explorada e utilizada, na forma de carvão, petróleo e gás natural, a energia fotossintética volta, paulatinamente, à frente do cenário. Capaz de mitigar preocupantes problemas ambientais, a energia fotossintética traz uma nova dinâmica ao mundo agroindustrial e oferece uma alternativa à necessária evolução da sociedade industrial moderna para um contexto energético mais sustentável e racional (BANCO..., 2008).

Devido principalmente a esse recente interesse no aproveitamento da energia da biomassa, a busca por combustíveis alternativos levou alguns países a optar por biocombustíveis, como o etanol produzido pela fermentação de açúcares (etanol de primeira geração) extraído, principalmente, da cana-de-açúcar, do milho, da beterraba, entre outras fontes. Outra via para a produção de etanol é pela hidrólise de biomassa celulósica (GOYAL; GOSH; EVELEIGH, 1991; VAM WYK, 2001), com geração de glicose, a qual pode ser fermentada produzindo etanol (etanol de segunda geração) (OGEDA; PETRI, 2010).

Seguindo a tendência mundial, a indústria sucroalcooleira brasileira tem manifestado interesse em tecnologias sustentáveis que possam ser agregadas à sua cadeia produtiva. Esforços estão atualmente sendo direcionados na inclusão do bagaço e da palha da cana no ciclo de produção de etanol, denominado de etanol de segunda geração (CANILHA et al., 2010).

1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de

espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia. A parte aérea da planta é composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que constituem a palha da cana (BANCO..., 2008).

O clima ideal para o cultivo da cana é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida, para proporcionar a germinação, o perfilhamento (formação de brotos) e o desenvolvimento vegetativo, seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e o acúmulo de sacarose nos colmos (BANCO..., 2008).

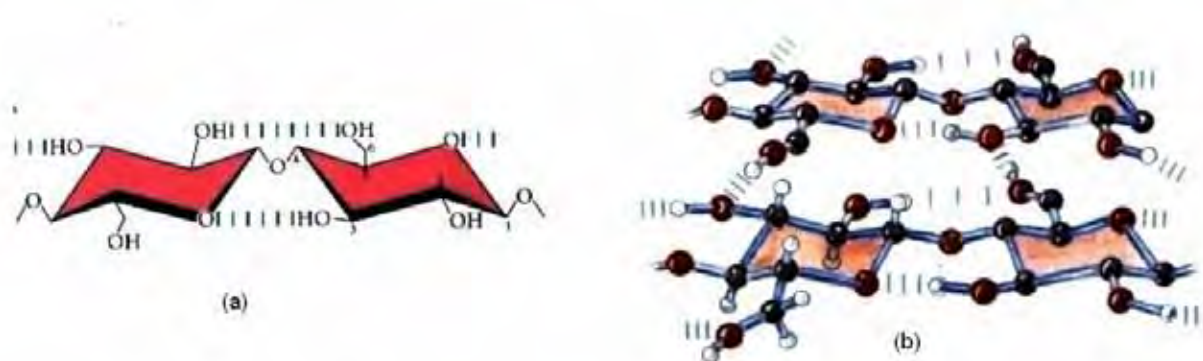
A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em 8.520,5 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores conforme suas características, o estado de São Paulo é o maior produtor com 51,87% (4.419,46 mil hectares). A produtividade média brasileira está estimada em 69.846 kg/ha, sendo 4,2% maior que na safra 2011/12. A atual previsão do total de cana-de-açúcar para ser moída na safra 2012/13 é de 595,13 milhões de toneladas, com aumento de 6,2% em relação à safra 2011/12. A produção de etanol total para a safra 2012/13 é estimada em 23,62 bilhões de litros, 5,22% menor que a produção da safra 2011/12 (COMPANHIA..., 2012).

1.2 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar ou “bagaço” é um subproduto da cana-de-açúcar, remanescente da moagem dos colmos da cana-de-açúcar. É obtido na saída do último terno de moenda das usinas de açúcar e destilarias, sendo constituído por um conjunto de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm (SCHLITTLER, 2006). O bagaço é constituído majoritariamente por lignina (20-30%), celulose (38-50%) e hemicelulose (25-27%) (RABELO, 2007; PANDEY et al., 2000; ROCHA et al., 2012). Também existem outros componentes que compõem o material, os extrativos do bagaço, eles compreendem uma grande variedade de substâncias químicas, que podem ser extraídas utilizando solventes polares e apolares. Essas substâncias são terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas. A soma destes componentes varia em cada espécie de material lignocelulósico e representa aproximadamente 5-20% de todo o material (FENGEL; WEGENER, 1989).

A celulose é um homopolissacarídeo formado unicamente por unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1, 4. Em uma molécula de celulose as unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas, o grau de polimerização varia de 10.000 a 15.000 (FENGEL; WEGENER, 1989). As moléculas de celulose são estabilizadas por ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, que são individualmente fracas, mas coletivamente resulta em uma grande força de ligação, dando à celulose uma elevada resistência a hidrólise (PEREIRA JÚNIOR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

Figura 1- A estrutura da celulose



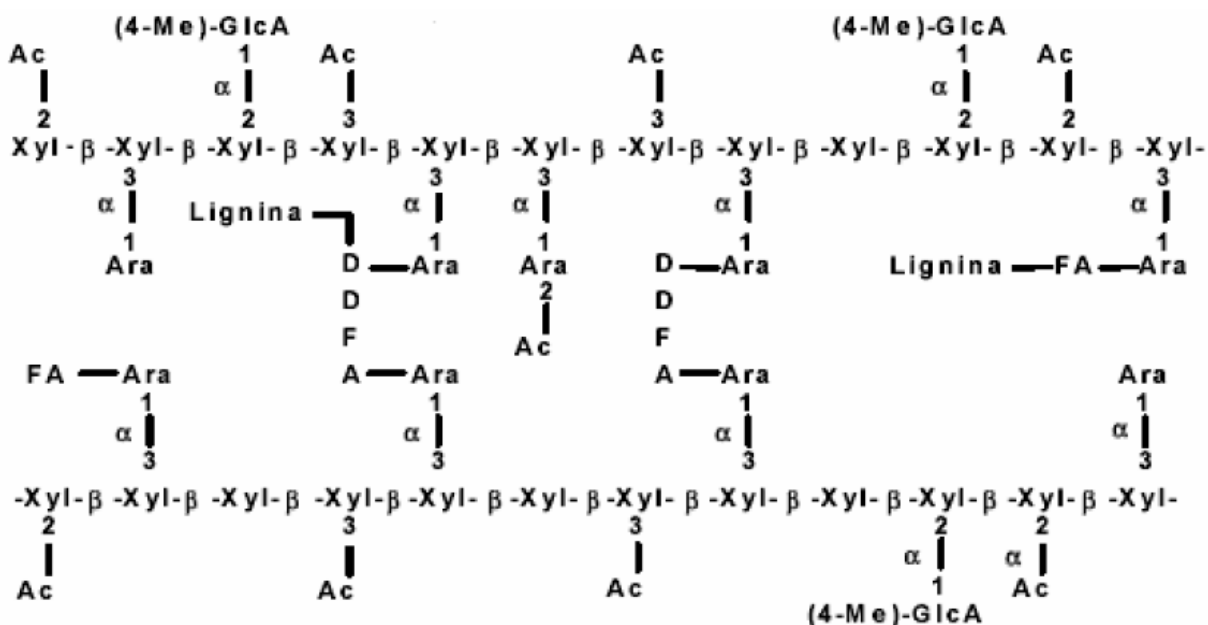
(a) Duas unidades de D-glicose unidas formando uma unidade de celobiose. (b) Desenho de segmentos de duas cadeias paralelas de celulose, mostrando a conformação de unidades de D-glicose e as interligações proporcionadas pela ponte de hidrogênio
Fonte: Nelson e Cox (2002).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo que consiste de diferentes açúcares como pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose) e também ácidos glucurônico e ferúlico. A hemicelulose tem um baixo grau de polimerização (50 a 300) comparado com a celulose, esse composto serve como uma conexão entre a lignina e as fibras de celulose e promove uma maior rigidez ao material ligocelulósico (FENGEL; WEGENER, 1989). Diferentemente da celulose, a estrutura da hemicelulose não apresenta alta cristalinidade, dessa maneira ela é mais susceptível à hidrólise em condições brandas (PEREIRA JÚNIOR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25% a 27% e quando sofrem hidrólise podem ser decompostas em xilose,

arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989 apud FUENTES, 2009; RABELO, 2007). O açúcar mais abundante encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (AGUILAR et al., 2002; GÍRIO et al., 2010; FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2- Estrutura de uma xilana de gramínea



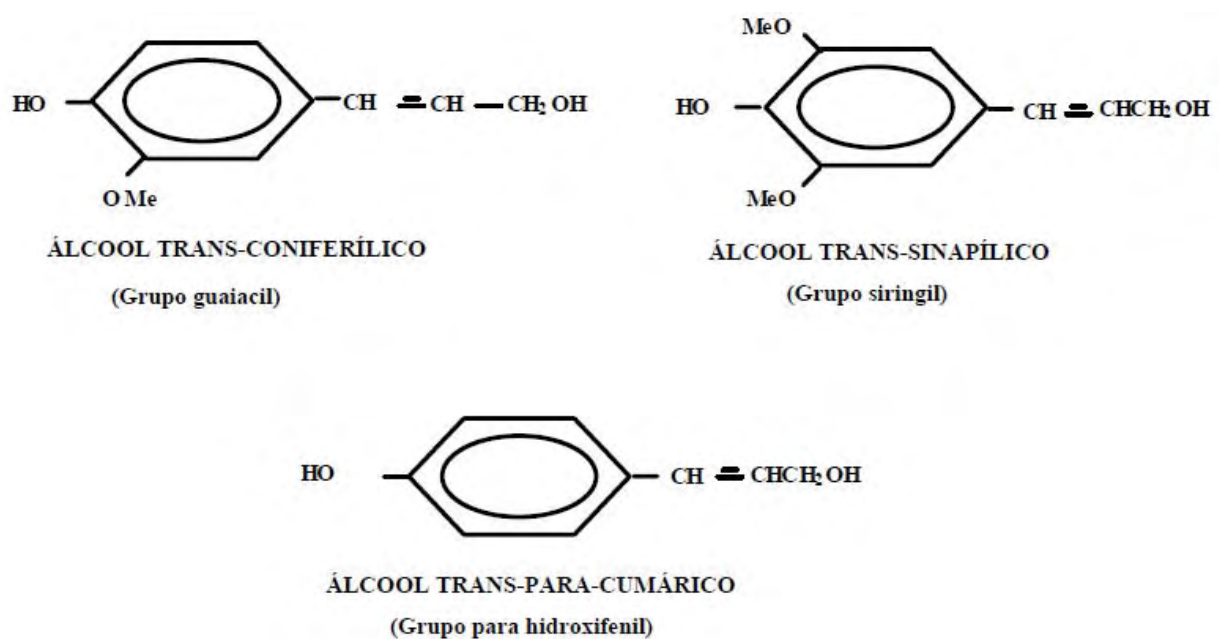
Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos constituintes : Xyl (1,4-D-xilopirranose); Ara (L-arabinofuranose); Ac (Acetil); (4-Me)-GlcA (ácido (4-o-metil)-D-glucopirranurônico); FA (ácido ferúlico); DDFA (ácido desidro-ferúlico)
Fonte: McDougall et al., (1993) apud Rabelo (2007).

Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais abundante nos materiais lignocelulósicos. Do ponto de vista morfológico a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média composta, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo e enrijecendo as paredes celulares (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é uma macromolécula altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos alcoóis hidroxycinâmicos: p-cumarílico (I), coniferílico (II) e sinapílico (III). A lignina é constituída principalmente de unidades de fenilproprano associadas por ligações estáveis do tipo Carbono-Carbono, aril-éter e aril-aril (FENGEL; WEGENER, 1989).

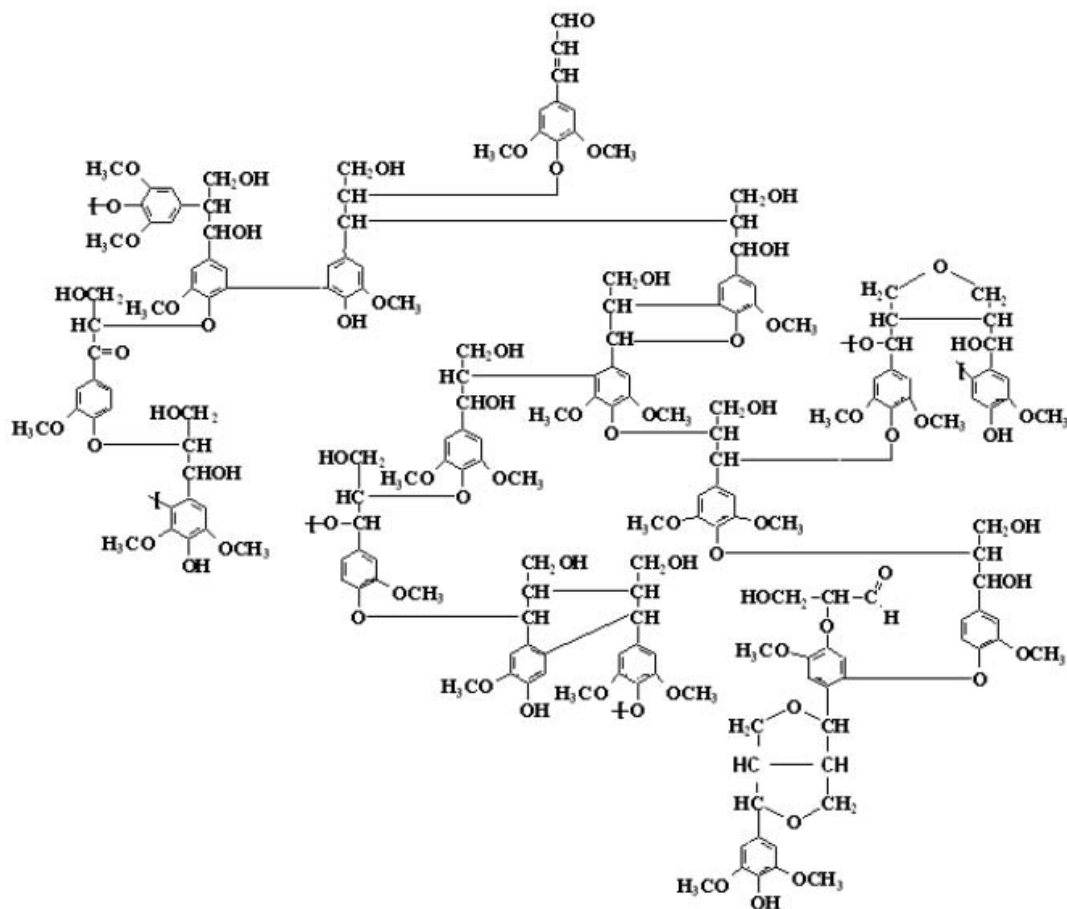
As ligninas presentes nos vegetais diferem entre si pelo grau de metoxilação dos monômeros e pelo grau de ligação carbono-carbono entre os mesmos (GOLDSTEIN, 1981 apud EMMEL, 1999; PITARELO, 2007). As ligninas de coníferas (madeiras moles como o *Pinus spp*) são quase que exclusivamente compostas por resíduos derivados do álcool coniferílico e são frequentemente denominadas de ligninas guaiacilas (lignina do tipo G), enquanto que as ligninas das folhosas (madeiras duras como o *Eucalyptus spp*) contêm resíduos derivados dos alcoóis coniferílico e sinapílico e são denominadas de lignina guaiacil-siringilas (lignina tipo GS). Em contraste as ligninas derivadas de gramíneas contêm os grupos para-hidroxifenil, guaiacil e siringil (HGS) (RAMOS, 2003).

Figura 3 - Precursores da lignina



Precursos primários da lignina e seus respectivos grupos *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S). Fonte: Klock et al. (2005).

Figura 4 – Estrutura da lignina de *Fagus, sp* (árvore de madeira mole)



Fonte: Fengel e Wegneger (1989).

Do ponto de vista tecnológico, os açúcares contidos nas frações celulósica (glicose) e hemicelulósica (xilose, arabinose, glicose, manose e galactose) representam os substratos que podem ser utilizados por leveduras para a produção de etanol de segunda geração por via fermentativa. No entanto, a íntima associação entre as três frações principais (celulose, hemicelulose e lignina) é tal que impõe dificuldades para a obtenção dos açúcares constituintes na forma de monômeros (CANILHA et al., 2010).

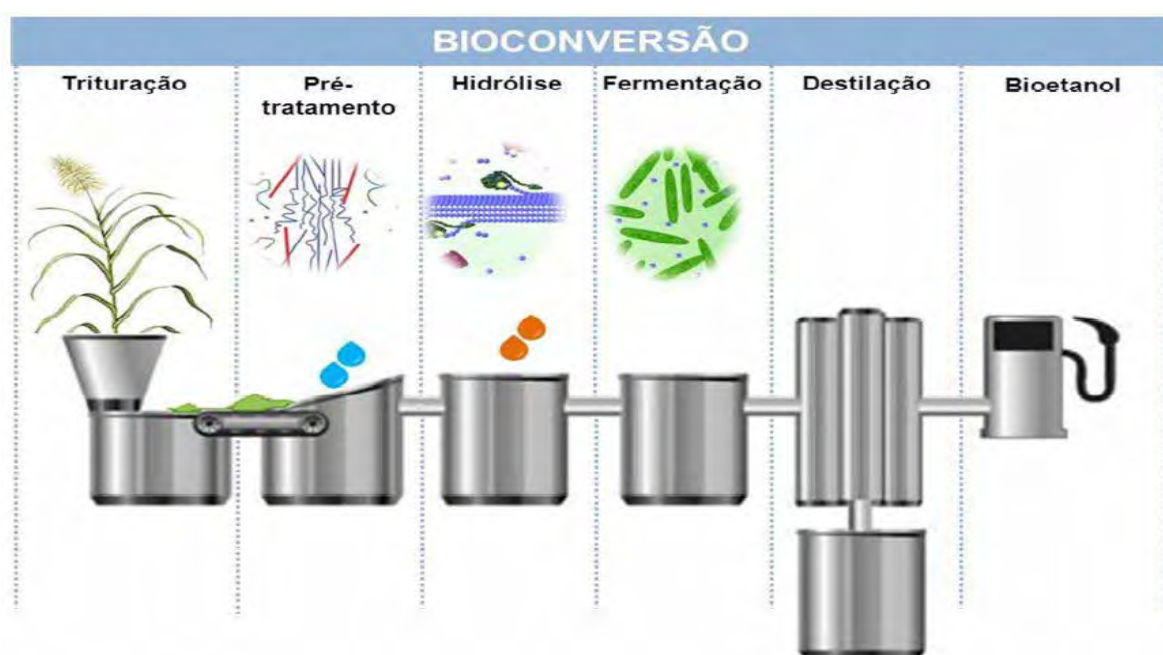
Dessa maneira, a etapa de hidrólise da celulose e da hemicelulose em açúcares fermentescíveis passa pelo obstáculo da acessibilidade das enzimas a este material lignocelulósico, que devido à sua estrutura recalcitrante precisa ser submetido a um pré-tratamento, o qual desorganiza a estrutura da celulose, hemicelulose e lignina tornando o material mais acessível às enzimas celulolíticas. Desta forma a etapa de pré-tratamento passa a ser fundamental para aumentar a

produção de açúcares monoméricos utilizados na fermentação alcoólica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

De uma maneira geral a produção de etanol utilizando o bagaço ocorre em basicamente cinco etapas (Figura 4): (1) trituração, que envolve a preparação do material lignocelulósico; (2) pré-tratamento, que irá desagregar o complexo carboidrato-lignina e/ou romper a própria estrutura celulósica altamente ordenada; (3) hidrólise, que irá quebrar as longas cadeias das moléculas de celulose em glicose que são açúcares fermentescíveis, por meio de enzimas ou ácidos; (4) fermentação que irá converter os açúcares em etanol e por último, (5) a destilação do etanol (MERINO; CHERRY, 2007). Embora todos esses processos sejam funcionais, ainda não são eficientes o suficiente para permitir a produção comercial de etanol (BUCKERIDGE; SANTO; SOUZA, 2010).

O desenvolvimento de processos para a produção de etanol de segunda geração envolve etapas que precisam ser otimizadas de forma integrada, para que haja viabilidade econômica, atendendo aos conceitos de sustentabilidade (ALVES FILHO, 2012).

Figura 5- Esquema mostrando as etapas de bioconversão de açúcares em bioetanol.

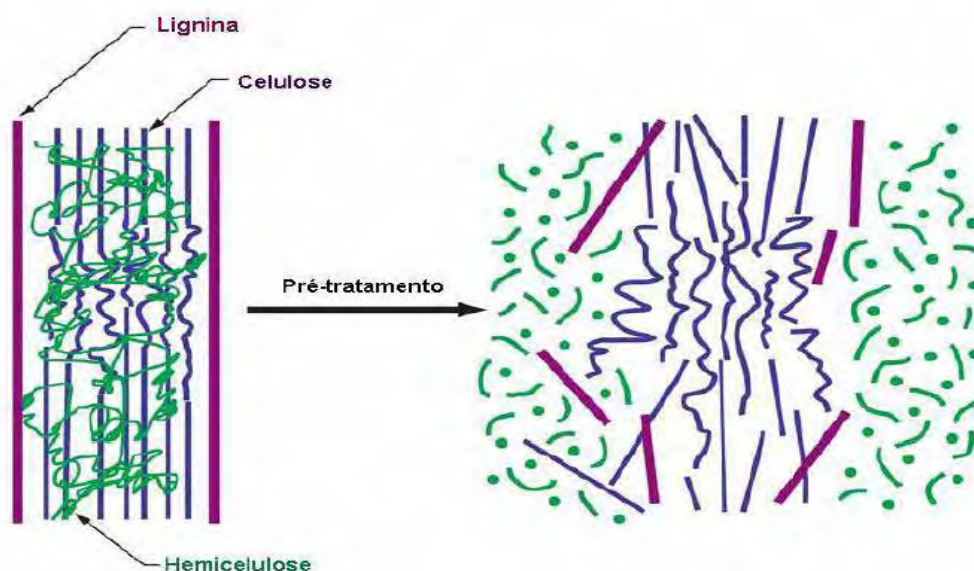


Fonte: Estevam-Alves e Guimarães (2009).

1.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O desafio do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é romper a estrutura do material, diminuindo o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose e aumentando sua porosidade, o que permite o acesso das enzimas a fim de obter altas taxas de rendimento de açúcares fermentescíveis. O ideal é que este tratamento seja de baixo custo, evite o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética, a intensa degradação dos carboidratos presentes no material lignocelulósico e a produção de compostos que agem como inibidores da fermentação (WYMAN et al., 2005; MOSIER et al., 2005; HIMMEL et al., 2007).

Figura 6-Esquema do efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.



Fonte: Mosier et al., (2005)

Diversos tipos de pré-tratamentos do bagaço têm sido investigados: tais como o ácido (GÁMEZ et al., 2004, 2006; RODRIGUEZ-CHONG et al., 2004; CHANDEL et al., 2007; CHENG et al., 2008; PATTRA et al., 2008; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; TEIXEIRA et al., 1999), explosão a vapor (MARTÍN et al., 2002; SENDELIUS, 2005; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), alcalino (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; KURAKAKE et al., 2001), alcalino *dewaxed* (PENG et al., 2009), biológico (LI et al., 2002; CAMASSOLA; DILLON, 2009), *wet oxidation* (MARTÍN et al., 2007),

organosolv (PASQUINI et al., 2005a,b; PEREIRA et al., 2007; TU et al., 2008) e hidrotérmico (LASER et al., 2002) (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Vários estudos têm mostrado que os maiores rendimentos em açúcar são obtidos com hidrólise ácida, utilizando ácido concentrado (solução ác. sulfúrico 72% ou ác. hidrocloreídrico 41%, aquecido a 100-120 °C por 30 a 360 minutos) ou diluído (ác. sulfúrico com concentração inferior a 1% por 3 minutos a 215 °C) (RAMOS, 2003). A hidrólise com ácido diluído tem sido mais aplicada devido à sua rápida taxa de reação, baixo consumo de reagente, menor corrosão de equipamentos e também uma quantidade reduzida de produtos de degradação, quando comparado com a hidrólise utilizando ácido concentrado (HAMELINCK; VAN-HOOIJDOCK; FAAIJ, 2005).

A hidrólise com ácido diluído promove a solubilização da hemicelulose, dessa maneira as frações de celulose e lignina permanecem quase inalteradas na fase sólida e podem ser posteriormente processadas. Dependendo das condições de operação, a fase líquida do hidrolisado será constituída de açúcares (xilose, glicose e arabinose), produtos da hidrólise das hemiceluloses (como ácido acético) e/ou produtos da decomposição dos monossacarídeos, como furfural (produto da degradação de pentoses) e 5-hidroximetilfurfural (HMF, produto da degradação das hexoses) que agem como inibidores da fermentação (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010).

Os processos hidrotérmicos, utilizando água em altas temperatura e pressão, também solubilizam a hemicelulose, pois durante o tratamento ocorre a clivagem das ligações do complexo lignina-carboidrato e o ácido acético formado pela desacetilação parcial da hemicelulose, age como catalisador da reação de hidrólise, sendo denominado processo auto-catalítico (ALVIRA et al., 2010).

Os processos alcalinos podem utilizar diversas bases como o hidróxido de cálcio, potássio, sódio ou amônio. O pré-tratamento alcalino causa a solubilização, redistribuição e condensação da lignina da biomassa e modificações na estrutura cristalina da celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Esse tratamento aumenta a taxa de hidrólise enzimática da celulose e é efetivo na solubilização da lignina, porém solubiliza em menor grau as frações celulósicas e hemicelulósicas se comparado com os tratamentos ácido e hidrotérmico (ALVIRA et al., 2010).

O tratamento alcalino utilizando hidróxido de cálcio consegue remover substâncias amorfas como a lignina e o grupo acetil da hemicelulose, facilitando a ligação das enzimas ao substrato na etapa de sacarificação (ALVIRA et al., 2010; CHANG; NAGWANI; HOLTZAPPLE, 1998). Nesse tratamento também ocorre um aumento da porosidade do material lignocelulósico, devido à quebra das ligações que mantêm os componentes da biomassa em conjunto (Xu et al., 2010). Comparando com outros agentes catalisadores, o hidróxido de cálcio oferece certas vantagens, como menor preço que os outros álcalis, baixa toxicidade para o meio ambiente e pode ser recuperado facilmente, tratando-se a água de lavagem com gás carbônico (ALVIRA et al., 2010).

Dentre os pré-tratamento físicos, pode-se citar o *steam explosion* (explosão a vapor), no qual o material é aquecido em temperaturas entre 150°C e 230°C (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008), usando alta pressão de vapor por alguns minutos. Dessa maneira, o vapor condensa em alta pressão e o material é umedecido, assim quando a pressão dentro do reator é rapidamente liberada ocorre a explosão do material (CARRASCO, 1989). Durante o processo ocorre a solubilização da hemicelulose e uma redistribuição da lignina na superfície da fibra, que é resultado da solubilização dessa lignina com posteriores reações de despolimerização/repolimerização. A rápida descompressão e o fluxo turbulento do material causam fragmentação e aumento da superfície de contato, mas dependendo da severidade do pré-tratamento, pode ocorrer degradação da celulose (KUMAR et al., 2009).

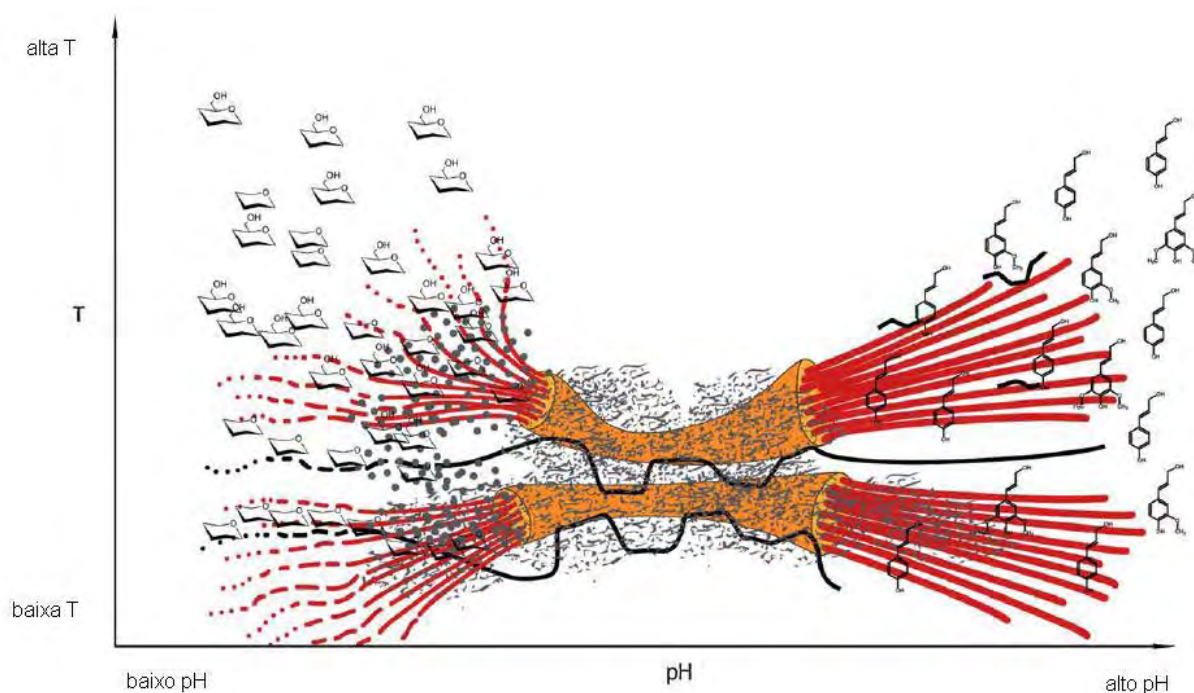
A técnica de explosão a vapor é de grande conhecimento no setor sucroalcooleiro no Brasil, pelo fato do bagaço explodido ser utilizado para a alimentação de animais. Dessa maneira a utilização dessa tecnologia para a produção de etanol de segunda geração, seria facilmente incorporada pelo setor industrial (PEREIRA JÚNIOR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

Cada processo de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens, sendo que o pré-tratamento ideal ainda não foi desenvolvido. Uma combinação de diferentes pré-tratamentos representa uma alternativa a fim de contornar os obstáculos existentes nos métodos atuais. Os principais entraves são: alta produção de poluentes, a dificuldade de tratar esses resíduos, deslignificação insatisfatória da biomassa, a oxidação parcial da celulose, a degradação de açúcares com produção

de inibidores da fermentação e o grande consumo de energia (SPIGNO; PIZZORNO; DE FAVERI, 2008).

A biomassa sofre alterações químicas e estruturais em resposta as diferentes condições de pré-tratamento aplicadas como mostrado na figura 7. O modelo ilustra a influência dos diferentes níveis de pHs e temperaturas aplicados no processo de pré-tratamento e o efeito nas frações celulósicas, hemicelulósicas e de lignina. Em condições alcalinas a lignina é degradada e são liberados monômeros de compostos fenólicos, em condições ácidas a lignina é redepositada na fração sólida na forma de gotículas (esferas cinzas). Verifica-se a degradação da hemicelulose e da celulose em monossacarídeos em condições extremamente ácidas. Na região intermediária, com valores de pH neutro, o tempo requerido para o pré-tratamento aumenta em comparação com valores de pH extremos, além disso a temperatura varia em função do pH e também do tempo. Por isso é de extrema importância considerar essas três variáveis no delineamento de um processo de pré-tratamento (PEDERSEN; MEYER, 2010).

Figura 7- Efeito da temperatura e pH no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos



Os riscos em cinza ilustram a lignina; tubos de laranja e vermelho ilustram as fibras celulósicas e microfibrilas, respectivamente; as linhas curvas pretas ilustram a hemicelulose (xilana) e os pontos cinzentos sobre as microfibrilas de celulose na região de pH baixo ilustram a lignina redepositada. Fonte: Pedersen e Meyer (2010).

Desta forma é de fundamental importância estabelecer uma metodologia de pré-tratamento que consiga: remover a hemicelulose e a lignina, aumentar a área superficial, diminuir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose, com a menor degradação possível da celulose. Tal metodologia deve proporcionar altas taxas de rendimento de açúcares fermentescíveis e apresentar baixo custo e redução de resíduos gerados para a comercialização da tecnologia de produção de etanol de segunda geração.

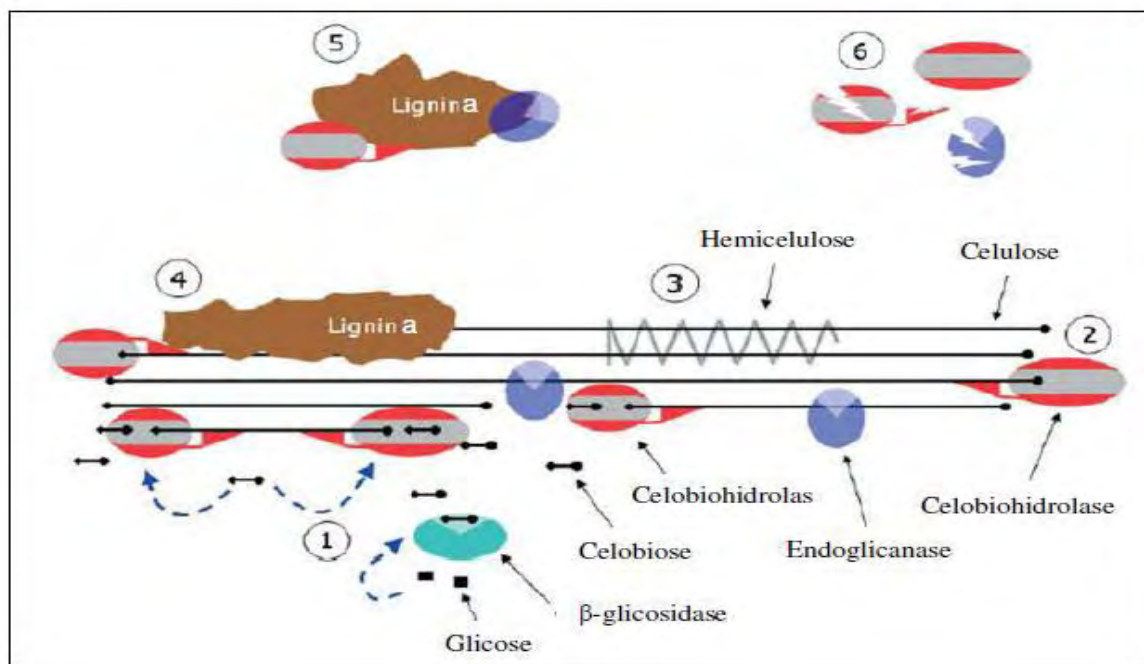
1.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos tem sido considerada uma tecnologia promissora para a obtenção de açúcares fermentescíveis, pelo fato das enzimas apresentarem elevada especificidade e do processo ser conduzido em condições amenas de pH e temperatura. No entanto, atualmente nenhum processo de hidrólise está em fase comercial devido ao alto custo de produção das celulasas, a grande quantidade de enzima requerida para a hidrólise e o longo tempo do processo para obter rendimentos altos (OGEDA; PETRI, 2010; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

O mecanismo amplamente aceito para a hidrólise enzimática da celulose envolve a ação sinérgica de três classes diferentes de enzimas (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006): a) Endoglucanases (EGs, E.C. 3.2.1.4)), hidrolisam preferencialmente as ligações internas da cadeia de celulose, produzindo oligossacarídeos de menor massa molecular; b) Exoglucanases ou celobiohidrolases (CBHs, E.C. 3.2.1.91), hidrolisam a cadeias celulósica a partir de suas extremidades liberando celobioses; c) β -glicosidases ou celobiasas (EC 3.2.1.21), promovem a hidrólise da celobiose em glicose e podem também clivar celoligossacarídeos (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; BANSAL et al, 2009; SANTOS et al., 2010).

Durante o processo de sacarificação, após uma fase inicial mais rápida, a taxa de hidrólise diminui resultando em menores rendimentos de glicose e como consequência um aumento do tempo do processo (MERINO; CHERRY, 2007). Deve ser considerado que a eficiência desta hidrólise depende de diversos fatores que podem inibir ou dificultar a ação das celulasas. A Figura 8 mostra alguns fatores que limitam a hidrólise enzimática (CHANDRA et al, 2007).

Figura 8- Fatores limitantes da eficiência na hidrólise da celulose.



(1) inibição do produto final, ou seja, a glicose inibindo a β -glicosidase e a celobiose inibindo a celobiohidrolase.

(2) ligação irreversível da celobiohidrolase

(3) e (4) a hemicelulose e a lignina impedindo o acesso das enzimas ao substrato

(5) adsorção das enzimas na lignina

(6) perda da atividade enzimática devido ao cisalhamento mecânico, atividade proteolítica ou baixa termoestabilidade

Fonte: Jørgensen, Kristensen e Felby (2007).

A eficiência da hidrólise enzimática depende do pré-tratamento utilizado no material lignocelulósico e de alguns parâmetros do processo de hidrólise, como a carga enzimática, concentração do substrato, tempo de reação e adição de surfactante, como Tween. Pelo fato desses fatores interagirem um com o outro, a otimização da hidrólise enzimática tem um papel importante no aperfeiçoamento do processo (BENKUN et al., 2009; SUN; CHENG, 2002).

O método de otimização tradicional, utilizado no processo de hidrólise enzimática, consiste em alterar uma variável independente enquanto mantém as outras variáveis em um nível fixo. Esse método demanda muito tempo, é trabalhoso e tem um gasto excessivo de reagentes, levando a um incompleto entendimento do

comportamento do sistema (BAS; BOYACI, 2007 apud BENKUN et al., 2009). A razão para isso é que as variáveis podem se influenciar mutuamente, e o valor ideal para uma delas pode depender do valor da outra, esse comportamento que chamamos de interação entre os fatores, é um fenômeno que ocorre com muita frequência (BARROS; ESCARMINO; BRUNS, 2010).

Uma abordagem alternativa e mais eficiente é o uso de um método estatístico, a metodologia de superfície de resposta (ou RSM, Response Surface Methodology), que é uma técnica de modelagem empírica para a avaliação da relação de um conjunto de fatores experimentais através dos resultados observados. RSM é uma poderosa ferramenta matemática que pode analisar o efeito de múltiplas variáveis ou fatores, sozinhos ou em combinação, num dado processo de forma rápida e eficiente com um número mínimo de experimentos, mantendo um elevado nível de significância estatística nos resultados (GUAN; YAO, 2008). A metodologia de superfície resposta pode ser utilizada na otimização da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos (BENKUN et al., 2009).

2 OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi avaliar o efeito dos pré-tratamentos alcalino e hidrotérmico em dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar (*in natura* e explodido) e também avaliar a sacarificação desse material pré-tratado no sentido de estabelecer uma metodologia de baixo custo que torne o material mais acessível às enzimas celulolíticas para conversão da celulose em açúcares fermentescíveis, Embora esteja estabelecido na literatura que o pré-tratamento alcalino aumenta a eficiência da hidrólise enzimática, o tipo de material lignocelulósico também é um fator importante a ser considerado. Nesse trabalho foi escolhido o BCA *in natura* pelo fato que este material é obtido direto da moenda, sem nenhuma etapa de preparação. A utilização do BCA explodido nesse trabalho teve o objetivo de avaliar um possível efeito sinérgico entre os pré-tratamentos físico (explosão a vapor) e químico (alcalino), considerando o fato de que grande parte das usinas aplicam este tipo de pré-tratamento no BCA destinado a ração animal.

Para atingir os objetivos foram realizados

- 1) Os pré-tratamentos alcalino (Ca(OH)_2) e hidrotérmico (H_2O) no bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e explodido em diferentes tempos, para estabelecer as condições ideais de tratamento.
- 2) Análise da composição química do bagaço pré-tratado em relação à porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina, por técnicas espectrofotométricas.
- 3) Análise estrutural do bagaço pré-tratado por microscopia eletrônica de varredura.
- 4) A digestão do bagaço, utilizando as enzimas comerciais (celulase e β -glicosidase), para avaliar a eficiência dos diferentes métodos de pré-tratamento.
- 5) A otimização do processo de digestão da celulose em relação a presença de surfactante (Tween 80) e a carga enzimática utilizada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material utilizado

Para os estudos de pré-tratamento foi escolhido o bagaço *in natura*, recolhido após a moagem, e o bagaço explodido, submetido à explosão a vapor. Ambos os bagaços (figura 9 e 10) não foram submetidos a nenhum processo de pré-tratamento ou separação por granulometria, somente foram secos a 60 °C até peso constante e armazenados em freezer.

- I) BCA *IN NATURA* - coletado logo após a saída da moenda e armazenado em local limpo - Cedido pela Usina São Martinho (Pradópolis/SP).
- II) BCA EXPLODIDO - Cedido pelo CTC (Centro de Tecnologia Canavieira)

Também foi analisado o efeito da granulometria no bagaço *in natura*. Neste caso o bagaço foi lavado até a total retirada de açúcares e impurezas, em seguida foi seco a 60 °C por 24 horas e separado em três classes:

- I) Fibra: entre 4,76 mm e 1 mm
- II) Ambos: vários tamanhos
- III) Pó: menor que 1mm

Figura 9 - Bagaço *in natura*.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 10 - Bagaço explodido.



Fonte: elaborado pelo autor.

3.2 Métodos de pré-tratamentos

A carga de hidróxido de cálcio estabelecida foi de 0,1 g/g de biomassa e a relação de água: biomassa foi de 10:1 (mL:g), de acordo com The Texas A&M, (1997). Para a temperatura e o tempo de pré-tratamento foi estabelecida a temperatura de 120 °C nos tempos de 7, 30 e 60 minutos com base nos estudos de Chang, Nagwani e Holtzaple (1998). Eles estudaram temperaturas que variaram de 65 a 135 °C nos tempos de 1 a 24 horas e o melhor resultado foi obtido para a temperatura de 120 °C no tempo de 1 hora.

Para o pré-tratamento alcalino colocou-se em um frasco 2,5 g de bagaço juntamente com 0,25 g Ca(OH)_2 , esse material foi homogeneizado e em seguida acrescentou-se 25 mL de água. Para o pré-tratamento hidrotérmico utilizou-se 2,5 g de bagaço e 25 mL de água. Os frascos contendo o bagaço *in natura* e explodido foram submetidos à temperatura de 120 °C nos tempos de 7, 30 e 60 minutos. Os frascos contendo o bagaço *in natura* de diferentes granulometrias (fibra, pó e ambos) também foram submetidos à temperatura de 120 °C nos tempos de 7, 30 e 60 minutos. Após autoclavagem, acrescentou-se 150 mL de água deionizada e em seguida a mistura foi filtrada a vácuo. O processo resultou em uma fração líquida (água de lavagem) que foi armazenada para posterior análise e uma fração sólida

(fibra insolúvel), que foi lavada até atingir pH neutro e seca em estufa a 60 °C para posterior pesagem e análise estrutural.

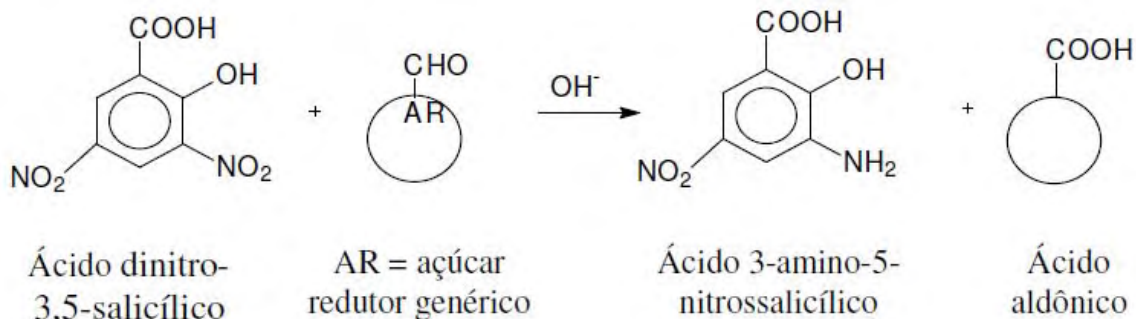
Para cada condição de pré-tratamento testada foi preparado 10 g de material oriundos de quatro experimentos independentes.

3.3 Análise dos açúcares

3.3.1 Determinação de açúcares redutores totais (ART)

As concentrações de ART foram determinadas pelo método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS), descrito por Miller (1959). O método baseia-se na redução, em meio alcalino do 3,5-dinitrosalicilato (coloração amarela), sendo que o produto formado é estável e tem coloração laranja-avermelhado (3-amino 5-nitro salicilato) com máxima absorção no comprimento de onda de 540 nm. Neste método ocorre a reação de oxidação mostrada na figura 11:

Figura 11- Reação de oxidação da carbonila para o reagente de DNS.



Fonte: Rabelo, (2007).

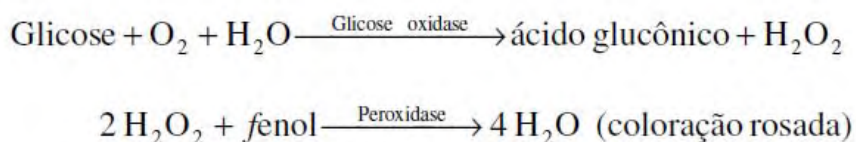
Para a dosagem do açúcar redutor, em 1 mL da amostra (diluída) foi adicionado 2 mL do reagente DNS, o branco foi preparado adicionando-se 1 mL de água no lugar da amostra. Os tubos foram transferidos para banho de água fervente (100 °C) por 5 minutos e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância a 540nm.

A quantificação de açúcares redutores totais presente na amostra foi feita utilizando um coeficiente de absorvidade de 2,183 mL.mg⁻¹.cm⁻¹ obtido a partir da curva padrão de glicose.

3.3.2 Determinação da Glicose

O método utilizado para a determinação de glicose (GOD-PAP), descrito por Henry et al, (1974), baseia-se na oxidação enzimática da glicose através da enzima glicose oxidase (GOD) resultando na forma de peróxido de hidrogênio, o qual na presença de fenol e da enzima peroxidase (PAP) ocorre a formação de um produto de coloração rosada. As reações enzimáticas envolvidas neste método de quantificação da glicose estão mostradas abaixo:

Figura 12- Reações enzimáticas ocorridas para a quantificação da glicose, quando utiliza-se o método descrito por Henry et al., (1974).



Fonte: RABELO, 2007.

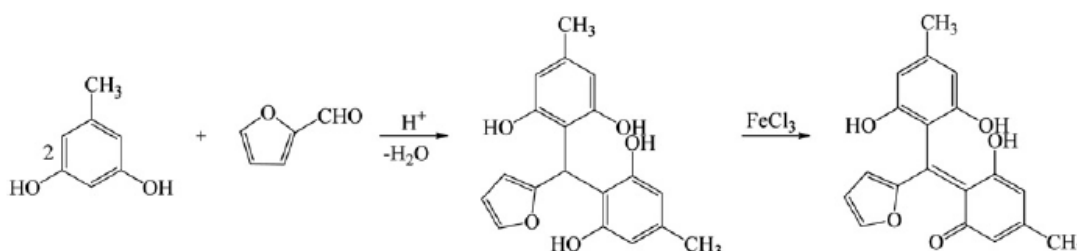
Para a dosagem da glicose, 1 mL da amostra (diluída) juntamente com 2 mL do reagente foram mantidos durante 10 minutos em banho de água a 37 °C e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância das amostras no comprimento de onda de 505 nm. O branco foi preparado adicionando-se 1 mL de água no lugar da amostra.

A quantificação da glicose presente na amostra foi feita utilizando um coeficiente de absorvidade de 10,578 mL.mg⁻¹.cm⁻¹ obtido a partir da curva padrão de glicose.

3.3.3 Determinação da Xilose

O método usado é baseado na reação de desidratação da xilose e/ou arabinose com ácido clorídrico 98% para produzir furfural (figura 13), descrito por Pham et al., (2011). O furfural reage com o orcinol na presença de ácido clorídrico e Fe³⁺, o cloreto férrico age como catalisador e a reação forma um produto com coloração esverdeada, sendo detectado no comprimento de onda de 671 nm.

Figura 13- Reação do furfural com o orcinol na presença do ácido e FeCl₃ como catalisador



Fonte: Pham et al., (2011).

Para a dosagem da xilose, 0,5 mL da amostra (diluída) juntamente com 1 mL do reagente foram mantidos durante 5 minutos em banho de água a 100 °C e posteriormente foram feitas as leituras de absorbância das amostras no comprimento de onda de 671 nm. O branco foi preparado adicionando-se 0,5mL de água no lugar da amostra.

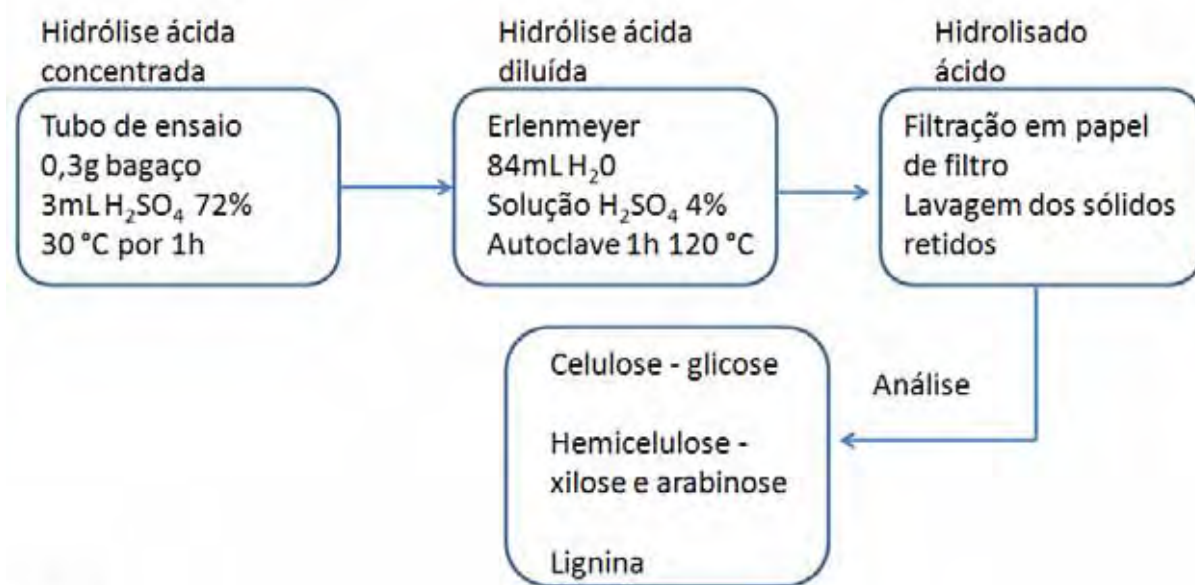
A quantificação da xilose presente na amostra foi feita utilizando um coeficiente de absorvidade de 6,785 mL.mg⁻¹.cm⁻¹, obtido a partir da curva padrão de xilose.

3.4 Análise da composição química do bagaço

Para avaliar a composição química da fração sólida do bagaço pré-tratado (fibra insolúvel) foram quantificados os açúcares contidos na celulose (glicose) e na hemicelulose (xilose, arabinose) e também a porcentagem de lignina. Para isto, primeiramente foi feita uma hidrólise ácida do material seco como descrito por Sluiter et al., (2008a), utilizando ácido sulfúrico com posterior quantificação e caracterização dos açúcares liberados, como descrito na figura 14.

A hidrólise ácida foi realizada pesando 0,3 g de cada amostra de bagaço seco (fibra insolúvel) em tubos de ensaio e adicionando 3 mL de ácido sulfúrico a 72% e em seguida os tubos foram incubados em um banho termostático com agitação a 30 °C por 1 hora.

Figura 14– Diagrama da análise composicional do bagaço



Fonte: Elaborado pelo autor

Depois de decorrido o tempo de hidrólise ácida concentrada, os tubos foram removidos do banho termostático e o conteúdo transferido quantitativamente para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso 84 mL de água destilada, sendo a concentração ácida diluída para 4%. Para a completa hidrólise dos oligômeros, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e elásticos e colocados em uma autoclave. As amostras foram autoclavadas por 1 hora a 121 °C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio.

Os hidrolisados ácidos foram filtrados em funis utilizando papéis de filtro. As frações líquidas foram armazenadas para a quantificação da lignina solúvel e carboidratos. Os sólidos retidos foram lavados com 150 mL de água destilada e secos em estufa (60 °C) até peso constante.

Na etapa de análise da composição do bagaço (fibra insolúvel), os açúcares monoméricos quantificados em cada amostra foram expressos como celulose, calculada a partir da glicose, e hemicelulose, calculada a partir da xilose. Foram utilizados os fatores de correção de 0,9 para celulose e 0,88 para hemicelulose.

Para a determinação de lignina presente na fibra insolúvel do bagaço, foi utilizado um método espectrofotométrico descrito por Sluiter et al., (2008a). O

material seco foi submetido a um fracionamento utilizando ácido sulfúrico concentrado, a lignina solúvel foi detectada no comprimento de onda de 240 nm e a quantificação da lignina insolúvel foi feita pela determinação da amostra retida no papel de filtro.

As quantificações da lignina insolúvel e solúvel foram feitas pelas equações 1 e 2 respectivamente. Para a determinação de lignina utilizou-se a amostra livre de umidade.

Lignina insolúvel :

$$\%LI = \frac{\text{cinza (g)}}{\text{amostra (g)}} \times 100 \quad (1)$$

Lignina solúvel :

$$\%LS = \frac{\text{Abs UV} \times \text{Volume (filtrado)} \times \text{Diluição}}{\epsilon \times \text{amostra(g)}} \times 100 \quad (2)$$

Abs UV= absorvância da amostra em 240 nm

Volume (filtrado)= volume do líquido de hidrólise

Diluição= diluição da amostra para a leitura em UV

ϵ = absorvância da amostra em um comprimento de onda específico (240 nm)

3.5 Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado (Sacarificação)

Para avaliar a eficiência dos métodos de pré-tratamentos e verificar a interferência de cada parâmetro estudado, foram realizadas hidrólises enzimáticas para cada uma das amostras do bagaço pré-tratado (fibra insolúvel). Seguindo a metodologia descrita por Sluiter et al., (2008b) foi utilizado um coquetel enzimático comercial nas condições ótimas de temperatura e pH para a atuação das celulasas.

A quantidade de 0,1 grama do material foi hidrolisado com 5 mL de tampão citrato (0,05 mol/L pH 5) e 5 mL de água, contendo uma carga de FPase de 15 U/g e de β -glicosidase de 75U/g de biomassa, com o pH ajustado para 4,8 em erlenmeyers de 25mL com agitação de 150rpm a 50°C. Foram preparados frascos individualizados para cada tempo de hidrólise (0h, 12h, 24h, 48h e 72h). Após este

tempo, o líquido foi fervido para a desativação das enzimas e os açúcares liberados foram quantificados pelos métodos de DNS, descrito por Miller (1959), e pelo método enzimático GOD-PAP, descrito por Henry et al., (1974).

A porcentagem de digestão da celulose foi calculada como mostrado na equação 3, descrita por Sluiter et al., (2008b).

$$\% \text{ Digestão} = \frac{\text{gramas de celulose digerida}}{\text{gramas de celulose de partida}} \times 100 \quad (3)$$

3.5.1 Determinação da atividade enzimática

Neste trabalho foi utilizada a enzima comercial Accelerase 1500, produzida de uma linhagem geneticamente modificada de *Trichoderma reesei* e gentilmente cedida por Genencor®. Este coquetel enzimático passou por um tratamento de clarificação para obter um extrato mais limpo (livre de polissacarídeos e resíduos) e também menos viscoso. Para isto, foi adicionado terra diatomácea ao coquetel enzimático (4g/100mL) e a solução foi agitada cuidadosamente, sendo mantida por 12 horas em temperatura de 5 a 10 °C. Após esse período a solução foi submetida a uma centrifugação de 4000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi recolhido e procedeu-se a dosagem das enzimas celulolíticas, como descrito abaixo.

A atividade da FPase (celulase total) foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando-se como substrato papel de filtro Whatman nº 1. Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato de sódio 0,05 mol/L pH 5, uma fita de papel de filtro Whatman nº 1 (1x6 cm) e 0,5 mL do extrato enzimático. As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 60 minutos a 50°C sob agitação, também foram preparados os tubos controle, branco da enzima (sem substrato) e branco do substrato (sem enzima). Após este período, adicionou-se 3,0 mL do reagente DNS nos respectivos tubos e estes foram transferidos para banho de água fervente por 5 minutos. Em seguida, foram transferidos para banho de gelo para resfriamento, e a quantidade de ART foi determinada pela medida da absorbância a 540 nm, com coeficiente de absorvidade de 1,4187 mL.mg⁻¹.cm⁻¹. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto a 50 °C.

A atividade de β -glicosidase foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Ghose (1987), utilizando-se como substrato celobiose (solução de 15 mM) em 0,05 M de tampão citrato. Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL de tampão citrato (pH 5) de sódio 0,05M com o substrato (celobiose) e 0,5 mL do extrato enzimático, também foram preparados os tubos controle, branco da enzima (sem substrato) e branco do substrato (sem enzima). As amostras foram agitadas em vórtex e incubadas por 30 minutos a 50 °C sob agitação. Após este período, retirou-se uma alíquota de cada tubo de ensaio e quantificou a glicose liberada pelo método GOD-PAP. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima capaz de liberar 1 μ mol de açúcar redutor por minuto a 50 °C.

Foi realizada a dosagem das enzimas celulolíticas antes e após o processo de clarificação do coquetel enzimático e não foi verificada alteração na atividade enzimática, apresentando atividade de 27 U/mL para a FPAse e de 135 U /mL para a β -glicosidase.

3.6 Planejamento de experimentos

Nesse trabalho foi realizado o planejamento fatorial completo com repetição, na etapa de pré-tratamento e sacarificação. Nesse tipo de planejamento foram feitas todas as combinações possíveis entre as duas variáveis do processo, o tempo do pré-tratamento (7, 30 e 60 minutos) e o tipo de tratamento (alcalino ou hidrotérmico), totalizando um total de 24 experimentos para a etapa de pré-tratamento e 24 experimentos para a sacarificação.

Na etapa de otimização da sacarificação foi realizado um planejamento superfície resposta com o delineamento central composto do tipo face centrada.

Tabela 1-Matriz de planejamento para a etapa de pré-tratamento sacarificação.

Material	Tratamento	Tempo
IN	HID	7
IN	HID	30
IN	HID	60
IN	ALC	7
IN	ALC	30
IN	ALC	60
EXP	HID	7
EXP	HID	30
EXP	HID	60
EXP	ALC	7
EXP	ALC	30
EXP	ALC	60

Fonte: elaborado pelo autor

3.7 Análise estrutural dos bagaços pré-tratados por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Primeiramente as amostras dos materiais lignocelulósicos foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio (“stub”) e submetidas ao recobrimento metálico de 10 nm de ouro em um metalizador. As fotomicrografias foram obtidas em um equipamento da marca TOP COM SM 300 a uma potência de feixe de elétrons de 20 kV.

3.8 Análise estatística

Foi utilizada análise de variância (ANOVA) para avaliar os efeitos dos fatores estudados na composição do material e na eficiência da hidrólise enzimática, utilizando um nível de confiança de 95%. Foi utilizado o programa computacional Minitab 15.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Antes de realizar os experimentos de pré-tratamento, foi analisada a composição do bagaço de cana-de-açúcar (BCA), *in natura* e explodido, em relação ao teor de celulose, hemicelulose e lignina.

Tabela 2- Composição dos materiais utilizados como controle: BCA *in natura* (IN) e BCA explodido (EXP).

	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Controle EXP	55,92 $\pm$ 0,66	19,84 $\pm$ 0,33	24,71 $\pm$ 0,59
Controle IN	44,49 $\pm$ 1,33	32,77 $\pm$ 2,2	23,77 $\pm$ 0,33

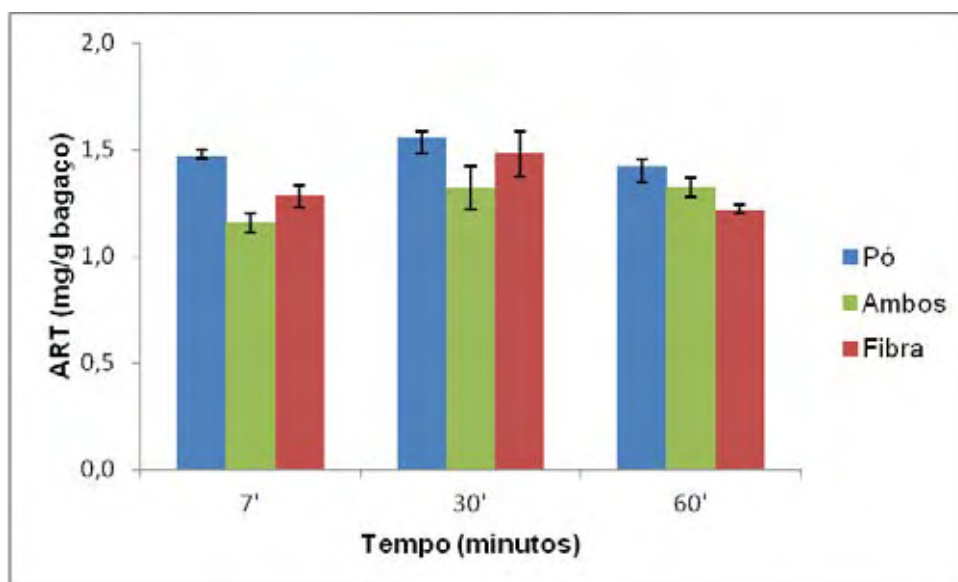
Fonte: elaborado pelo autor

A partir dos resultados da tabela 2 verifica-se que no BCA explodido ocorreu uma solubilização de 39% da hemicelulose e um aumento de 26% da porcentagem de celulose, em comparação com o BCA *in natura*. O aumento do teor celulósico no BCA explodido é devido ao pré-tratamento de explosão a vapor que solubiliza parte da hemicelulose, ou seja, considerando a mesma massa de BCA para ambos os materiais, a quantidade de celulose será maior para o BCA explodido em comparação com o BCA *in natura*. Os valores obtidos para a composição do BCA são semelhantes àqueles encontrados na literatura (PANDEY et al., 2000; ROCHA et al., 2012).

4.2 Pré-tratamento do bagaço *in natura*

Primeiramente foi analisado o efeito do pré-tratamento alcalino no BCA de diferentes granulometrias (pó, fibra e ambos), por meio da quantidade de açúcares redutores totais (ART) liberados no filtrado, água de lavagem do bagaço pré-tratado. Essa análise permitiu avaliar a degradação do material de diferentes granulometrias perante as condições de pré-tratamento testadas.

Figura 15- Açúcares redutores totais (ART) liberados no filtrado do pré-tratamento com Ca(OH)_2 , a 120 °C para os tempos de 7, 30 e 60 minutos, do BCA *in natura* separado em três granulometrias (pó, fibra e ambos).



Fonte: elaborado pelo autor

Observa-se na figura 15 que a quantidade de açúcar redutor total (ART) liberada ficou entre 1,1 e 1,5 mg/g de BCA, para todos os tempos testados nas diferentes granulometrias do material. Esses resultados mostram que a diferença de ART liberada nos três materiais foi muito pequena, isso favorece a utilização do BCA denominado “ambos” (contendo pó + fibras), pelo fato de eliminar uma etapa do processo, que é a separação do material em diferentes granulometrias.

The Texas A&M (1997) testaram o pré-tratamento alcalino no BCA com diferentes granulometrias e não observaram diferenças no rendimento final do processo. Rabelo, Maciel Filho e Costa (2008) também estudaram o BCA pré-tratado, peneirado e não peneirado, com Ca(OH)_2 em temperaturas de 20 a 70 °C nos períodos de 6 a 36 horas e não observaram diferenças no rendimento final.

Com o objetivo de analisar o efeito do pré-tratamento na composição da fibra insolúvel do BCA *in natura*, foram determinados os teores de celulose, hemicelulose e lignina no material após os pré-tratamentos hidrotérmico e alcalino (Tabela 3).

Tabela 3- Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina para o BCA *in natura*, após os pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120 °C.

	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
IN ALC 7	44,98 ± 0,45	35,33 ± 0,60	19,02 ± 0,28
IN HID 7	44,26 ± 1,63	33,08 ± 0,48	24,28 ± 0,26
IN ALC 30	49,55 ± 1,27	31,23 ± 1,17	19,49 ± 0,75
IN HID 30	43,81 ± 0,33	31,75 ± 0,12	23,96 ± 0,68
IN ALC 60	49,56 ± 0,12	31,86 ± 0,25	16,70 ± 0,52
IN HID 60	43,11 ± 0,97	30,48 ± 2,13	23,74 ± 0,33
Controle IN	44,49 ± 1,33	32,77 ± 2,25	23,77 ± 0,30

Fonte: elaborado pelo autor

Para a fração celulósica observou-se um aumento da massa de 11% para o tratamento alcalino no tempo de 30 e 60 minutos quando comparado ao controle. Para o pré-tratamento hidrotérmico não se observou alteração do teor de celulose em nenhuma das condições testadas. Esse aumento no teor celulósico no pré-tratamento alcalino, pode ser explicado pela solubilização da lignina (18 a 30%) devido a utilização do hidróxido de cálcio, ou seja, considerando a mesma massa de BCA para ambos os pré-tratamentos, a quantidade de celulose será maior para o BCA tratado com álcali em comparação com o BCA submetido ao tratamento hidrotérmico. Chang, Nagwani e Holtzaple (1998) também obtiveram um aumento na porcentagem de celulose de 6,5%, para as mesmas condições de tratamento alcalino desse trabalho no tempo de 60 minutos, usando um BCA com granulometria abaixo de 0,4 mm. Os resultados mostraram que o tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ não degrada a fração celulósica, ou seja, ocorre um maior aproveitamento da biomassa e favorece a etapa de sacarificação.

Verifica-se que houve uma menor solubilização da fração hemicelulósica de 3% e 5% para o tratamento alcalino e de 3% e 7% para o hidrotérmico, respectivamente nos tempos de 30 e 60 minutos. Segundo Hendriks e Zeeman (2009) e Chang et al., (2001), o tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ tem pouco efeito sobre a solubilização da fração hemicelulósica, porém esse tratamento favorece a remoção de grupos acetil e ácidos urônicos da hemicelulose o que facilita o acesso das enzimas às fibras de celulose e também à fração hemicelulósica.

Comparando a porcentagem de lignina entre os BCAs pré-tratados e o controle, verifica-se que a solubilização da lignina variou de 18 a 30% para o pré-tratamento alcalino, sendo que para o pré-tratamento hidrotérmico não houve solubilização. Wang e Cheng (2011) estudaram o efeito do pré-tratamento alcalino em uma espécie de gramínea (*Coastal Bermudagrass*) usando diferentes concentrações de Ca(OH)_2 (0,02 a 0,2 g/g biomassa) e obtiveram uma deslignificação entre 10 e 20% para as temperaturas entre 21 e 121 °C nos tempos de 15, 30 e 60 minutos.

The Texas A&M (1997) estudaram o efeito do pré-tratamento alcalino no BCA (com granulometria menor de 0,4 mm), usando 0,1g Ca(OH)_2 /g BCA por 60 minutos a 120 °C e conseguiram uma deslignificação de somente 5%. Este resultado foi inferior ao obtido nesse trabalho para as mesmas condições ensaiadas.

O tratamento com Ca(OH)_2 resulta em uma solubilização de lignina inferior se comparado com outros álcalis (CHEN et al., 2007; KIM et al., 2003). A reduzida solubilização da lignina pode ocorrer devido à formação do complexo cálcio-lignina. Os íons de cálcio carregam duas cargas positivas que tendem a se ligar à lignina, que possui carga negativa em ambientes alcalinos devido à ionização de grupos funcionais (carboxyl, methoxyl e hidroxil), levando a formação de ligações que evitam uma maior solubilização da lignina (TORRE; RODRIGUEZ; SAURA-CALIXTO, 1992; XU et al., 2010).

Após a quantificação de celulose, hemicelulose e lignina do material pré-tratado, foram realizadas análises estatísticas (ANOVA- Análise de variância). Por meio dos resultados apresentados nas tabelas 3a, 3b e 3c, no apêndice, verificou-se que o tipo de tratamento e o tempo influenciaram significativamente a alteração do teor de celulose e lignina, com o p-valor menor que 0,05. E somente a variável tempo influenciou significativamente a alteração do teor de hemicelulose.

Os resultados do BCA *in natura* mostraram que a utilização do Ca(OH)_2 acarretou no aumento da fração celulósica e na solubilização de parte da lignina. Observou-se também que o aumento do tempo de pré-tratamento aumenta a solubilização da hemicelulose e intensifica a alteração dos teores das frações constituintes do material.

4.3 Pré-tratamento do bagaço explodido

Com o objetivo de avaliar o efeito do pré-tratamento alcalino no BCA submetido a um pré-tratamento físico, foi escolhido o bagaço explodido. Esta análise foi feita pela quantificação do teor de celulose, hemicelulose e lignina da fibra insolúvel do material, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Porcentagem de celulose, hemicelulose e lignina para o BCA explodido, após os pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120 °C.

	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
EXP ALC 7	57,12 ± 1,56	18,81 ± 0,11	24,17 ± 0,60
EXP HID 7	55,81 ± 0,74	19,66 ± 1,30	24,50 ± 0,21
EXP ALC 30	56,42 ± 1,12	19,84 ± 0,05	23,44 ± 0,61
EXP HID 30	57,46 ± 1,89	18,11 ± 0,92	24,07 ± 1,04
EXP ALC 60	57,62 ± 3,27	16,11 ± 0,57	24,53 ± 1,87
EXP HID 60	58,23 ± 1,97	17,60 ± 0,21	23,82 ± 1,12
Controle EXP	55,92 ± 0,66	19,84 ± 0,33	24,71 ± 0,59

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os resultados apresentados nesse trabalho, para o BCA explodido, constatou-se que somente a fração hemicelulósica foi solubilizada nas condições de pré-tratamento testadas, sendo que o tempo de 60 minutos foi o que atingiu maior solubilização: 11% para o tratamento hidrotérmico e 19% para o alcalino. De acordo com Girio et al., (2010) e Ramos (2003) durante o pré-tratamento de explosão a vapor ocorre a modificação e redistribuição da lignina e alta solubilização da hemicelulose.

As análises de variância (ANOVA) dos resultados mostraram que não houve diferenças significativas nos teores de celulose e lignina, enquanto que para a hemicelulose o tempo influenciou significativamente, ocorrendo uma maior solubilização do material no tratamento alcalino de 60 minutos. Como apresentado nas tabelas 4a, 4b e 4c, no apêndice.

Para o BCA explodido a utilização do Ca(OH)_2 não alterou a composição do material em relação a porcentagem de celulose e lignina, porém obteve-se uma maior solubilização da fração hemicelulósica em função do tempo de pré-tratamento dos BCAs.

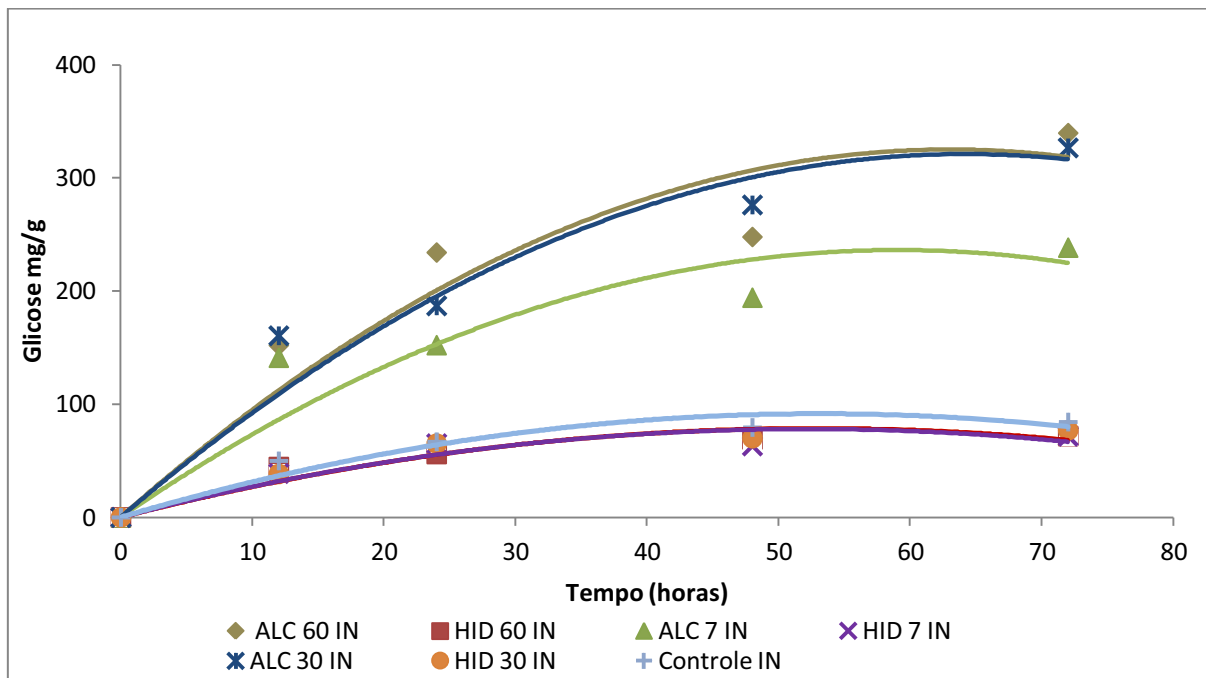
4.4 Hidrólise enzimática dos bagaços pré-tratados

A eficácia de um pré-tratamento é relatada, frequentemente, em termos de rendimento glicosídico após sacarificação, e não apenas em termos de composição química e das características físicas da biomassa. Assim, para avaliar os efeitos dos pré-tratamentos na acessibilidade das enzimas, foram construídos perfis de hidrólise, para cada uma das amostras, nas condições ótimas de temperatura e pH da enzima, com a finalidade de quantificar a glicose liberada.

A figura 16 mostra o perfil de hidrólise enzimática do BCA *in natura* e verifica-se uma maior liberação de glicose, para o pré-tratamento alcalino comparado ao pré-tratamento hidrotérmico, considerando 24 h de hidrólise, a glicose liberada foi proporcional ao tempo de pré-tratamento (7, 30 e 60 minutos). Também pode-se verificar que a hidrólise do BCA sem pré-tratamento (controle) liberou aproximadamente a mesma quantidade de glicose que a hidrólise do BCA submetido ao tratamento hidrotérmico, ou seja, as condições de tempo e temperatura utilizadas no pré-tratamento hidrotérmico não foram suficientes para aumentar a acessibilidade do material às enzimas celulolíticas.

A figura 17 mostra o perfil de hidrólise enzimática para o BCA explodido e verifica-se o mesmo comportamento obtido para o BCA *in natura*, ou seja, uma maior liberação de glicose para o pré-tratamento alcalino comparado ao pré-tratamento hidrotérmico. Também pode-se verificar que a hidrólise do BCA sem pré-tratamento (controle) liberou uma maior quantidade de glicose que a hidrólise do BCA submetido ao tratamento hidrotérmico, ou seja, as condições de tempo e temperatura utilizadas no pré-tratamento hidrotérmico podem ter provocado alterações no material que dificultaram o acesso das enzimas celulolíticas ao substrato.

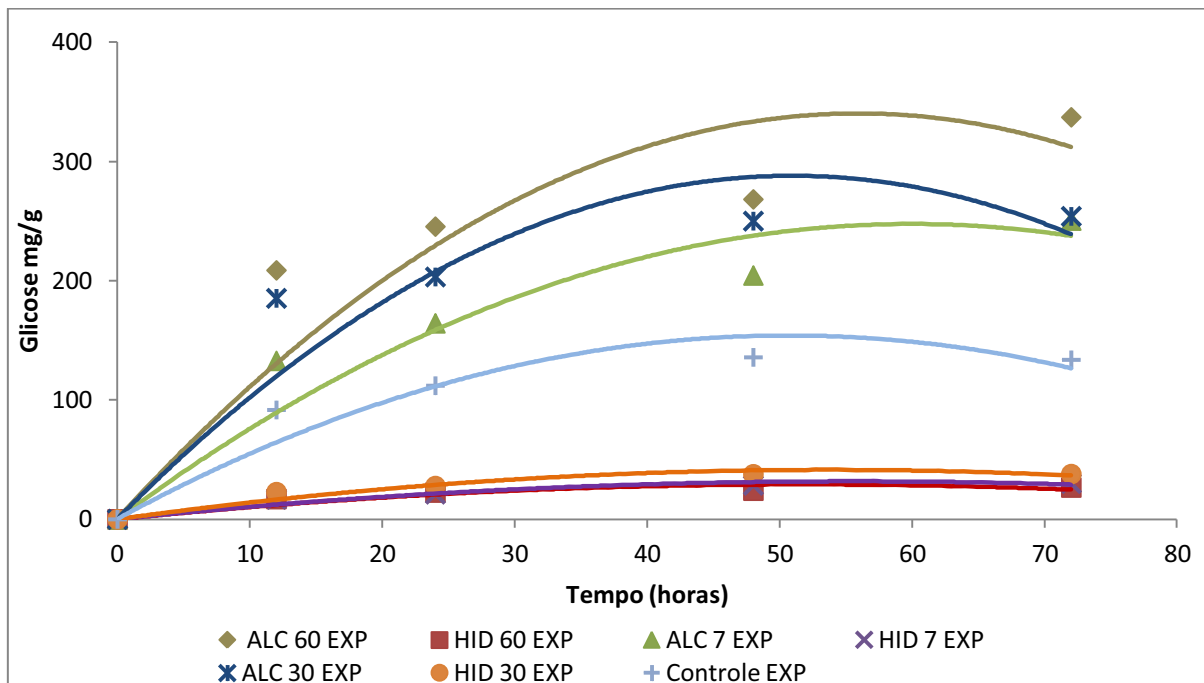
Figura 16- Liberação de glicose após hidrólise enzimática do BCA *in natura* submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120 °C.



Fonte: elaborado pelo autor

Verifica-se pelo perfil de hidrólise do bagaço *in natura* e explodido (figura 16 e 17), que a primeira fase é rápida (12h) e à medida que aumenta o tempo de hidrólise ocorre pouca variação na glicose liberada, indicando o equilíbrio da reação enzimática. Esse comportamento é característico da cinética enzimática, no entanto alguns fatores podem interferir na reação, como: o acúmulo de glicose no meio (produto final) que pode causar um efeito repressor, o aumento das ligações improdutivas da enzima, a perda da atividade enzimática e a dificuldade de acesso das enzimas ao substrato devido ao aumento do teor de celulose cristalina (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; JØRGENSEN; KRISTENSEN; FELBY, 2007).

Figura 17- Liberação de glicose após hidrólise enzimática do BCA explodido, submetido aos pré-tratamentos hidrotérmico (HID) e alcalino (ALC) nos tempos de 7, 30 e 60 minutos a 120 °C.



Fonte: elaborado pelo autor

Para avaliar o efeito do pré-tratamento no acesso das enzimas celulolíticas nos bagaços *in natura* e explodido, foi quantificada a concentração de glicose, de açúcares redutores totais (ART) e também a porcentagem de digestão da celulose após 72 horas de hidrólise enzimática. As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados dos diferentes parâmetros analisados.

Tabela 5- Hidrólise enzimática (72 h) do BCA *in natura* submetido aos pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) nos tempo de 7, 30 e 60 minutos e os respectivos resultados de liberação de açúcares redutores totais (ART), glicose e porcentagem de digestão de celulose.

Tratamento	ART (mg/g BCA)	Glicose (mg/g BCA)	Digestão (%)
IN ALC 7	339,60 ± 8,38	255,60 ± 12,77	52,16 ± 0,17
IN ALC 30	394,69 ± 11,08	320,48 ± 13,03	57,09 ± 1,19
IN ALC 60	387,59 ± 15,87	384,29 ± 13,02	70,46 ± 0,25
IN HID 7	86,07 ± 6,10	83,05 ± 1,15	16,79 ± 0,01
IN HID 30	104,69 ± 18,44	97,70 ± 12,85	19,30 ± 3,08
IN HID 60	95,52 ± 7,38	101,53 ± 10,47	21,20 ± 1,45

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 6- Hidrólise enzimática (72 h) do BCA explodido submetido aos pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) nos tempo de 7, 30 e 60 minutos e os respectivos resultados de liberação de açúcares redutores totais (ART), glicose e porcentagem de digestão de celulose.

Tratamento	ART (mg/g BCA)	Glicose (mg/g BCA)	Digestão (%)
EXP ALC 7	249,92 ± 21,54	248,63 ± 11,51	37,79 ± 1,68
EXP ALC 30	290,01 ± 11,52	247,21 ± 6,16	39,44 ± 0,53
EXP ALC 60	319,67 ± 14,51	313,50 ± 8,85	48,97 ± 1,44
EXP HID 7	174,78 ± 12,20	183,40 ± 10,16	32,56 ± 2,26
EXP HID 30	223,58 ± 26,76	250,28 ± 12,14	37,35 ± 1,35
EXP HID 60	238,01 ± 18,68	210,70 ± 18,62	32,56 ± 2,25

Fonte: elaborado pelo autor

De acordo com as tabelas 5 e 6, os resultados mostram que o pré-tratamento alcalino em ambos os materiais (BCA *in natura* e explodido), possibilita uma maior ação das enzimas, liberando uma quantidade maior de ART e glicose, comparado com o pré-tratamento hidrotérmico em todos os tempos (7, 30 e 60 minutos).

Verifica-se que a quantidade de açúcares redutores totais (ART) e glicose liberada na hidrólise enzimática são muito semelhantes em todas as condições testadas tanto para o BCA *in natura* como para o BCA explodido, indicando que as enzimas adicionadas no processo atuaram principalmente na celulose e converteram os oligossacarídeos formados, durante 72 horas de hidrólise, em glicose. Também podemos observar nessas tabelas, que no BCA *in natura* submetido ao pré-tratamento alcalino, a porcentagem de digestão de celulose variou de 52% a 70% enquanto que para o BCA explodido pré-tratado com álcali, a variação ficou em torno de 33% a 37%. Uma explicação para o aumento da hidrólise no BCA *in natura*, tratado com Ca(OH)_2 , pode ser a quebra das ligações da lignina-carboidrato e/ou a remoção de parte da lignina.

Outro fator que também influenciou a hidrólise enzimática do BCA é o tempo de pré-tratamento alcalino e hidrotérmico (7, 30 e 60 minutos), constatou-se que o aumento dessa variável resulta em uma maior liberação de açúcares e consequentemente um aumento da digestão da celulose.

Rabelo, Maciel Filho e Costa (2008) obtiveram uma taxa de digestão da celulose de 36% no BCA *in natura* pré-tratado com 0,1 g Ca(OH)_2 /g BCA a 70 °C por 12 horas. No presente trabalho a porcentagem de digestão da celulose foi maior, 52% para o BCA *in natura* pré-tratado com a mesma carga de Ca(OH)_2 por 7 minutos a 120 °C.

Chang, Nagwany e Holtzaple (1998) submeteram o BCA (peneirado) a um pré-tratamento com 0,1g Ca(OH)_2 /g BCA a 120 °C por 1 hora e obtiveram uma produção de glicose de 300 mg/g BCA após uma hidrólise de 72 horas com a carga de 5 FPU/g BCA. Comparado ao presente trabalho, o rendimento em glicose foi muito semelhante (320 mg/g BCA) usando BCA *in natura* pré-tratado com a mesma carga de Ca(OH)_2 e temperatura por um tempo menor de pré-tratamento (30 minutos), porém com uma carga enzimática de 15 FPU/g BCA na hidrólise de 72 horas.

Não há estudos na literatura usando o BCA submetido à explosão a vapor e tratado com Ca(OH)_2 . Silva et al., (2011) avaliaram o BCA explodido e deslignificado com NaOH 1% (m/v) a 100 °C por 1 h e conseguiram 89% de digestão da celulose. Esse trabalho obteve 49% de digestão de celulose para o BCA explodido submetido a uma deslignificação alcalina com Ca(OH)_2 a 1% (m/v) a 120 °C por 1 h, porém

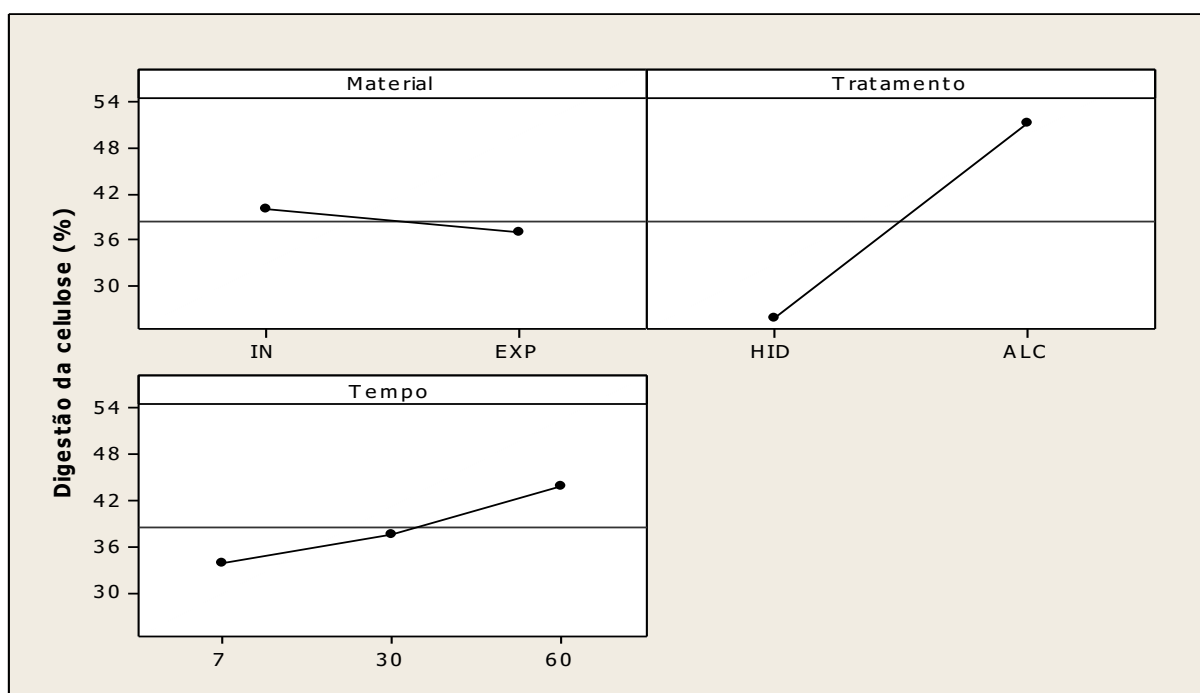
obteve 70% de digestão de celulose para o BCA *in natura* submetido as mesmas condições de deslignificação.

Foram feitas análises estatísticas para o estudo das diferentes condições de pré-tratamento na digestão da celulose. Para melhor entendimento da efetividade das variáveis testadas no processo, foram analisadas todas as condições de pré-tratamento e considerada como resposta a porcentagem de digestão de celulose. A partir dos resultados apresentados na tabela 8 (no apêndice), verifica-se que todas as variáveis estudadas e suas interações são estatisticamente significativas, ou seja, interferem na quantidade de açúcares liberada no processo de hidrólise enzimática.

A figura 18 apresenta o gráfico dos principais efeitos dos fatores estudados, ao analisar esse gráfico verifica-se que quanto mais afastados do ponto médio maior a influência dos fatores.

Pela análise da figura 18 foi possível observar que para ambos os BCAs estudados o uso do Ca(OH)_2 tem um efeito de grande magnitude na digestão da celulose. Também se verifica que o aumento do tempo de pré-tratamento promove o aumento da hidrólise enzimática e o BCA *in natura* atinge maior porcentagem de digestão da celulose do que o BCA explodido.

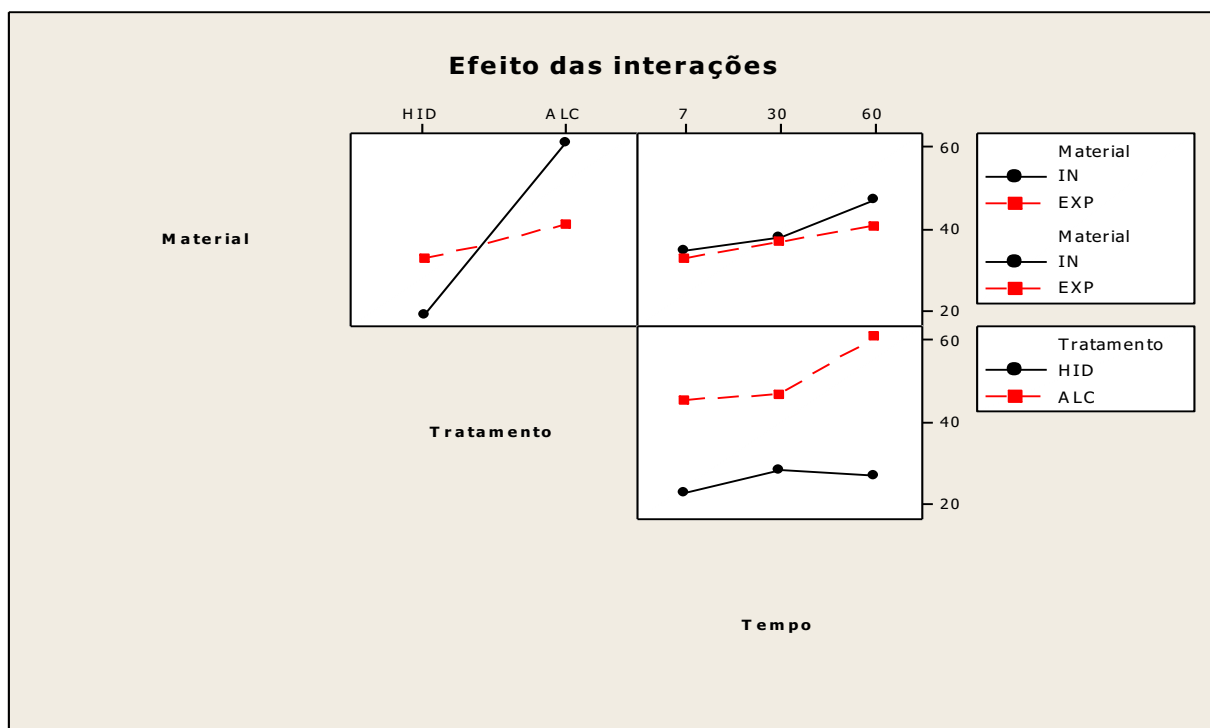
Figura 18- Principais efeitos sobre a porcentagem de digestão da celulose.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A figura 19 apresenta o gráfico que analisa as interações entre os fatores estudados. Para analisar os gráficos é importante salientar que existe interação, quando o efeito de uma variável independente sobre a variável resposta depende do valor (nível) de alguma outra incluída no delineamento experimental. Em outras palavras, o teste de interação dá ênfase na questão de se o efeito de um fator é o mesmo para cada nível do outro fator, ou se o efeito de um fator não é o mesmo para cada nível do outro fator. Portanto, quando as linhas estão paralelas, indica que não houve interação entre os fatores observados. Pela análise desta figura, verificou-se que há interação entre os fatores estudados, resultado que está de acordo com a análise de variância apresentada na tabela 8, no apêndice.

Figura 19 – Efeito das interações sobre a variável de resposta porcentagem de digestão da celulose.



Fonte: elaborado pelo autor

O efeito de interação mais pronunciado ocorreu entre o material e o tratamento, ou seja, a utilização do Ca(OH)_2 no BCA *in natura* resultou em maiores

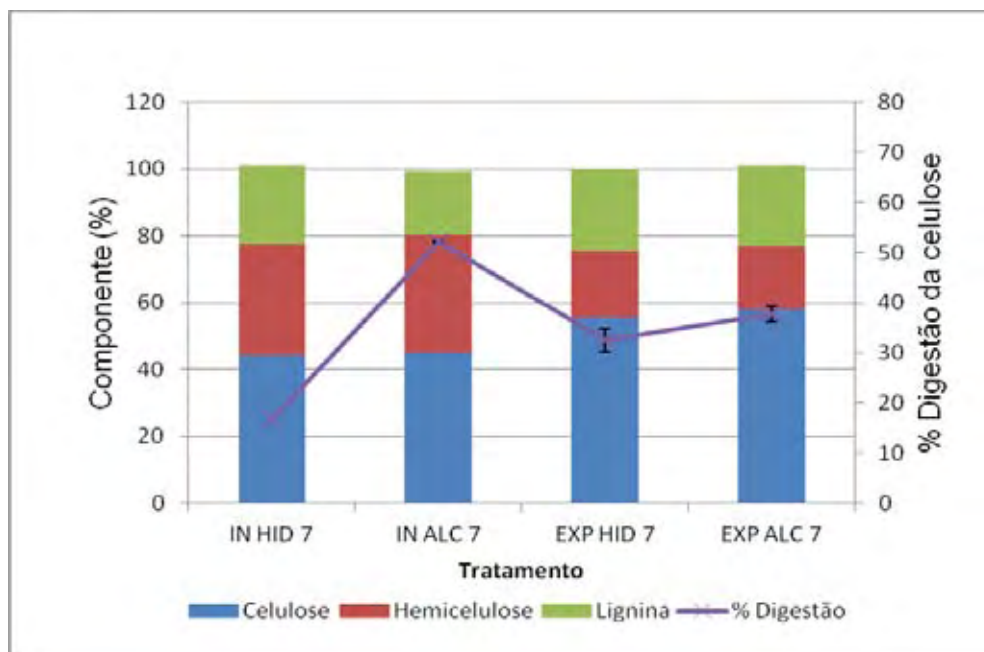
resultados de digestão da celulose. Ao analisar a interação do tempo com o material, constatou-se que somente o tempo de 60 minutos apresentou valores diferentes de digestão em ambos os materiais, apresentando melhor resultado para o BCA *in natura*. Com relação à interação entre o tratamento e o tempo, verificou-se que o tratamento alcalino atingiu maior porcentagem de digestão da celulose que o hidrotérmico, sendo que os melhores tempos foram 30 e 60 minutos respectivamente para os tratamentos alcalino e hidrotérmico.

4.5 Efeito da composição do material na hidrólise enzimática

As diferentes estratégias de pré-tratamento disponíveis atualmente variam com relação ao pH, temperatura e tempo de pré-tratamento. Essas variações nas condições afetam a severidade do pré-tratamento e a composição da biomassa, resultando em diferentes taxas de hidrólise enzimática.

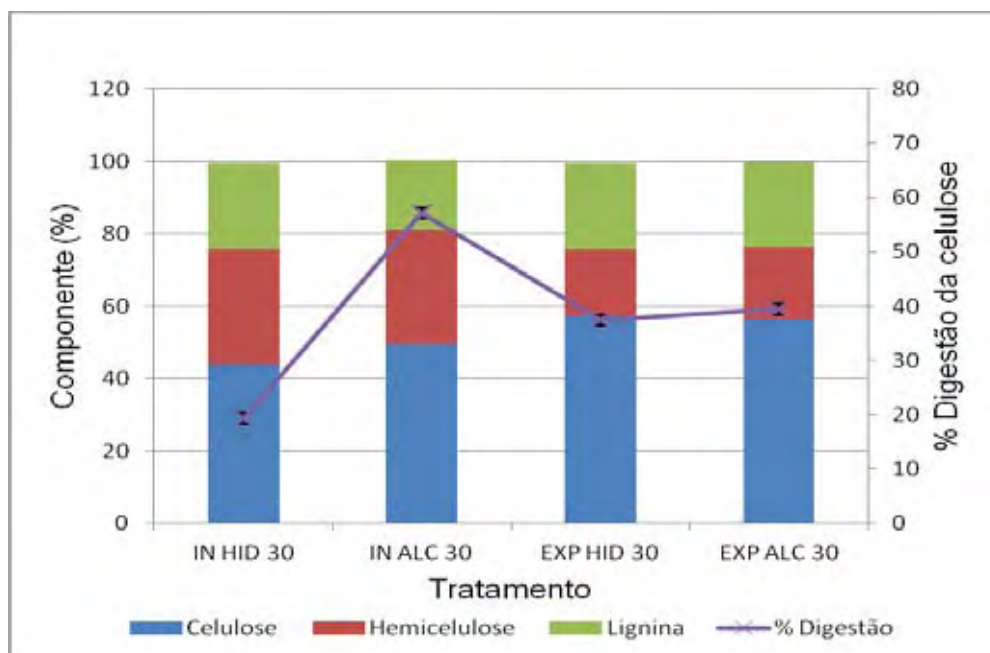
As figuras 20, 21 e 22 apresentam a análise composicional dos BCAs (*in natura* e explodido) submetido ao pré-tratamento alcalino e hidrotérmico nos tempos de 7, 30 e 60 minutos e a porcentagem de digestão da celulose para cada amostra.

Figura 20- Análise composicional para o BCA *in natura* (IN) e explodido (EXP), para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 7 minutos.



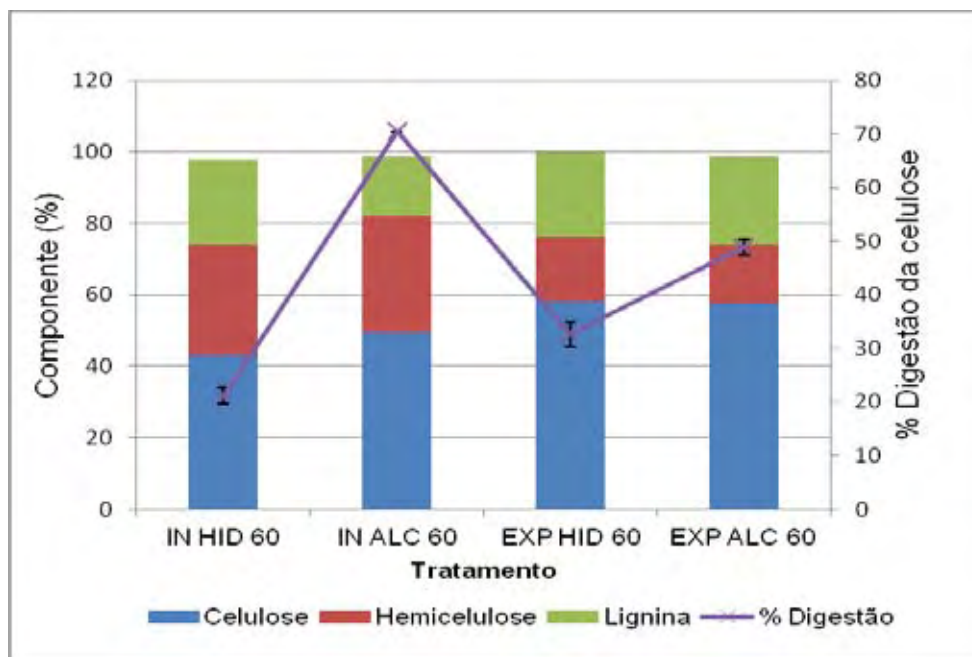
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 21- Análise composicional para o BCA *in natura* (IN) e explodido (EXP), para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 30 minutos.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 22- Análise composicional para o BCA *in natura* (IN) e explodido (EXP), para o pré-tratamento alcalino (ALC) e hidrotérmico (HID) no tempo de 60 minutos.



Fonte: elaborado pelo autor

A análise composicional da fibra insolúvel do bagaço *in natura* e explodido submetidos a todas as condições de pré-tratamentos mostrou o mesmo comportamento, verificou-se que a diminuição do teor de hemicelulose e lignina facilitou o acesso das enzimas ao substrato, aumentando a porcentagem de digestão da celulose (Figuras 20, 21 e 22). A maior porcentagem de digestão da celulose (70%) foi obtida no BCA *in natura* pré-tratado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ por 60 minutos, provavelmente devido a solubilização da lignina, a qual atingiu 18 a 30% de deslignificação para o BCA *in natura*, enquanto que para o BCA explodido a lignina não foi solubilizada.

Ramos (2003) descreve que a lignina é modificada durante o pré-tratamento de explosão a vapor, ocorrendo uma redistribuição dessa lignina nas fibras de celulose, esse processo ocasiona uma diminuição da acessibilidade das enzimas ao substrato.

Para o BCA *in natura*, o pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aumentou a porcentagem de digestão da celulose em todos os tempos testados, atingindo de 3 a

3,3 vezes de aumento comparado com o pré-tratamento hidrotérmico no mesmo material.

Para o BCA explodido, verifica-se que o pré-tratamento com álcali por 7 e 30 minutos não aumentou a porcentagem da hidrólise enzimática comparado ao pré-tratamento hidrotérmico, somente para o tempo de 60 minutos observa-se um aumento de 50% na digestão da celulose, o que pode estar relacionado com uma maior solubilização da hemicelulose (11 a 19%) observada no maior tempo de pré-tratamento. Para o BCA *in natura* foi obtida uma deslignificação de 17 a 30% pelo pré-tratamento alcalino e ocorreu um aumento de 3,2 a 4,3 vezes na digestibilidade da celulose quando comparado ao BCA *in natura* sem pré-tratamento (controle). Os resultados obtidos nesse trabalho estão de acordo com a literatura.

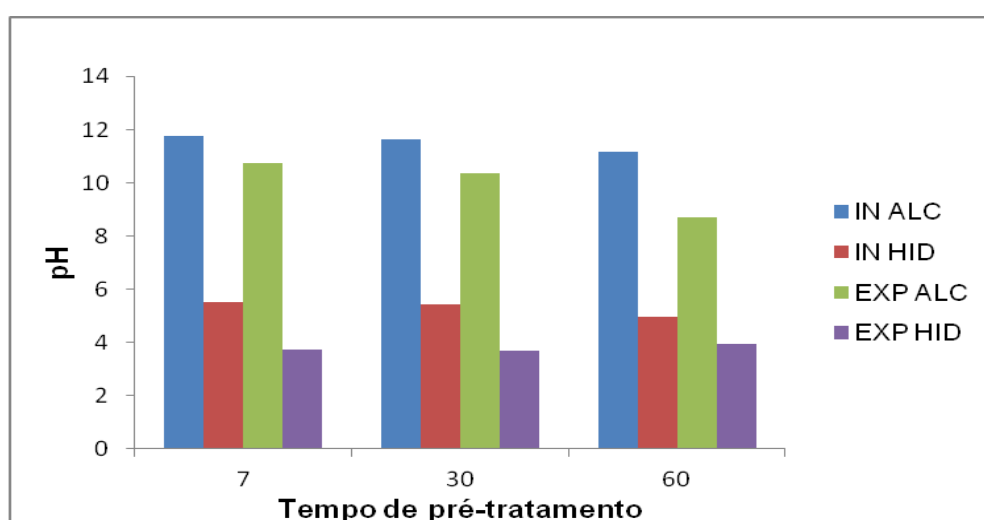
Chang et al., (2001) afirmaram que o aumento do rendimento da hidrólise enzimática é dependente da redução do conteúdo da lignina, esse componente atua como uma barreira e sua remoção facilita o acesso enzimático ao substrato. Também foi citado por Chang et al., (2001) que o grau de ruptura da celulose cristalina, ou seja, o aumento da porosidade do material influencia no maior rendimento da hidrólise enzimática. Xu et al., (2010) e Xu e Cheng, (2011), observaram que a maior digestibilidade do material lignocelulósico está relacionada com o aumento da porosidade ocasionada pelo pré-tratamento e que o tratamento com Ca(OH)_2 promove um aumento da porosidade da biomassa a medida que aumenta o tempo de pré-tratamento. Por outro lado Wang et al., (2011), trabalhando com uma espécie de gramínea (*Coastal Bermudagrass*), estudaram as diferenças dos pré-tratamentos utilizando NaOH e Ca(OH)_2 e mostraram que não é necessária uma grande remoção da lignina para aumentar a produção de açúcares.

Outro fator analisado foi o pH atingido pelos diferentes pré-tratamentos testados nesse trabalho (figura 23), verifica-se que o BCA explodido e *in natura* submetidos ao pré-tratamento hidrotérmico atingiram valores de pH entre 3,7 e 5,4 enquanto que o material pré-tratado com Ca(OH)_2 o pH ficou entre 8,7 a 11,75.

Observa-se que a redução de pH foi mais pronunciada no BCA explodido submetido ao pré-tratamento hidrotérmico. Segundo Mosier et al., (2005) o pré-tratamento de explosão a vapor e o pré tratamento hidrotérmico geram ácidos derivados de grupos acetil e outros presentes na hemicelulose. Nesse trabalho foi utilizado o BCA explodido e após a explosão a vapor esse material não foi lavado,

dessa maneira os ácidos gerados no processo ficaram retidos no bagaço. Ao realizar o pré-tratamento alcalino no BCA explodido, os ácidos acumulados diminuíram o pH da solução de hidróxido de cálcio, resultando em um pré-tratamento com uma capacidade inferior de solubilização da lignina.

Figura 23- Valores de pH após o pré-tratamento alcalino (ALC) ou hidrotérmico (HID), no BCA *in natura* (IN) e explodido (EXP).



Fonte: elaborado pelo autor

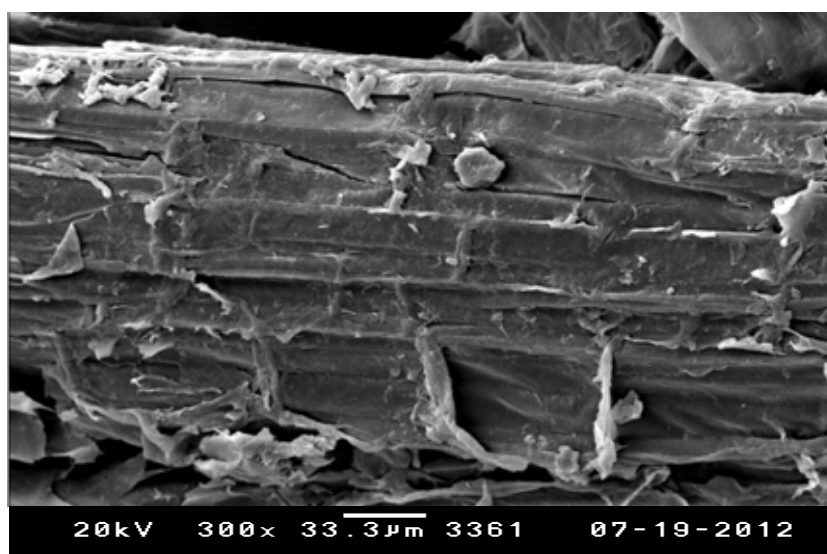
4.6 Análise estrutural do bagaço pré-tratado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram realizadas análises microscópicas (MEV) dos BCAs *in natura* e explodido (sem pré-tratamento e com pré-tratamento alcalino). Os resultados mostraram que a explosão promoveu uma fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico e a fragmentação foi intensificada quando esse material foi submetido ao pré-tratamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

A análise microscópica do BCA *in natura* sem pré-tratamento mostra que as fibras estão bem unidas, o mesmo BCA submetido ao pré-tratamento alcalino apresenta uma pequena fragmentação das fibras, no entanto essa desestruturação é inferior ao BCA explodido. Apesar de o BCA explodido ter uma alta fragmentação,

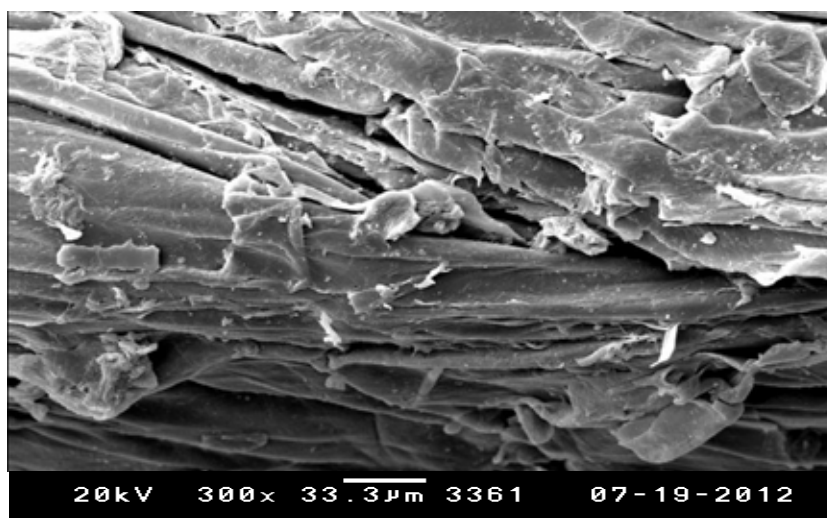
esse material atingiu resultados de hidrólise enzimática inferior ao BCA *in natura* submetido ao pré-tratamento alcalino, isso pode ser devido a redeposição ou repolimerização da lignina solubilizada durante a explosão a vapor, dificultando o acesso das enzimas ao substrato.

Figura 24 - Fotomicrografia do BCA *in natura* sem pré-tratamento.



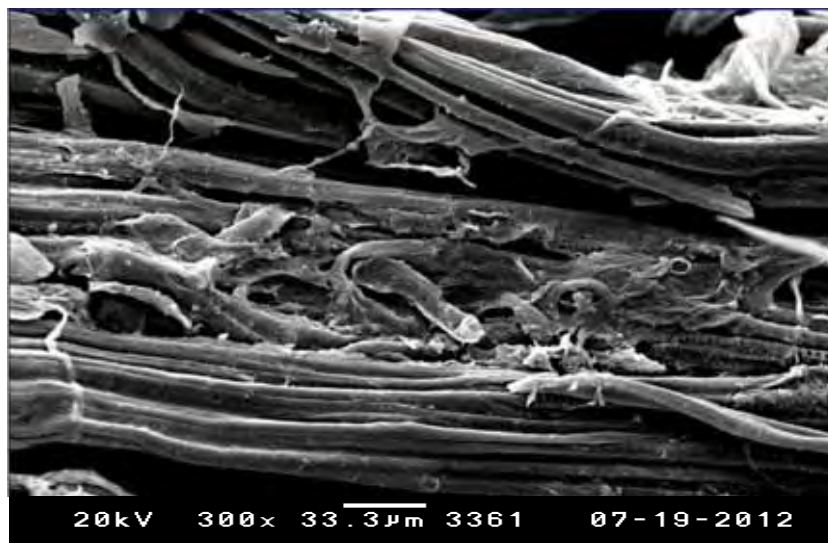
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 25 - Fotomicrografia do BCA explodido sem pré-tratamento.



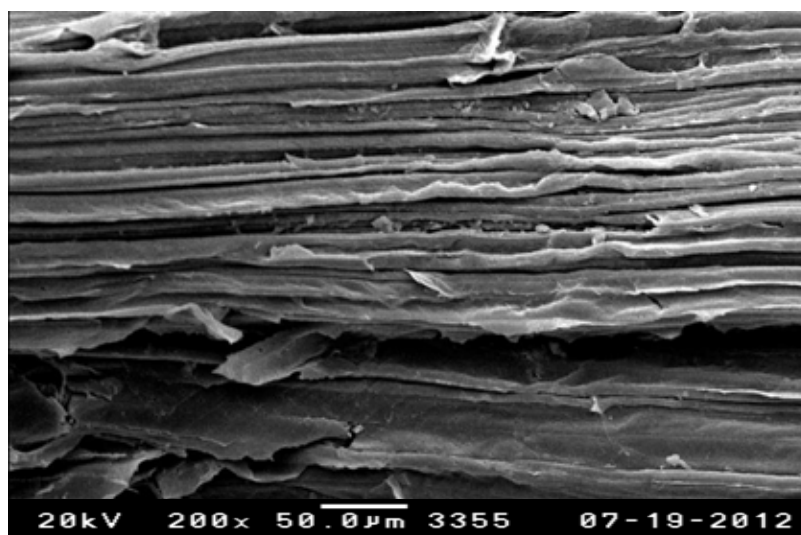
Fonte: elaborado pelo autor

Figura 26 - Fotomicrografia do BCA explodido com pré-tratamento alcalino por 60 minutos.



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 27 - Fotomicrografia do BCA *in natura* com pré-tratamento alcalino por 30 minutos.



Fonte: elaborado pelo autor

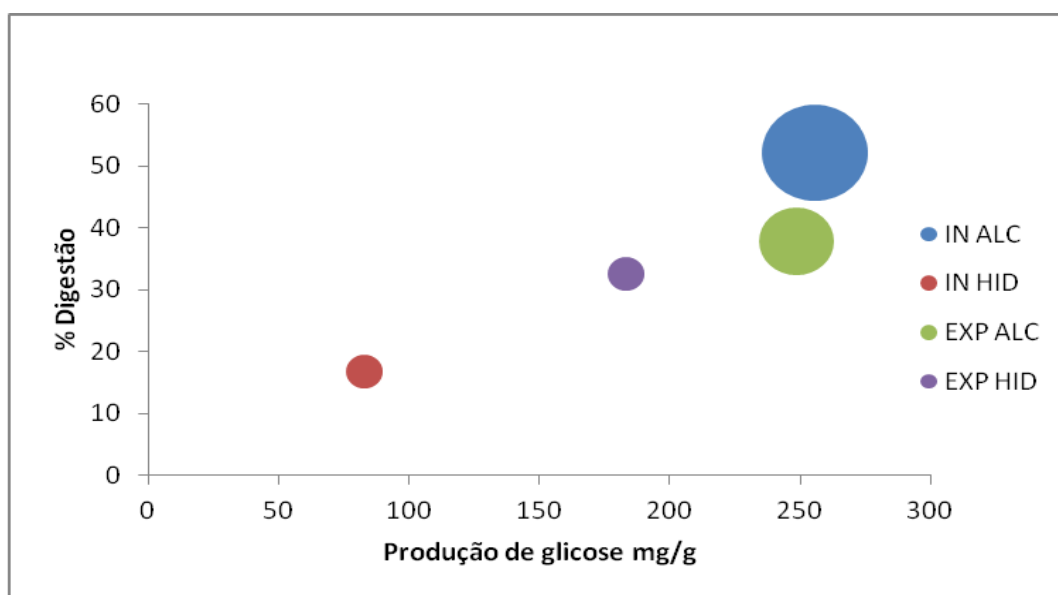
4.7 Avaliação do efeito sinérgico entre os pré-tratamentos

Por meio da análise dos parâmetros de porcentagem de digestão da celulose e liberação de glicose, foi construído um gráfico (figura 28) que mostra o efeito dos pré-tratamentos no BCA *in natura* e explodido. Os dados de todos os tempos

testados para os diferentes pré-tratamentos estão agrupados, sendo que a área de cada esfera expressa o efeito que o tempo tem sobre os parâmetros analisados.

Verifica-se que as maiores porcentagens da hidrólise enzimática foram obtidas para ambos os materiais pré-tratados com Ca(OH)_2 .

Figura 28- Avaliação do efeito dos pré-tratamentos nas diferentes formas do BCA.



Fonte: elaborado pelo autor

O efeito mais pronunciado do pré-tratamento com Ca(OH)_2 na hidrólise enzimática do BCA *in natura* pode estar relacionado com os teores dos componentes (celulose, hemicelulose e lignina) que formam o material e como eles estão organizados. Os resultados das análises composicionais (Tabelas 3 e 4), comparando o material sem pré-tratamento com o pré-tratado, mostraram que o BCA *in natura* é mais susceptível as alterações das frações constituintes quando submetido aos pré-tratamentos. Pode-se verificar pelos resultados obtidos nesse trabalho, que a utilização do Ca(OH)_2 no BCA *in natura* apresentou os melhores resultados de hidrólise enzimática em todos os tempos de pré-tratamento testados enquanto que para o pré-tratamento hidrotérmico o efeito do tempo foi pouco acentuado, ou seja, o tempo de pré-tratamento exerce uma maior influência na

presença do Ca(OH)_2 . O parâmetro tempo é muito importante para uma análise econômica do processo, ou seja, para avaliar se o aumento de glicose obtido na etapa de hidrólise enzimática compensa o gasto energético da utilização de tempos maiores de pré-tratamento.

O grande desafio para viabilizar a produção do etanol de segunda geração consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose a partir da hidrólise da celulose em termos de custo global. O uso do BCA *in natura* traz uma série de benefícios, como a aplicação integral da matéria-prima e a diminuição de uma operação unitária na etapa de hidrólise, o que simplifica o processo e resulta em redução de custos. E a utilização do Ca(OH)_2 comparado com outros álcalis oferece diversas vantagens, como menor preço que os outros álcalis, baixa toxicidade para o meio ambiente e a facilidade de tratamento e recuperação do resíduo.

4.8 Otimização da sacarificação

Com o intuito de determinar uma carga enzimática mínima capaz de levar a um alto rendimento de açúcares fermentescíveis foi feito um estudo sobre o efeito do uso do surfactante Tween 80 na sacarificação.

Tem sido reportado na literatura que a adição de surfactantes não-iônicos, particularmente Tween, melhoram efetivamente a atividade da celulase (CASTANON; WILKE, 1981; HELLE; DUFF; COOPER, 1993; KAYA; HEITMANN; JOYCE, 1995; PARK et al., 1992 apud KAAR; HOLTZAPPLE, 1998). Vários mecanismos tem sido propostos para explicar a ação benéfica da adição do surfactante durante o processo de hidrólise enzimática: (I) o surfactante altera a ultra-estrutura do substrato, tornando a celulose mais acessível para o ataque enzimático (HELLE et al., 1993); (II) o surfactante aumenta a estabilidade da enzima pela redução da desnaturação térmica ou mecânica (KAAR; HOLTZAPPLE, 1998; PARK et al., 1992); (III) o surfactante afeta a interação enzima-substrato, prevenindo a inativação das enzimas adsorvidas (HELLE; DUFF; COOPER, 1993; KAAR; HOLTZAPPLE, 1998; CASTANON; WILKER, 1981; ERIKSSON; ORJESSON; TJERNELD, 2002) e (IV) o surfactante previne a adsorção da enzima na lignina (ERIKSSON; ORJESSON; TJERNELD, 2002) apud MESA et al, 2010.

Em função dos resultados obtidos anteriormente, foi selecionado o BCA *in natura* pré-tratado com Ca(OH)_2 por 30 minutos. A sacarificação foi otimizada testando três níveis de carga (5, 10 e 15 FPU/g BCA) e três níveis de surfactante (0%, 5% e 10%), no período de 24 horas. A relação das cargas enzimática de celulase e β -glicosidase (1:5) foi mantida para as diferentes cargas de celulases estudadas. Foi escolhido o surfactante Tween pelo fato deste não ser tóxico, sendo adequado para o uso em processos biotecnológicos. Foi analisada somente a liberação de glicose, já que este carboidrato é utilizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol de segunda geração. A otimização foi realizada por meio de um planejamento experimental superfície resposta, utilizando o delineamento composto central face centrada (DCCF). Nesse delineamento os pontos axiais se encontram nos níveis intermediários dos fatores, com o valor de α (alfa) igual a 1. Os pontos axiais do planejamento experimental (ensaios de 1 a 6) foram realizados em duplicata.

A tabela 7 mostra as condições testadas para cada ensaio com a respectiva concentração de glicose e ART liberados.

Analisando a tabela 7 verifica-se que os maiores rendimentos de glicose foram obtidos no ponto central do planejamento, ou seja, os valores das variáveis estavam no ponto médio, que corresponde a uma carga enzimática de 10 FPU/g BCA e 5% de tween (g/g).

A partir das análises estatísticas dos dados referentes à liberação de glicose, verifica-se que o modelo quadrático é o que mais se ajusta aos dados e tem significância estatística ao nível de 95%, apresentando o menor valor-P (0,003). Como mostrado na tabela 10 (no apêndice) foi obtido um coeficiente de correlação (R^2) de 0,7, mostrando que 70% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta. As tabelas 10 e 11 (no apêndice), mostram a análise de variância (ANOVA) e os coeficientes regressão da equação. O modelo obtido não mostrou falta de ajuste, atingindo um p-valor de 0,744.

Tabela 7 - Matriz de planejamento apresentando os rendimentos de glicose e açúcares redutores (ART) após hidrólise do BCA *in natura* pré-tratado com Ca(OH)₂ por 30 minutos a 120 °C.

Ensaio	Carga FPU/g BCA pré-tratado	% Tween (g/g)	Glicose [Gli] mg/g BCA	Açúcar redutor [ART] mg/gBCA
1	5	0	193,44	216,82
2	15	0	225,82	274,06
3	5	10	242,60	317,95
4	15	10	283,25	342,47
5	5	5	280,42	410,68
6	15	5	294,72	469,75
7	10	0	239,81	311,08
8	10	10	260,45	521,60
9	10	5	285,26	428,22
10	10	5	345,06	404,09
11	10	5	307,71	455,86
12	10	5	356,40	422,72
13	10	5	347,10	516,79

Fonte: elaborado pelo autor

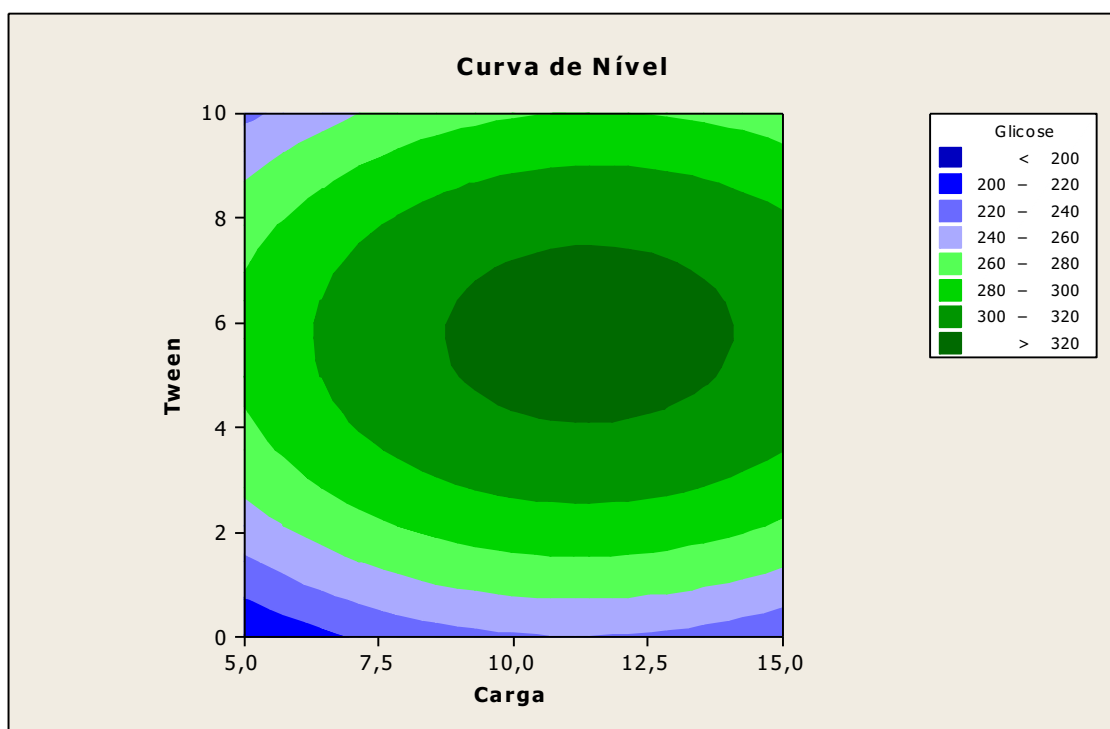
Com os valores do coeficiente de regressão pode-se estimar a equação 4 abaixo, onde a carga de enzima utilizada está representada como (C) e a concentração de surfactante como (S).

$$\begin{aligned} \text{Glicose (mg/g biomassa)} = & 107,36 + 23,46 (C) + 29,80 (S) - 1,048 (C)^2 \\ & - 2,657 (S)^2 + 0,083 (C.S) \end{aligned} \quad (4)$$

A partir desta equação foram construídos os gráficos de superfície de resposta (Figura 30) e curva de nível (Figura 29). A curva de nível mostra que a região central, com produção de glicose acima de 320 mg/g de BCA, foi obtida utilizando valores de celulase que variaram de 8,5 a 13,5 FPU/g de BCA e concentrações de tween de 4 a 7% (g/g). Estes resultados estão de acordo com os valores ótimos de carga enzimática (10 FPU/g BCA) e concentração de tween (5%) obtidos na tabela 7.

Eriksson, Orjesson e Tjerneld (2002) testaram o efeito da adição de diversos surfactantes na hidrólise enzimática de madeira (abeto vermelho), os resultados mostraram que os surfactantes não iônicos, principalmente Tween (20 e 80) e Triton promoveram um aumento no rendimento da hidrólise enzimática.

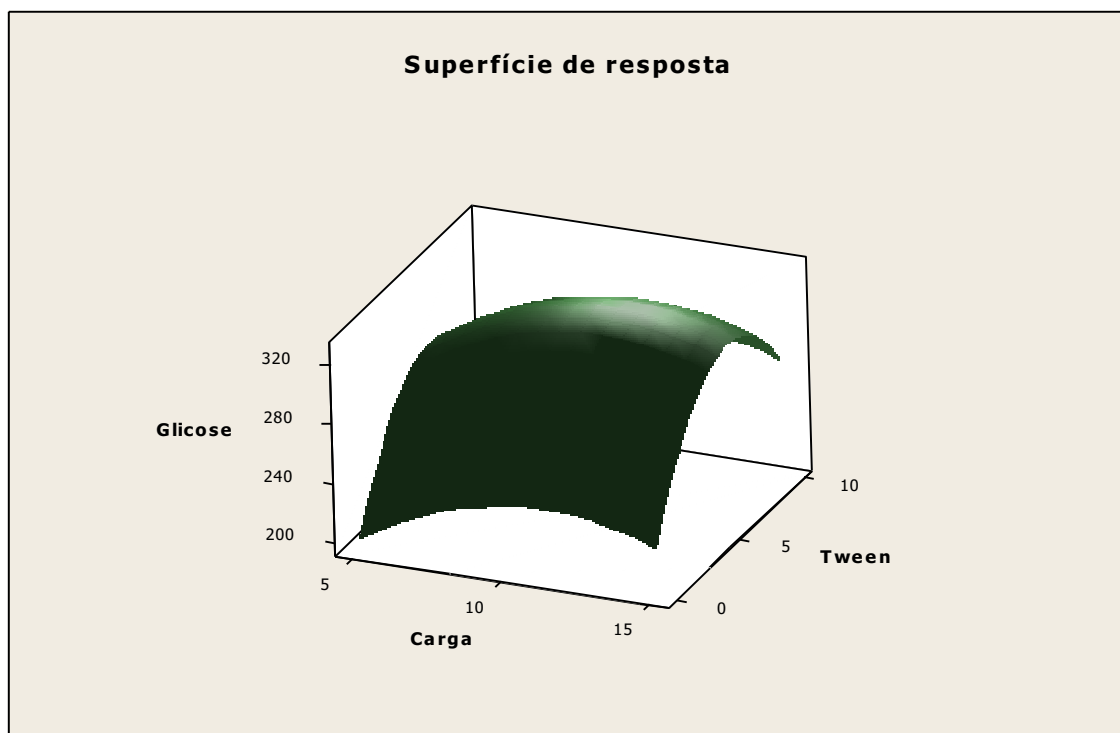
Figura 29- Curva de nível descrita pela equação 4



Fonte: elaborado pelo autor

Santos et al., (2010) avaliaram o efeito da concentração de Tween 20 na hidrólise enzimática do BCA pré-tratado com ácido sulfúrico. Foram testadas concentrações de Tween de 0 a 0,1 g/g de biomassa e dois coquetéis enzimáticos com carga de celulase variando de 1,1 a 38 FPU/g biomassa. Para ambos os coquetéis testados, os resultados mostraram que quanto maior a concentração maior o rendimento da hidrólise enzimática.

Figura 30- Superfície de resposta descrita pela equação 4.



Fonte: elaborado pelo autor

Com os resultados obtidos nesse trabalho foi possível estabelecer que a condição otimizada para a sacarificação do BCA submetido ao pré-tratamento alcalino por 30 minutos, foi de 10 FPU/g bagaço e 5% (g/g) de tween em 24 horas de hidrólise, essa condição obteve aproximadamente o mesmo rendimento de glicose comparada com a hidrólise realizada no mesmo material, utilizando 15 FPU/g bagaço e o tempo de 72 horas de hidrólise.

5. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir que:

- 1) O tipo de bagaço (*in natura* ou explodido), a forma de pré- tratamento e o tempo influenciaram na composição dos teores de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a maior taxa de deslignificação foi obtida para o bagaço *in natura* submetido ao tratamento com Ca(OH)_2 por 60 minutos.
- 2) Em relação à hidrólise enzimática, dentre as condições testadas de pré- tratamento, o bagaço *in natura* submetido ao tratamento alcalino atingiu as maiores taxas de digestão da celulose, independente do tempo de pré- tratamento. Este resultado indica que o pré-tratamento com Ca(OH)_2 no bagaço *in natura* tornou o material mais acessível às enzimas celulolíticas.
- 3) A otimização do processo de hidrólise enzimática no bagaço *in natura*, submetido ao tratamento alcalino, mostrou que o uso do surfactante Tween 80 (5% m/m) permitiu reduzir a quantidade de enzima utilizada de 15 FPU/g BCA para 10 FPU/g BCA e o tempo de hidrólise de 72 horas para 24 horas, o que possibilita uma redução de custos no processo de produção do etanol celulósico.

APÊNDICE

Tabela 3a- Análise de variância para a porcentagem de celulose para o BCA *in natura* no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	56,047	56,047	56,047	63,35	0,000
Tempo	2	10,007	10,007	5,004	5,66	0,042
Tratamento*Tempo	2	19,084	19,084	9,542	10,79	0,010
Error	6	5,309	5,309	0,885		
Total	11	90,447				

Tabela 3b- Análise de variância para a porcentagem de hemicelulose para o BCA *in natura* no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	1,519	1,519	1,519	0,82	0,399
Tempo	2	34,368	34,368	17,184	9,32	0,014
Tratamento*Tempo	2	2,437	2,437	1,219	0,66	0,550
Error	6	11,065	11,065	1,844		
Total	11	49,390				

Tabela 3c- Análise de variância para a porcentagem de lignina para o BCA *in natura* no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	89,269	89,269	89,269	344,39	0,000
Tempo	2	6,571	6,571	3,286	12,68	0,007
Tratamento*Tempo	2	4,051	4,051	2,025	7,81	0,021
Error	6	1,555	1,555	0,259		
Total	11	101,446				

Tabela 4a- Análise de variância para a porcentagem de celulose para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	0,039	0,039	0,039	0,01	0,917
Tempo	2	4,450	4,450	2,225	0,67	0,547
Tratamento*Tempo	2	3,147	3,147	1,574	0,47	0,645
Error	6	19,960	19,960	3,327		
Total	11	27,597				

Tabela 4b - Análise de variância para a porcentagem de hemicelulose para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	0,1307	0,1307	0,1307	0,27	0,623
Tempo	2	14,3424	14,3424	7,1712	14,71	0,005
Tratamento*Tempo	2	6,0895	6,0895	3,0447	6,24	0,034
Error	6	2,9253	2,9253	0,4875		
Total	11	23,4879				

Tabela 4c - Análise de variância para a porcentagem de lignina para o BCA explodido no pré-tratamento alcalino e hidrotérmico.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tratamento	1	0,2598	0,2598	0,2598	0,28	0,618
Tempo	2	0,6067	0,6067	0,3033	0,32	0,736
Tratamento*Tempo	2	1,6261	1,6261	0,8131	0,86	0,468
Error	6	5,6418	5,6418	0,9403		
Total	11	8,1345				

Tabela 8 – Análise de variância para a porcentagem de digestão de celulose.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Material	1	58,83	58,83	58,83	22,71	0,000
Tratamento	1	3829,49	3829,49	3829,49	1478,65	0,000
Tempo	2	415,73	415,73	207,87	80,26	0,000
Material*Tratamento	1	1679,94	1679,94	1679,94	648,66	0,000
Material*Tempo	2	34,08	34,08	17,04	6,58	0,012
Tratamento*Tempo	2	259,11	259,11	129,55	50,02	0,000

Tabela 9– Análise de variância para o ajuste do modelo.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	24519,0	24519,0	4903,8	6,71	0,013
Linear	2	3737,5	12282,3	6141,2	8,40	0,014
Square	2	20764,4	20764,4	10382,2	14,21	0,003
Interaction	1	17,1	17,1	17,1	0,02	0,883
Residual Error	7	5116,1	5116,1	730,9		
Lack-of-Fit	3	1243,4	1243,4	414,5	0,43	0,744
Pure Error	4	3872,7	3872,7	968,2		
Total	12	29635,1				

Tabela 10 – Análise de regressão dos coeficientes das variáveis do planejamento superfície resposta para a massa de glicose liberada.

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	107,361	66,3478	1,618	0,150
Carga	23,463	13,4737	1,741	0,125
Tween	29,802	8,7434	3,409	0,011
Carga*Carga	-1,048	0,6507	-1,611	0,151
Tween*Tween	-2,657	0,6507	-4,084	0,005
Carga*Tween	0,083	0,5407	0,153	0,883

R² = 70,41%

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R. et al. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALVES FILHO, A. Vem aí a 2ª geração do etanol. *Jornal da Unicamp*, n. 533, jul. /ago. 2012.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v.101, p. 4851-4861, 2010.
- BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. *Bioetanol de cana de açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro, 2008. 316 p.
- BANSAL, P. et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrate. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 833-848, 2009.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414p.
- BAS, D.; BOYACI, I. H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, v. 78, p. 836-845, 2007.
- BENKUN, Q. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by alkaline peroxide using response surface methodology. *Industrial Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 15, p. 7346-7353, 2009.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. Disponível em : < <http://mundodacana.posterous.com/2010/08/as-rotas-para-o-etanol-celulosico-no.html>>. Acesso em: 05 nov. 2012.
- CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*, v. 29, p. 642–647, Mar. 2009.
- CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Revista Analytica*, n. 44, p. 48-53, dez./jan. 2010.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4754–4766, 2010.
- CARRASCO, F. Principles of biomass fractionation. *Afinidad*, v. 46, p. 425-429, 1989.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F. M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 67, p. 849-864, 2008.

CASTANON, M.; WILKE, C. R. Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 23, p. 1365-1372, 1981.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment; the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Advances in Biochemical engineering/biotechnology*. v. 108, p. 67-93, 2007.

CHANG V. S.; NAGWANI M.; HOLTZAPPLE M. T. Lime pretreatment of crop residues, bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 74, p. 135-159, 1998.

CHANG, V. S. et al. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 94, p. 1-28, 2001.

CHEN, Y. et al. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 142, p. 276-290, 2007.

CHENG, K. K. et al. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 105-109, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012*. Brasília, 2012. 18p.

EMMEL, A. *Caracterização do efeito da explosão a vapor sobre as propriedades físico-químicas da lignina de Eucalyptus grandis*. 1999. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)- Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999.

ERIKSSON, T. B.; ORJESSON, J.; TJERNELD, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 31, p. 353-364, 2002.

ESTEVAM-ALVES, R.; GUIMARAES, F. E. G. Caracterização da degradação enzimática do bagaço de cana através de microscopia e espectroscopia de fluorescência. In: SIMPÓSIO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS, 12., 2009, São Carlos. *Resumos...* São Carlos: EESC, 2009.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

FUENTES, L. L. G. *Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré- tratamento com hidróxido de cálcio*. 2009. 169 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

GÁMEZ, S. et al. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 52, n.13, p. 4172-4177, June 2004.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p. 78-88, 2006.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GOLDSTEIN, I. S. Composition of biomass. In. GOLDSTEIN, I. S. (Ed.). *Organic chemicals from biomass*. Boca Raton: CRC Press, 1981. p. 9-18.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology*, v. 36, p. 37-50, 1991.

GUAN, X.; YAO, H. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, v. 106, p. 345-351, 2008.

HAMELINCK, C. N.; VAN-HOOIJDOCK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short- middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384-410, Dec. 2005.

HELLE, S. S.; DUFF, S. J. B.; COOPER, D. G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, p. 611-617, 1993.

HENDRIKS, A. T. W. M; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v.100, p.10-18, 2009.

HENRY, R. J. et al. *Clinical Chemistry principles and techniques*. 2nd ed. New York: Harper and Row, 1974. p.1288.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M. et al. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresouce Technology*, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, v. 315, p. 804-807, Feb. 2007.

JØRGENSEN, H.; KRISTENSEN J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioproduction and Biorefining*, v. 1, p. 119-134, 2007.

KAAR, W. E.; HOLTZAPPLE, M. Benefits from Tween during enzymic hydrolysis of corn stover. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 59, p. 419-427, dec. 1998.

KAYA, F.; HEITMANN, J. A.; JOYCE, T. W. Influence of surfactants on the enzymatic hydrolysis of xylan and cellulose. *Tappi*, v. 78, p.150-157, Oct. 1995.

KIM, T. H. et al. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, v. 90, n.1, p. 39-47, Oct. 2003.

KLOCK, U. *Química da madeira*. 3. ed. Curitiba: Ed. UFP, 2005. 86 p.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemical Research*, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

KURAKAKE, M. et al. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 90, n. 3, p. 251-259, Mar. 2001.

LASER, M. et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v. 81, p. 33-44, Jan. 2002.

LI, C. et al. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19, p. 155-164, July 2004.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Biodegradation of sugarcane bagasse with marine fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Journal of Wood Science*, v. 48, p.159-162, 2002.

MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, p. 426-432, 2007.

MARTÍN, C. et al. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 98/100, p. 699-716, 2002.

MARTINS, L. F. *Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum**. 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

McDOUGALL, G. J. et al. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 62, p. 1-20, 1993.

MERINO, S. T.; CHERRY, Y. S. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. In: SHEPER, T.; OLSEN, L. *Biofuels. advances in biochemical engineering/biotechnology*. Berlin: Springer, 2007. v. 108, p. 96-118.

MESA, L. et al. An approach to optimization of enzymatic hydrolysis from sugarcane bagasse based on organosolv pretreatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, p. 1092-1098, May 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673-686, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. *Lehninger : princípios de bioquímica*. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

OGEDA, T. H.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. *Química Nova*, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010.

PALMA, M. B. *Produção de xilanases por Thermoascus aurantiacus em cultivo em estado sólido*. 2003. 189 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARK, J. W. et al. Effects of nonionic surfactant on enzymatic-hydrolysis of used newspaper. *Biotechnology Bioengineering*, v. 39, n. 1, p.117-120, Jan. 1992.

PASQUINI, D. et al. Sugar cane bagasse pulping using supercritical CO₂ associated with co-solvent 1-butanol/ water. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 34, p. 125-131, 2005a.

PASQUINI, D. et al. Extraction of lignin from sugar cane bagasse and Pinus taeda wood chips using ethanol–water mixtures and carbon dioxide at high pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 36, p. 31-39, 2005b.

PATTRA, S. et al. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 5256-5265, 2008.

PATURAU, J. M. *By-products of the cane sugar industry: an introduction to their industrial utilization*. 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 1989. p. 435.

PEDERSEN, M.; MEYER, A. S. Lignocellulose pretreatment severity – relating pH to biomatrix opening. *New Biotechnology*, v. 27, n. 6, p. 739-750, 2010.

PENG, F. et al. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PESSOA, F. *Livro do desassossego*: composto por Bernardo Soares, ajudante de guarda-livros na cidade de Lisboa. São Paulo: Companhia das Letras, 1999. 544 p.

PEREIRA, A. A. et al. Lignin from sugar cane bagasse: extraction, fabrication of nanostructured films and application. *Langmuir*, v. 23, n. 12, p. 6652-6659, 2007.

PEREIRA JUNIOR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA-ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 47 p.

PHAM, P. J. et al. A spectrophotometric method for quantitative determination of xylose in fermentation medium. *Biomass & Bioenergy*, v. 35, p. 2814-2821, 2011.

PITARELO, A. P. *Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática*. 2007. 142 f. Dissertação (Mestrado em Química) -Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

RABELO, S. C. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. 2007. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.

RABELO, S. C. *Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração*. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

RABELO S. C.; MACIEL FILHO, R. M.; COSTA, A. C. A Comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 144, p. 87-100, 2008.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

ROCHA, G. J. M. et al. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, v. 35, p. 274-279, 2012.

RODRIGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, v. 61, p.143-152, 2004.

SANTOS, J. R. A. et al. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SCHLITTLER, L. A. F. S. *Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar*. 2006. 174 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química , Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SENDELIUS, J. *Steam pretreatment optimisation for sugarcane bagasse in bioethanol production*. 2005. (Master in Science Thesis)- Department of Chemical Engineering, Lund University, Lund, 2005. Disponível em: <www.chemeng.lth.se/exjobb/063.pdf>. Acesso em: 16 out. 2012.

SILVA, V. F. N. et al. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by hydrothermal processing. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, v. 38, p. 809-817, 2011.

SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42618*, 2008a.

SLUITER, A. et al. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42629*, 2008b.

SPIGNO, G.; PIZZORNO, T.; DE FAVERI, D. M. Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4329-4337, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and cofermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renewable Energy*, v. 16, p. 1070-1073, 1999.

THE TEXAS A&M UNIVERSITY SYSTEM (United States). M. T. Holtzapple; R. Davison; M. Nagwany. *Calcium hydroxide pretreatment of biomass*. US 5693296, 6 Sept. 1994, 2 Dec. 1997.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURA-CALIXTO, F. Study of the interactions of calcium ions with lignin, cellulose, and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 1762-1766, 1992.

TU, Q. et al. Kinetic modeling of formic acid pulping of bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 9, p. 3097-3101, 2008.

VAN WYK, J. P. H. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnology*, v. 19, p. 172-177, 2001.

WANG, Z.; CHENG J. J. Lime pretreatment of coastal bermudagrass for bioethanol production. *Energy Fuels*, v. 25, p. 1830-1836, 2011.

WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment Technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p.1959-1966, 2005.

XU, J.; CHENG, J. J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 3861-3868, 2011.

XU, J. et al. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 10, p. 2900-2903, 2010.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 452-481, Mar. 2006.