

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Processos de pré-tratamentos hidrolíticos para
obtenção de etanol de segunda geração: avaliação
do efeito da granulometria do bagaço de cana-de-
açúcar sobre o fracionamento da celulose

GUILHERME RODRIGUES LEITE

Dissertação de mestrado
2016



Instituto de Química

GUILHERME RODRIGUES LEITE

Processos de pré-tratamentos hidrolíticos para obtenção de etanol de segunda geração: avaliação do efeito da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar sobre o fracionamento da celulose

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cecilia Laluce

ARARAQUARA
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

L533p Leite, Guilherme Rodrigues
Processos de pré-tratamentos hidrolíticos para obtenção de etanol de segunda geração: avaliação do efeito da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar sobre o fracionamento da celulose / Guilherme Rodrigues Leite. – Araraquara : [s.n.], 2016
60 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Cecilia Laluece

1. Cana-de-açúcar. 2. Etanol. 3. Hidrólise.
4. Lignocelulose. 5. Materiais granulados. I. Título.

GUILHERME RODRIGUES LEITE

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

Araraquara, 27 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dr^a. Cecília Laluece (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP


Prof^a. Dr^a. Elaine Trovatti
Centro Universitário de Araraquara / UNIARA / Araraquara - SP


Prof. Dr. Sandro Rogério de Sousa
Instituto Federal de São Paulo / IFSP / Matão - SP

DADOS CURRICULARES

Nome: Guilherme Rodrigues Leite

Nome em citações bibliográficas: LEITE, G. R.

Nacionalidade: Brasileira

Sexo: Masculino

Nascimento: 18/03/1989 – Americana – SP

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química, Dpto. De Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Francisco Degni nº 55

Quitandinha – Araraquara

14800-900, SP – Brasil

Endereço eletrônico: guilherme.snake@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 – atual Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP

Título: Processos de pré-tratamentos hidrolíticos para obtenção de etanol de segunda geração: avaliação do efeito da granulometria do bagaço de cana-de-açúcar sobre o fracionamento da celulose

Orientadora: Cecília Lalue

Bolsista CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2011 – 2013 Graduação em Biocombustíveis.

Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Brasil.

Título: Bioatividade do óleo essencial de laranja contendo limoneno e do extrato das folhas de pinhão manso no manejo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae).

Orientador: Alexandre Moraes Cardoso

Formação complementar

- 2014 – 2014** Refino de Petróleo e Controle Ambiental. (Carga horária: 24h). Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos – SP, Brasil.
- 2014 – 2014** O controle de qualidade dos combustíveis no Brasil. (Carga horária: 4h). Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de SP, IFSP, Matão – SP, Brasil.
- 2011 – 2011** Planejamento Fatorial à Síntese de Biodiesel. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de São Paulo, IFSP, Matão – SP, Brasil.

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista – Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP

2014 – Atual Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Mestrando em Biotecnologia. Regime: Dedicação exclusiva.

2. Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) – IFSP, Campus Matão - Matão, Brasil.

2012 – 2013 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluno de iniciação científica. Regime: Dedicação exclusiva.

2011 – 2012 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Aluno de iniciação científica. Regime: Dedicação exclusiva.

3. Instituto Federal de São Paulo - Campus Matão, IFSP - Matão, Brasil.

2013 – 2013 Vínculo: Bolsista. Enquadramento funcional: Organização de evento científico. Regime: Dedicação exclusiva.

Áreas de atuação

1. Ciências Biológicas / Microbiologia / Microbiologia Industrial e de Fermentação.
2. Ciências Biológicas / Bioquímica / Bioquímica dos Microrganismos.

3. Ciências Agrárias / Entomologia / Broca da cana-de-açúcar.
4. Ciências Exatas e da Terra / Química / Biocombustíveis.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Bem.

Espanhol Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Português Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.

Produção bibliográfica

Capítulos de livros publicados

LALUCE, C.; **LEITE, G. R.**; ZAVITOSKI, B. Z.; ZAMAI, T. T.; VENTURA, R.
Fermentation of sugarcane juice and molasses for ethanol production. In: Ian O'Hara; Sagadevan Mundree. (Org.). **Sugarcane-based Biofuels and Bioproducts**. 1ed.
New York: Wiley-Blackwell, 2016, p. 53-86.

Resumo publicado em anais de eventos

ZAVITOSKI, B. Z.; CHARTUNE, L. P.; LEITE, G. R.; CESTARI, A.; CHRISTIANI, G.; SOUSA, S. R.; da SILVA, J. C. R. Isolamento e caracterização de microalgas de um lago de água doce como fonte potencial para a produção de biodiesel. In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM), 2012, Santos/SP.

Participação em eventos

2º Workshop em Biocombustíveis do PRH 44: Desafios Tecnológicos da Produção de Biocombustíveis: Como Superá-los? 2016.

1º Workshop em Biocombustíveis do PRH 44: Tendências Crescentes e Decrescentes do Mercado. 2015.

4º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. “Bioatividade de óleo essencial no manejo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)”. 2013. (Congresso).

Jornada de Ciência e Tecnologia - IFSP Campus Matão. “Bioatividade de óleo essencial no manejo da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)”. 2013. (Outra).

2º Fórum Mundial de Educação Profissional e Tecnológica. 2012. (Congresso).

3º Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. “Seleção de leveduras flotantes e produtoras de etanol de usinas produtoras de etanol combustível”. 2012. (Congresso).

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia (XXI ALAM). Isolamento, seleção e cultivo de microalgas de um lago de água doce da cidade de Matão/SP como matéria-prima para a produção de biodiesel, 2012. (Congresso).

II Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica do IFSP. 2011. (Congresso).

Dedico este trabalho, as
pessoas que me incentivaram e me
deram forças para concluir mais esta
etapa da minha vida, em especial aos
meus pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

A professora Cecilia Laluece pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao professor Edison Pecoraro, ao qual serei eternamente grato pela ajuda para realizar e concluir meu trabalho.

Aos meus familiares por toda força como conselhos, emocional e financeira, por suportar toda reclamação e angústia. Agraço em especial minha mãe por ter me “forçado” a não desistir e terminar mais esta fase da minha vida.

A Bruna Zavati Zavitoski, por continuar sendo meu ponto de apoio, tanto para não “cair”, quanto para conseguir seguir em frente sempre ao seu lado, compartilhando os momentos de “desespero” e principalmente de alegria, me ajudando em todos os sentidos existentes, aguentar minhas reclamações incessantes e meu senso de humor “levemente” exagerado, mas principalmente por todo amor por mim.

As amigas que foram formadas pelo caminho, em especial a Thamires, Chadia e Amanda, que acabaram tornando mais fácil e divertido o trajeto até o final do mestrado.

As mestrandas Milena Alves de Souza, Gabriela e Gabrielle, a amizade vem de um pouco antes da pós-graduação, mas se tornou mais intensa, pois compartilhamos risos, sofrimentos, reclamações e principalmente FOME.

A usina Santa Cruz, pelo material cedido, pela disponibilidade em me receber sempre que necessário em especial ao técnico de laboratório João Victor Prada.

A seção de pós-graduação, pela atenção e paciência.

A CAPES pela bolsa concedida.

“Lembro-me bem da liberdade da infância que guardo comigo entre as várias chaves da prisão do presente a me impor o medo até da sombra.”

Autor desconhecido

RESUMO

No Brasil a principal fonte de sacarose para produção de etanol provém da cana-de-açúcar, que gera uma alta quantidade de biomassa rica em celulose durante seu processo. A partir de tratamentos como hidrólise do bagaço ou palha da cana-de-açúcar é possível aumentar o rendimento da produção nacional de etanol. A hidrólise ácida gera uma maior quantidade de componentes tóxicos quando comparada a hidrólise enzimática, porém o custo dos reagentes é menor, pois as enzimas necessárias para hidrólise possuem alto valor e seu tempo do processo é maior. Um fator importante no processo de hidrólise é a forma em que se encontra a celulose na matéria prima, se em sua maior parte a celulose se encontra na forma amorfa, a hidrólise é mais fácil, pois o ataque ácido é mais efetivo, já na fase cristalina é necessária uma abordagem mais severa. O presente trabalho tem como objetivo analisar o efeito no rendimento dos processos de pré-tratamento e hidrólise relacionando o tamanho de partícula inicial. As análises realizadas apresentaram um aumento no rendimento em ambos procedimentos (pré-tratamento e hidrólise), porém o aumento não se apresentou significativo quando se pensa em escala industrial.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Etanol. Hidrólise. Lignocelulose. Materiais granulados.

ABSTRACT

In Brazil, the main source of saccharose for ethanol production is the sugarcane, which generates a high amount of biomass rich in cellulose during its process. From treatments such as hydrolysis of bagasse or sugarcane straw it is possible to increase the efficiency of the national production of ethanol. Acid hydrolysis generates a larger amount of toxic components as compared to enzymatic hydrolysis, however the cost of reagents is lower because the enzymes that are needed for hydrolysis are costly and its process is slower. An important factor in the hydrolysis process is the form in which the cellulose is, in the raw material mostly of the cellulose is in the amorphous form. Hydrolysis is easier, because the acid process is more effective, since the crystalline phase requires a more severe approach. This study aims to analyze the effect on the yield of pretreatment and hydrolysis processes relating to the initial particle size. The analyzes showed an increase in both procedures (pretreatment and hydrolysis), but the increase may not be significant when considering industrial scale.

Keywords: Sugarcane. Ethanol. Hydrolysis. Lignocellulose. Granulated materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Produção mundial de etanol combustível.....	19
Figura 2 Estrutura da lignocelulose	20
Figura 3 Celulose região cristalina e amorfa	23
Figura 4 Fluxograma dos processos e análises realizadas no BCA referente ao presente trabalho	25
Figura 5 Microscopia ótica do BCA e dos pré-tratamentos em diferentes tamanhos de partículas.....	35
Figura 6 Fotos dos BCA e dos pré-tratamentos	38
Figura 7 Glicose liberada PT1-6 %.....	39
Figura 8 Glicose liberada PT2-6 %.....	39
Figura 9 Glicose liberada PT1-30 %.....	40
Figura 10 Glicose liberada PT2-30 %.....	41
Figura 11 ART liberado PT1-6 %.....	42
Figura 12 ART liberado PT2-6 %.....	42
Figura 13 ART liberado PT1-30 %.....	43
Figura 14 ART liberado PT2-30 %.....	44
Figura 15 Xilose liberada PT1-6 %	45
Figura 16 Xilose liberada PT2-6 %	45
Figura 17 Xilose liberada PT1-30 %	46
Figura 18 Xilose liberada PT2-30 %	47
Figura 19 Fenóis liberados PT1-6 %	48
Figura 20 Fenóis liberados PT2-6 %	48
Figura 21 Fenóis liberados PT1-30 %	49
Figura 22 Fenóis liberados PT2-30 %	50
Figura 23 Furanos liberados PT1-6 %.....	51
Figura 24 Furanos liberados PT2-6 %.....	51
Figura 25 Furanos liberados PT1-30 %.....	52
Figura 26 Furanos liberados PT2-30 %.....	53
Figura 27 Curva padrão de ART.....	59
Figura 28 Curva padrão de glicose.....	59
Figura 29 Curva padrão de xilose.....	60
Figura 30 Curva padrão de fenóis totais.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tamanho e nomenclatura das partículas de BCA moído	26
Tabela 2	Rendimento e perda de massa em diferentes pré-tratamentos	36
Tabela 3	Composição química das amostras	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
g	grama
kg	quilograma
L	litro
mL	mililitro
m/v	massa por volume
m/m	massa por massa
v/v	volume por volume
nm	nanômetro
µL	microlitro
g/mol	grama por mol
mol/L	mol por litro
mg/g	miligrama por grama
M	molar
KU/mL	unidades de quilo por mililitro
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotação por minuto
BCA	bagaço de cana-de-açúcar
PT	pré-tratamento
ART	açúcar redutor total
DNS	ácido 3,5 – dinitrosalicílico
NaOH	hidróxido de sódio
HCl	ácido clorídrico
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
KOH	hidróxido de potássio
H ₂ O ₂	água oxigenada
HNO ₃	ácido nítrico
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
CO ₂	gás carbônico

SO ₂	dióxido de enxofre
n°	número
UV-Vis	ultra violeta – visível
MHz	mega-hertz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	20
1.1.1 Celulose	21
1.1.2 Hemicelulose	21
1.1.3 Lignina	21
1.2 Pré-tratamentos	22
1.3 Hidrólise ácida	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)	26
3.2 Moagem e peneiramento do bagaço de cana-de-açúcar	26
3.3 Lavagem do bagaço de cana-de-açúcar	26
3.4 Pré-tratamentos	27
3.4.1 <i>Pré-tratamento 1 (Álcali assistido de micro-ondas)</i>	27
3.4.2 <i>Pré-tratamento 2 (Álcali assistido de micro-ondas seguido de tratamento ácido assistido)</i>	27
3.5 Lavagem e secagem do material insolúvel	27
3.6 Análises do BCA e dos pré-tratados	28
3.6.1 <i>Teor de cinzas</i>	28
3.6.2 <i>Teor de umidade</i>	28
3.6.3 <i>Teor de lignina Klason insolúvel</i>	28
3.6.4 <i>Teor de lignina Klason solúvel</i>	29
3.6.5 <i>Teor de holocelulose</i>	30
3.3.6 <i>Teor de α-celulose</i>	30
3.3.7 <i>Teor de hemicelulose</i>	31
3.3.8 <i>Rendimento</i>	31
3.3.9 <i>Microscopia ótica</i>	31
3.4 Hidrólise ácida	32
3.4.1 <i>Hidrólise ácida diluída</i>	32
3.4.2 <i>Hidrólise ácida concentrada</i>	32
3.5 Análises dos hidrolisados	32
3.5.1 <i>Teor de glicose</i>	32
3.5.2 <i>Teor de xilose</i>	33
3.5.3 <i>Teor de açúcar redutor total (ART)</i>	33
3.5.4 <i>Teor de fenóis totais</i>	34
3.5.5 <i>Teor de furanos</i>	34
3.5 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1 Rendimentos e composição química dos materiais pré-tratados e do BCA	35
4.2 Teor de glicose na hidrólise ácida diluída (6 %)	38
4.2.1 <i>Glicose liberada no pré-tratamento 1</i>	38
4.2.2 <i>Glicose liberada do pré-tratamento 2</i>	39
4.3 Teor de glicose na hidrólise ácida concentrado (30 %)	40
4.3.1 <i>Glicose liberada do pré-tratamento 1</i>	40

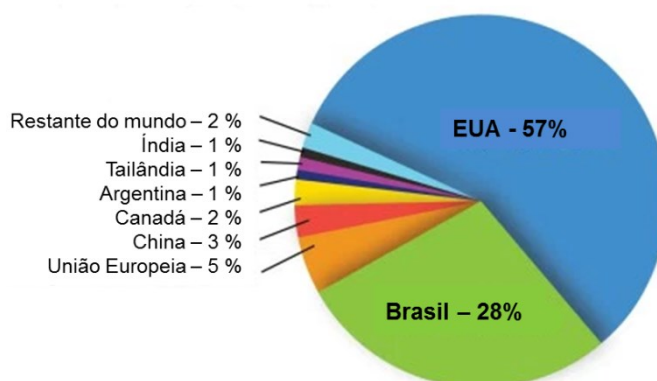
4.3.2 Glicose liberada do pré-tratamento 2	40
4.4 Teor de açúcar redutor total (ART) na hidrólise ácida diluída (6 %)	41
4.4.1 ART liberado do pré-tratamento 1	41
4.4.2 ART liberado do pré-tratamento 2	42
4.5 Teor de açúcar redutor total (ART) na hidrólise ácida concentrada (30 %)	43
4.5.1 ART liberado do pré-tratamento 1	43
4.5.2 ART liberado do pré-tratamento 2	43
4.6 Teor de xilose na hidrólise ácida diluída (6 %)	44
4.6.1 Xilose liberada do pré-tratamento 1	44
4.6.2 Xilose liberada do pré-tratamento 2	45
4.7 Teor de xilose na hidrólise ácida concentrada (30 %)	46
4.7.1 Xilose liberada do pré-tratamento 1	46
4.7.2 Xilose liberada do pré-tratamento 2	46
4.8 Teor de fenóis totais na hidrólise ácida diluída (6 %).....	47
4.8.1 Fenóis liberados do pré-tratamento 1.....	47
4.8.2 Fenóis liberados do pré-tratamento 2.....	48
4.9 Teor de fenóis totais na hidrólise ácida concentrada (30 %)	49
4.9.1 Fenóis liberados do pré-tratamento 1.....	49
4.9.2 Fenóis liberados do pré-tratamento 2.....	49
4.10 Teor de furanos na hidrólise ácida diluída (6 %).....	50
4.10.1 Furanos liberados do pré-tratamento 1	50
4.10.2 Furanos liberados do pré-tratamento 2	51
4.11 Teor de furanos na hidrólise ácida concentrada (30 %).....	52
4.11.1 Furanos liberados do pré-tratamento 1	52
4.11.2 Furanos liberados do pré-tratamento 2	52
5 CONCLUSÕES.....	54
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

O sistema energético internacional é baseado praticamente em combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás), o consumo destes combustíveis cresce aproximadamente 2 % ao ano (média em 20 anos), pois cerca de 80 % do consumo mundial de energia se origina dessas fontes (OGEDA; PETRI, 2010). Muitos são os problemas relacionados ao consumo elevado de combustíveis fósseis, entre eles o mais evidenciado e preocupante vêm sendo o aquecimento global devido às emissões de gases que provocam mudanças climáticas e o efeito estufa. Uma solução para este problema é a utilização de biocombustíveis como o etanol, onde no Brasil já se substitui metade da gasolina que seria consumida no país.

Desde 1970 com a criação do Proálcool, o país vem fortemente desenvolvendo tecnologias e várias campanhas de incentivo para produção do biocombustível como o Projeto Bioetanol (“Produção de Bioetanol através de Hidrólise Enzimática de Biomassa de Cana-de-açúcar”) iniciado em 2006 e financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) através do Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT), e também o Programa BIOEN financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) que visa o desenvolvimento do etanol brasileiro tanto de 1ª quanto de 2ª geração, desde o aprimoramento da produtividade até desenvolvimento tecnológico (OGEDA; PETRI, 2010).

O Brasil é o país que mais produz e utiliza etanol a partir de cana-de-açúcar, um combustível com elevado potencial para substituir a gasolina e tornar-se uma *commodity* global (HENRIQUE NETO, 2013). No setor mundial de produção de etanol combustível, perde somente para os EUA que produz cerca de 57 % da produção mundial (Figura 1).

Figura 1 Produção mundial de etanol combustível

Fonte: RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, (2016), adaptado.

As usinas de produção de etanol e açúcar geram cerca de 270-280 kg de bagaço de cana-de-açúcar (BCA com 50 % de umidade) e 140 kg de palha de cana por cada tonelada de cana processada. Aproximadamente 85 % do bagaço resultante é direcionado para as caldeiras para produção de energia térmica e elétrica, sendo o restante utilizado para outros fins, tais como ração animal. CANILHA et al. (2012) estimaram para a colheita de 2012/2013, uma produção de 163 a 169 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar por 84 milhões de toneladas de palha.

Desde o século XIX, existe uma busca por fontes alternativas para produção de etanol, onde surge como opção a hidrólise da biomassa como fonte de matéria prima para a fermentação, resultando na obtenção de etanol. Esta tecnologia vem sendo estudada com maior intensidade nos últimos 20 anos, como uma proposta para atender à crescente demanda energética no mundo.

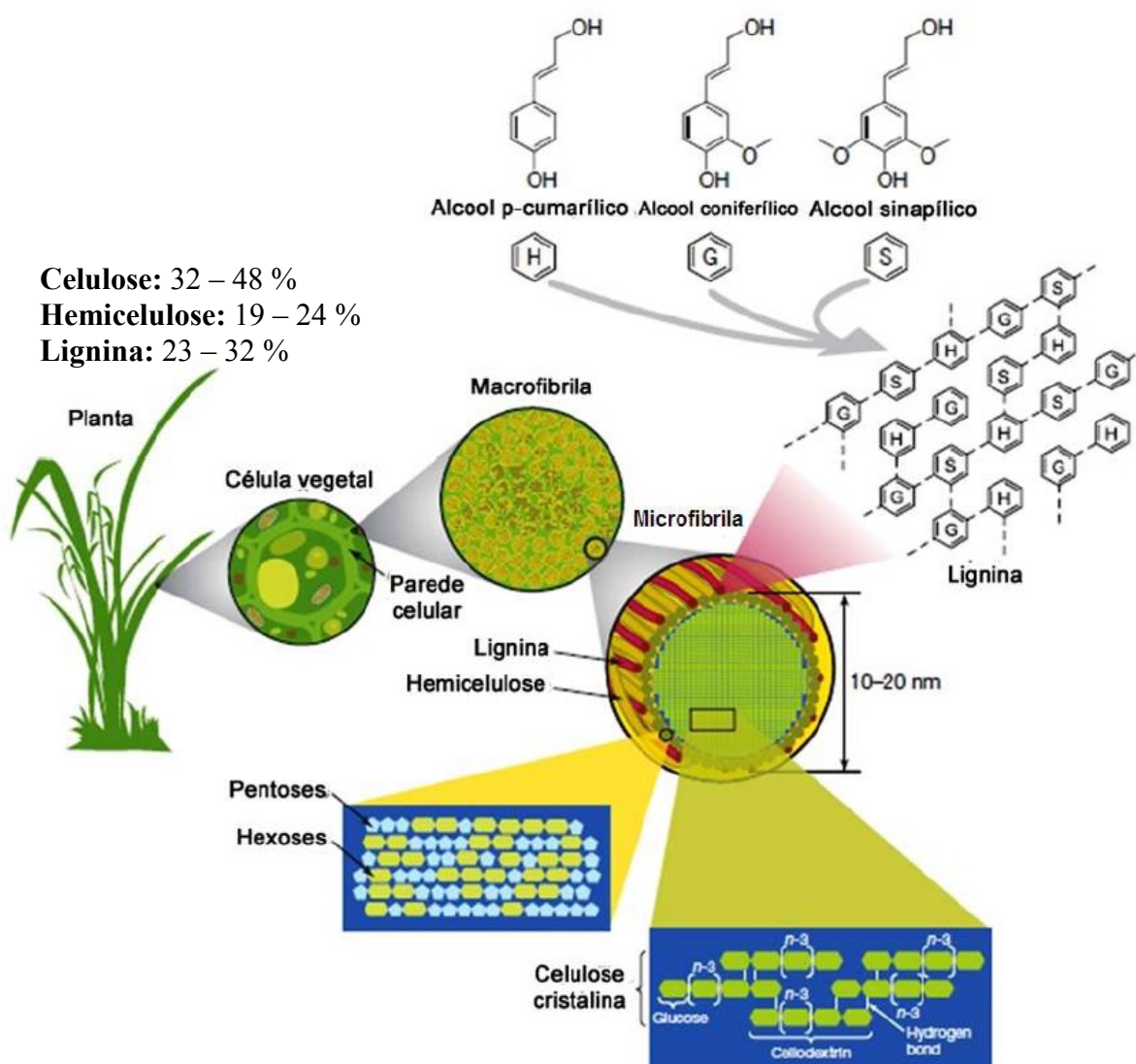
O processo de obtenção do etanol destas matérias primas denominadas lignocelulósicas, consiste na hidrólise dos polissacarídeos presentes nesta biomassa em açúcares fermentescíveis, ao qual passarão pelo processo de fermentação, resultando assim em etanol (BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS, 2008).

1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

Segundo DIAS et al. (2009), o bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto das usinas sucroalcooleiras que pode ser utilizado para produção de energia térmica, elétrica e etanol de segunda geração.

As fibras contidas no BCA são, principalmente, celulose (32 - 48 %), hemicelulose (19 - 24 %) e lignina (23 - 32 %) (BOOPATHY; DAWSON, 2008; PANDEY et al., 2000) como demonstrado na Figura 2, mas estas proporções podem variar devido a vários fatores como o tipo de cana, tipo de solo, clima e até mesmo o manuseio no plantio e colheita da cana.

Figura 2 Estrutura da lignocelulose



Fonte: RUBIN, (2008). Adaptado.

1.1.1 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na parede celular, produzida em plantas (FENGEL; WEGENER, 1989) sendo formada pela ligação entre unidades de β -glicose, através de ligações entre β -1-4-glicosídicas. Seu tamanho é da ordem de 500 a 10.000 unidades de glicose, com massa molar variando entre $5,7 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^6$ g/mol dependendo de sua origem (FAN et al., 1987).

1.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um tipo de heteropolissacarídeo presente na parede celular das plantas com grau de polimerização entre 100 - 200 unidades. Trata-se de uma estrutura muito ramificada contendo glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, ramnose, ácido glucurônico e galacturônico (RAMOS, 2003; STAMBUK et al., 2008; OGEDA; PETRI, 2010; PENG et al., 2012; SANTOS et al., 2012). Encontra-se a hemicelulose, normalmente ligada a certos componentes da parede celular (lignina, celulose, proteínas e compostos fenólicos) por ligação de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas (PENG et al., 2012).

1.1.3 Lignina

A estrutura da lignina é constituída por uma rede polimérica tridimensional, formada por três unidades de fenilpropanos diferentes como o álcool coniferílico, álcool sinapílico e o álcool p-cumarílico (BROWNING, 1967). Sua função é conferir as células da planta, impermeabilidade à água, rigidez, resistência mecânica e microbiológica (FENGEL; WEGENER, 1989; MOSIER et al., 2005).

Devido as características presentes no bagaço de cana-de-açúcar e sua composição, um processo para separação da celulose, hemicelulose e lignina é necessário, sendo denominado de pré-tratamento, além de realizar esta separação, ele aumenta a área superficial e porosidade desta biomassa, visando assim um melhor rendimento no processo de obtenção do etanol de segunda geração como descrito por HECTOR, 2016.

1.2 Pré-tratamentos

O processo de pré-tratamento visa facilitar a hidrólise da celulose e desestruturar a lignocelulose. As técnicas de pré-tratamento podem ser divididas em quatro grupos: físico, químico, físico-químico e biológico (CARVALHO et al., 2009 e CANILHA et al., 2012) como demonstrado a seguir:

Pré-tratamentos físicos:

- Moagem: bolas, dois rolos, martelos, facas.
- Irradiação: raios gama, feixe de elétron, micro-ondas.
- Outras: expansão, extrusão, pirólises.

Pré-tratamentos químicos:

- Alcalis: NaOH, amônia, sulfito de amônia.
- Ácidos: H_2SO_4 , HCl, H_3PO_4 , HNO_3 , ácido oxálico.
- Gás: dióxido de cloro, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre.
- Agentes oxidantes: H_2O_2 , oxidação úmida, ozônio.
- Solventes para extração da lignina: etanol/água, benzeno/água, etilenoglicol, butanol/água, organosolve.

Pré-tratamentos físico-químicos:

- Explosão: vapor, amônia (AFEX), CO_2 , SO_2 .
- Outras: hidrotermólises (LHW), alta pressão de vapor, pré-tratamento químico associado a micro-ondas, pré-tratamento com sulfito (SPORL).

Pré-tratamento biológico:

- Utiliza agentes microbianos (actinomicetos e fungos) e/ou hidrólise enzimática.

Pré-tratamento ideal:

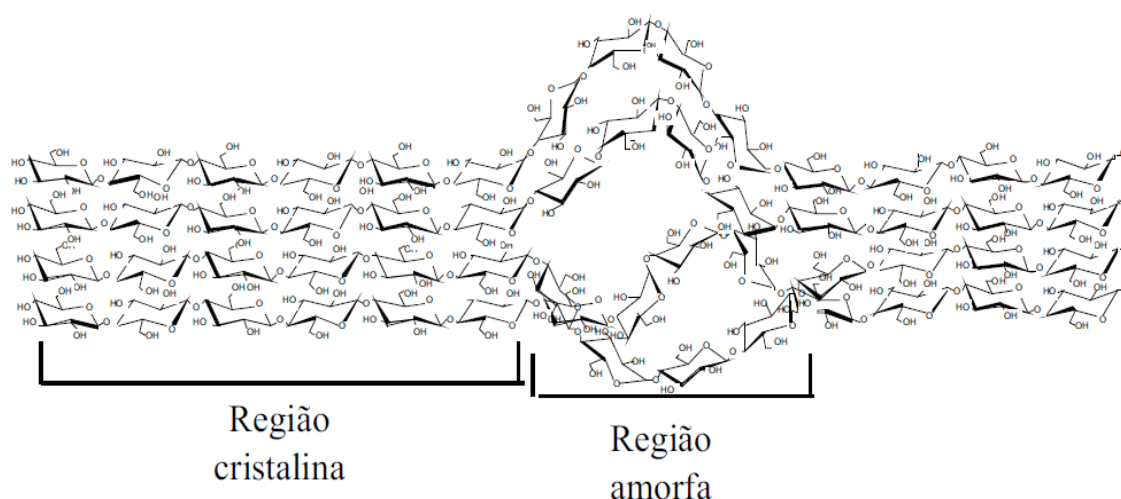
Segundo CANILHA et al. (2012), o pré-tratamento ideal do BCA, deve parcialmente despolimerizar e diminuir a cristalinidade da celulose, solubilizar a hemicelulose e/ou lignina, maximizando a digestibilidade enzimática da fração celulósica, minimizar perdas de açúcares e custos operacionais.

1.3 Hidrólise ácida

No processo de hidrólise ácida, deve-se levar em consideração os dois estados que a celulose pode ser encontrada, na forma cristalina, onde apresenta estruturas altamente ordenadas ou apresenta estruturas menos ordenadas, com cadeias de orientação randomizada (Figura 3) (FARINAS, 2011).

Devido às diferenças estruturais, a velocidade de hidrólise entre a celulose cristalina e amorfa são diferentes, onde a fase amorfa é hidrolisada rapidamente, e ao final do processo haverá um resíduo celulósico referente a fase cristalina, onde poderá ser hidrolisado novamente com condições mais severas.

Figura 3 Celulose região cristalina e amorfa



Fonte: FARINAS, (2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do tamanho de partículas produzidas por moagem de bagaço de cana em moinho de facas e moinho de bolas, no rendimento do fracionamento da celulose do bagaço por processos de pré-tratamento químicos e físicos e o rendimento da hidrólise ácida do material pré-tratado.

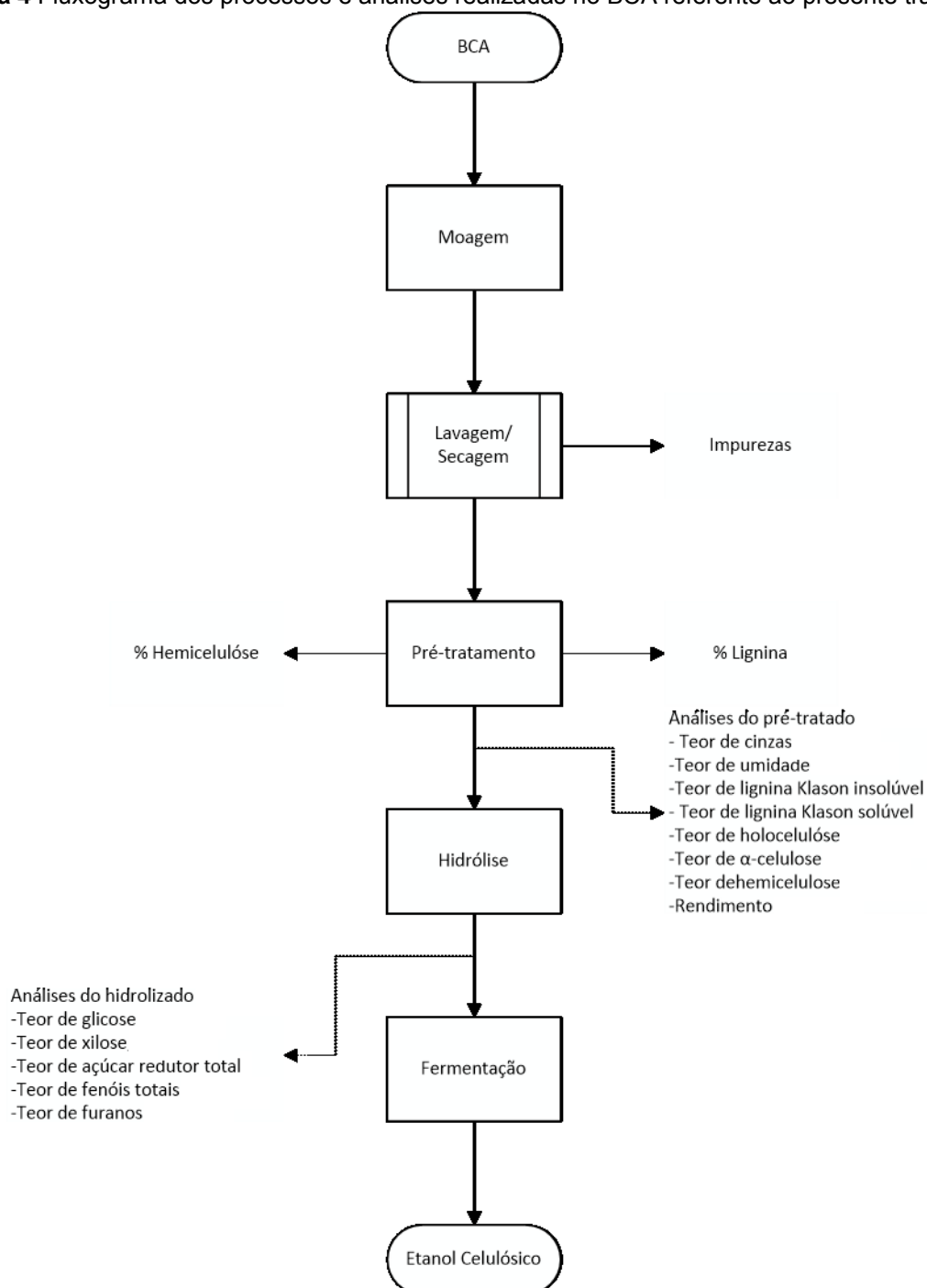
2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a composição química das amostras antes e após os pré-tratamentos;
- b) Analisar o rendimento após o processo de hidrólise diluída ou concentrada;
- c) Verificar um processo de moagem mais efetivo do que o empregado hoje em dia.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O BCA passou por diversas etapas e análises como demonstrado no fluxograma (Figura 4) a seguir.

Figura 4 Fluxograma dos processos e análises realizadas no BCA referente ao presente trabalho



Fonte: Elaborado pelo autor

3.1 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) foi cedido pela usina Santa Cruz do grupo São Martinho, localizada no distrito de Américo Brasiliense - SP. O material foi encaminhado até o Instituto de Química da UNESP, onde foi estocado em sacos plásticos em pequenas porções mantidos a -22 °C.

3.2 Moagem e peneiramento do bagaço de cana-de-açúcar

Antes da moagem o BCA (congelado) foi seco em estufa a 50 °C, até apresentar massa constante, em seguida o mesmo foi triturado em moinho de facas (Tecnal, modelo TE-633), e peneirado utilizando peneiras molecular de 32, 35 e 150 mesh. Amostras referentes à peneira de 35 mesh foram denominadas como amostras G (grande) e as amostra da peneira de 150 mesh denominadas amostras M (média).

Uma segunda moagem foi realizada utilizando a amostra M, em um moinho de bolas de alta eficiência (Spex, modelo 8000M), onde as amostras foram denominadas de amostras P (pequena).

Tabela 1 Tamanho e nomenclatura das partículas de BCA moído

Tamanho	Nomenclatura	Mesh
32 mesh	G (grande)	700 - 750
150 mesh	M (média)	150 - 200
Moinho de bolas	P (pequena)	50 - 80

Fonte: Elaborado pelo autor

3.3 Lavagem do bagaço de cana-de-açúcar

O BCA peneirado foi lavado com água destilada à 70 °C, para retirada de resíduos de terra, cinzas e principalmente açúcar residual e outros glicídios hidrossolúveis de baixa massa molecular como descrito por Schuchardt; Duarte

(1986). Após a lavagem o BCA foi levado à estufa a uma temperatura de 50 °C até atingir massa constante.

3.4 Pré-tratamentos

Os pré-tratamentos selecionados, foram baseados no trabalho de ROLDÁN (2014), ao qual analisou diversos pré-tratamentos da literatura, e com base em seus resultados foram escolhidos 2.

3.4.1 Pré-tratamento 1 (*Álcali assistido de micro-ondas*)

Uma amostra contendo 10 g de BCA foi submetida a uma solução de NaOH 1 %, em uma razão sólido/líquido de 1:20 (200 mL), e levada a um forno de micro-ondas (Brastemp, BMS35BBHNA) por 3 minutos com frequência de 2450 MHz (ZHU et al., 2006; BINOD et al., 2012). Em seguida o material foi filtrado e a parte insolúvel foi denominada PT1.

3.4.2 Pré-tratamento 2 (*Álcali assistido de micro-ondas seguido de tratamento ácido assistido de micro-ondas*)

Uma amostra contendo 10 g do pré-tratamento 1, devidamente lavada com água destilada até atingir o pH neutro, foi submetida à uma solução de H₂SO₄ 1 % em uma razão sólido/líquido de 1:20 (200 mL) e levada a um forno de micro-ondas (Brastemp, BMS35BBHNA) por 3 minutos com frequência de 2450 MHz (BINOD et al., 2012). Em seguida o material foi filtrado e a parte insolúvel foi denominada PT2.

3.5 Lavagem e secagem do material insolúvel

Os materiais insolúveis dos dois pré-tratamentos foram lavados com água destilada, até atingir o pH neutro e secos em estufa a 50 °C até atingir massa constante (TEIXEIRA et al., 2011).

3.6 Análises do BCA e dos pré-tratados

As análises foram realizadas seguindo as normas TAPPI modificadas (ROLDÁN, 2014) nos BCA *in natura* e nos pré-tratamentos nos diferentes tamanhos, visando acompanhar a etapa de pré-tratamento, verificando a formação de produtos e eficiência do processo.

3.6.1 Teor de cinzas

Uma amostra de 1 g aproximadamente foi colocada em um cadinho que foi seco e tarado, em seguida a amostra foi levada a uma mufla com temperatura de 800 °C por duas horas. Após o tempo a amostra foi mantida em estufa e resfriada em dessecador até atingir temperatura ambiente e posteriormente pesada. O teor de cinzas foi determinado entre a relação percentual de massa inicial e final da amostra calcinada. Norma modificada TAPPI T211 OM-93.

3.6.2 Teor de umidade

Uma amostra de aproximadamente 2 g foi acondicionada em um cadinho previamente seco e tarado. A amostra foi levada a estufa por duas horas a uma temperatura de 105 ± 3 °C, após as duas horas o material foi mantido em dessecador até atingir temperatura ambiente e posteriormente pesada. O teor de umidade foi determinado a partir da relação percentual entre massa inicial e final da amostra. Norma modificada TAPPI T264 OM-88.

3.6.3 Teor de lignina Klason insolúvel

Uma amostra contendo aproximadamente 1 g foi misturada a 15 mL de uma solução de H₂SO₄ 72 % (m/m), e triturada com o auxílio de um almofariz exaustivamente. Após a maceração a mistura repousou por 2 horas em temperatura ambiente, contada a partir da mistura entre amostra e ácido. A mistura foi diluída em água destilada até atingir o volume de 575 mL, apresentando uma concentração do ácido sulfúrico de 3 % (m/m), após a diluição a amostra foi transferida para um balão de fundo redondo com volume de 1 L, onde foi aquecida em sistema de refluxo por 4

horas. Após as 4 horas, a mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado n° 4 previamente seco e tarado, separando assim a lignina insolúvel (parte sólida) da lignina solúvel (parte líquida) que foi separada para análise de lignina Klason solúvel. Após a filtração o funil contendo a lignina insolúvel foi mantido em estufa a uma temperatura de 105 ± 3 °C por 12 horas, e resfriado a temperatura ambiente em um dessecador até apresentar massa constante, o cálculo para determinação foi realizando entre a relação de lignina insolúvel e massa seca inicial da amostra. Norma modificada TAPPI T13M-54.

3.6.4 Teor de lignina Klason solúvel

A solução ácida de lignina solúvel, previamente filtrada na análise de determinação de lignina insolúvel foi diluída em água destilada até apresentar uma concentração de 0,5 M de ácido sulfúrico, foi preparada uma solução padrão de ácido sulfúrico 0,5 M. Foram realizadas leituras de absorvância na faixa de 215 que representa uma medida da concentração de lignina solúvel e 280 nm para realizar uma correção referente aos compostos furfúrais, com as soluções preparadas dos pré-tratamentos, onde a concentração de lignina Klason solúvel foi calculada a partir das seguintes formulas:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L \text{ (I)}$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L \text{ (II)}$$

$$C(\text{g/L}) = \frac{[(4,53 A_{215}) - A_{280}]}{300} \text{ (III)}$$

A_{280} = Absorvância a 280 nm

A_{215} = Absorvância a 215 nm

C_d = Concentração dos carboidratos

C_L = Concentração da lignina solúvel

C = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido

As constantes 18 e 70, representam a absorvidade da lignina na faixa de 215 e 280 nm, já os valores de 0,68 e 0,15 representam a absorvidade dos carboidratos na faixa de 215 e 280 nm.

As equações I e II foram utilizadas para se fazer uma correção necessária devido à formação de possíveis compostos furfurais gerados durante os pré-tratamentos.

3.6.5 Teor de holocelulose

O método de obtenção da holocelulose foi realizado segundo BROWNING (1967), onde uma amostra contendo 5 g de massa seca foi colocada em um Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água destilada, e colocado em banho-maria com uma temperatura de 75 °C, e adicionado 2 mL de ácido acético e 3 g de clorito de sódio nesta ordem e tampado. Após 1 hora foi novamente adicionado 2 mL de ácido acético e 3 g de clorito de sódio na respectiva ordem, o procedimento foi realizado mais duas vezes totalizando 4 adições de ácido acético e clorito de sódio. A amostra foi resfriada a 10 °C e filtrada em funil de vidro sinterizado nº 2 previamente seco e tarado, onde então foi lavada com água destilada a 5 °C, até apresentar coloração esbranquiçada e pH neutro. Após a lavagem o funil contendo a amostra foi lavado com água destilada, seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas, resfriado em um dessecador, em seguida pesado para avaliar o rendimento da holocelulose.

3.3.6 Teor de α -celulose

Uma amostra contendo 3 g de holocelulose seca foi transferida para um Erlenmeyer contendo 100 mL de solução de KOH 5 %, borbulhou-se gás nitrogênio por 5 minutos para obtenção de uma atmosfera inerte para se evitar a oxidação da celulose. O Erlenmeyer foi mantido tampado sob agitação por 2 horas. Após as 2 horas a amostra foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº 2 e lavada com 250 mL de solução de KOH 5 % e 100 mL de água nesta ordem. O resíduo sólido contido no funil foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer, onde se repetiu o procedimento utilizando uma solução de KOH 24 % ao invés de 5 %. Após a filtração da mistura, a parte sólida presente no funil foi lavada com 25 mL de solução de KOH 25 %, 50 mL de água destilada, 25 mL de solução de ácido acético 10 % e 100 mL de água destilada, nesta respectiva ordem. O resíduo insolúvel foi lavado com água destilada até apresentar pH neutro e lavado com 50 mL de acetona, e mantido em

estufa a 105 ± 3 °C por 6 horas e pesado. O cálculo do teor de α -celulose levou em consideração o rendimento para obtenção da holocelulose e a relação massa inicial seca e do resíduo insolúvel final (BROWNING, 1967).

3.3.7 Teor de hemicelulose

O teor de hemicelulose foi determinado entre a diferença da massa inicial seca da amostra e a relação entre holocelulose e α -celulose (MORAIS et al., 2010).

3.3.8 Rendimento

Os rendimentos dos pré-tratamentos foram calculados entre a relação de massa final e inicial das amostras, com as seguintes formulas:

$$R(\%) = 100 \left(\frac{M_f}{M_i} \right)$$

$$S(\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{M_f}{M_i} \right) \right]$$

R (%) = Porcentagem de rendimento

S (%) = Porcentagem de perda de massa

M_i = Massa inicial (antes do pré-tratamento)

M_f = Massa final (após o pré-tratamento)

3.3.9 Microscopia ótica

Em um microscópio ótico (Leica DM 2500 M, câmera DFC310 FX), foi realizada a análise de tamanho de partículas nas amostras antes e após os pré-tratamentos com um aumento de 10x e 40x.

3.4 Hidrólise ácida

3.4.1 Hidrólise ácida diluída

Como descrito por AGUILAR et al. (2002) e NIGAM (2001), em um sistema de refluxo foi adicionada uma amostra de 5 g do material pré-tratado em 100 mL de solução de ácido sulfúrico 6 % (v/v) a uma temperatura de 98 °C por 3 horas. Após as 3 horas o sobrenadante foi separado por centrifugação e neutralizado com uma solução de NaOH 1,5 M, e centrifugado novamente para separação do complexo de Na₂SO₄ formado.

3.4.2 Hidrólise ácida concentrada

Como descrito por SARROUH et al. (2007) e NIGAM (2001), em tubos de ensaio contendo 100 mL de solução de ácido sulfúrico 30 % (v/v), foi adicionado 5 g do material pré-tratado, onde foram mantidos em banho termostatizado a uma temperatura de 80 °C por 6 horas. Após o tempo de hidrólise a mistura foi centrifugada, onde foi separado o sobrenadante que foi neutralizado com adição de uma solução de NaOH 13,17 mol/L, após a neutralização a solução foi novamente centrifugada para separação do complexo de Na₂SO₄ formado durante o processo.

3.5 Análises dos hidrolisados

3.5.1 Teor de glicose

Para quantificação da glicose presente no hidrolisado, foi realizado utilizando-se kit enzimático comercial Laborlab como descrito por McCLEARY et al. (1988), composto por:

- Reativo enzimático: CAT n°. 02204:
 - Glicose oxidase ≥ 1 KU/mL
 - Peroxidase $\geq 0,15$ KU/mL
- Reativo de cor 1: CAT n°. 02203:
 - 4 - aminofenazona 0,025 mol/L
 - Tampão Tris 0,92 mol/L
- Reativo de cor 2: CAT n°. 02204:
 - Fenol 0,055 mol/L

Uma amostra de 50 µL do material hidrolisado diluída foi adicionada ao complexo presente no kit enzimático. Incubou-se em banho termostatzado a uma temperatura de 37 °C por 10 minutos. Após o procedimento a amostra foi resfriada em isopor contendo gelo até atingir temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 505 nm.

3.5.2 Teor de xilose

O método de Floroglucinol descrito por EBERTS et al. (1979), foi utilizado para determinação da xilose formada durante o processo de hidrólise do material lignocelulósico. Em tubos de ensaio contendo 5 mL do reagente de cor, foi adicionado 50 µL do material hidrolisado diluído, os tubos de ensaio contendo as misturas foram aquecidos em banho termostatzado a uma temperatura de 100 °C durante 4 minutos, após o procedimento a amostra foi resfriada em gelo até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas antes da análise em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 554 nm.

Composição do reagente de cor:

- 0,5 g de floroglucinol;
- 10 mL de HCl concentrado;
- 100 mL de ácido acético glacial.

3.5.3 Teor de açúcar redutor total (ART)

Para determinação do ART, foi utilizado o método descrito por MILLER (1959) que utiliza o ácido 3,5 – dinitrosalicílico (DNS) como reagente. Em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução DNS, adicionou-se uma amostra de 2 mL do material hidrolisado diluído, a mistura formada foi levada a um banho de água fervente (100 °C) por 5 minutos e resfriada a temperatura ambiente em gelo. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 540 nm.

Composição do DNS:

- 1,6 g de hidróxido de sódio;
- 30 g de tartarato de potássio;
- 1 g de ácido 3,5 – dinitrosalicílico;
- 100 mL de água destilada.

O DNS foi mantido em frasco âmbar, pois é fotossensível.

3.5.4 Teor de fenóis totais

Para determinação dos fenóis totais foi utilizado o método de WATERHOUSE (2002) onde os polifenóis reagem com o reagente Folin-Ciocalteu apresentando uma coloração azul que é quantificada por espectrofotômetro. Como sugerido por RODRIGUES et al. (2010), utilizou-se vanilina e não ácido gálico para a curva padrão.

Em um tubo de ensaio contendo 20 µL de amostra diluída, foi adicionado 1,58 mL de água destilada e 100 µL de Folin-Ciocalteu e mantido em repouso por 8 minutos. Após o tempo de repouso foi adicionado 300 µL de solução de Na₂CO₃ a 20% (m/v) onde foi mantido novamente em repouso a temperatura ambiente durante 2 horas, onde então as amostras foram analisadas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 760 nm.

3.5.5 Teor de furanos

A teor de Furanos foi determinado segundo MARTINEZ et al. (2000), através da diferença de absorbância (nm) na faixa de A₂₈₀ e A₃₂₀, analisadas em espectrofotômetro UV-Vis para medidas de furanos.

3.5 Análise estatística

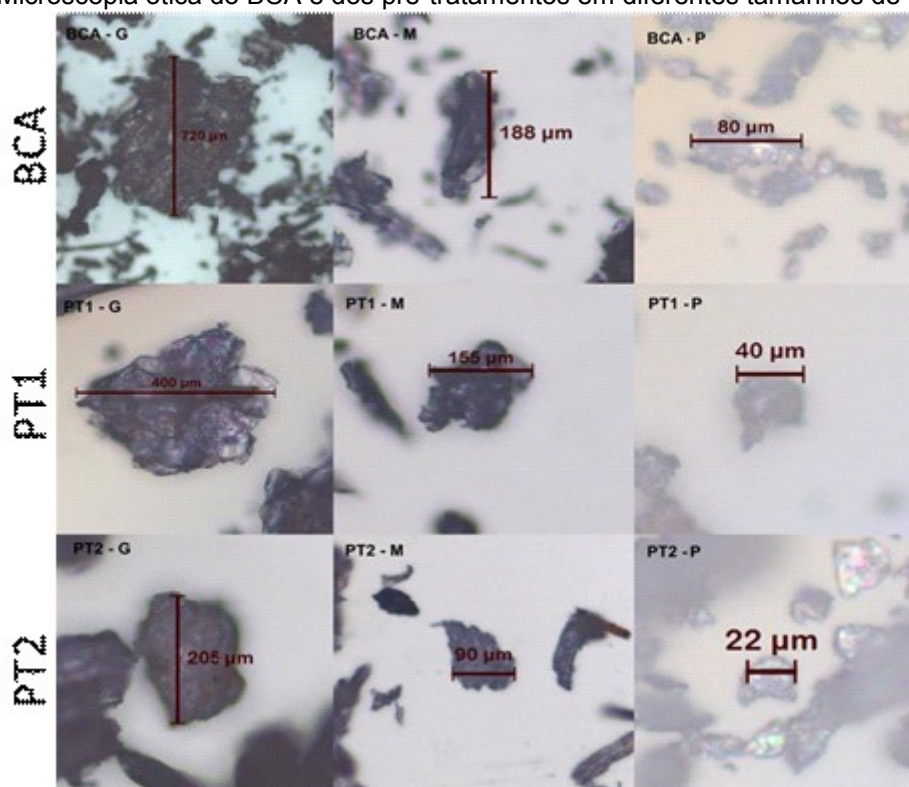
Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados amostrais foram submetidos ao teste t de *Student*. Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Microsoft Excel versão 2013. Os gráficos foram gerados no programa OringinPro 8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimentos e composição química dos materiais pré-tratados e do BCA

No presente trabalho, foi avaliada a influência do tamanho de partículas nos diferentes pré-tratamentos e hidrólises empregados e os resultados da análise, estão representados na Figura 5.

Figura 5 Microscopia ótica do BCA e dos pré-tratamentos em diferentes tamanhos de partículas



Fonte: Elaborado pelo autor

Como demonstrado na Tabela 2 A perda de massa, varia de $27,62 \pm 2,31 \%$ a $40,03 \pm 3,28 \%$, onde as amostras contendo menor tamanho de partícula (P) geram um menor rendimento e maior perda de massa. A diferença de perda de massa entre o pré-tratamento 1 e 2, pode ser explicado devido ao maior número de processos como filtração, lavagem e secagem.

Tabela 2 Rendimento e perda de massa em diferentes pré-tratamentos

Amostras (Pré-tratamentos)	Rendimento (%)	Perda de massa (%)
PT1-G	72,38 ± 2,31	27,62 ± 2,31
PT2-G	62,83 ± 2,01	37,17 ± 2,01
PT1-M	70,91 ± 2,98	29,09 ± 2,98
PT2-M	61,13 ± 3,11	38,87 ± 3,11
PT1-P	70,02 ± 3,13	29,98 ± 3,13
PT2-P	59,97 ± 3,28	40,03 ± 3,28

Fonte: Elaborado pelo autor

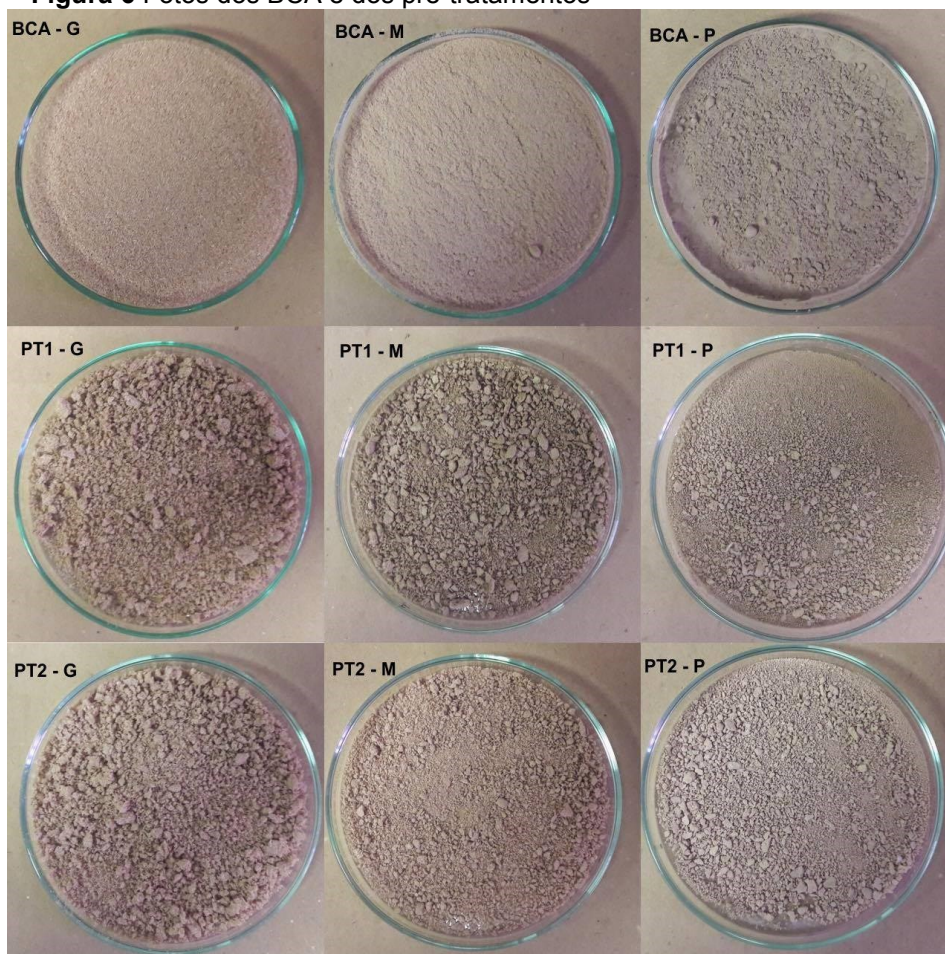
Como citado anteriormente, o bagaço de cana-de-açúcar possui diferentes concentrações de celulose, hemicelulose e lignina em sua composição, a Tabela 3 demonstra que o tamanho da partícula influenciou nos teores de celulose, hemicelulose e lignina após os pré-tratamentos. Observou-se que quanto menor foi o tamanho das partículas após os pré-tratamentos, ocorreu um aumento no teor de celulose quando comparado ao BCA e aos diferentes tamanhos de partículas. A hemicelulose, lignina e teor de cinzas, mostraram um decréscimo também com a diminuição do tamanho das partículas. Os resultados demonstram que os pré-tratamentos empregados e a diminuição do tamanho das partículas, ajudam na solubilização da lignina e ataque da hemicelulose, melhorando assim as concentrações de celulose presentes no meio, porém os resultados não apresentam uma diferença significativa segundo o teste estatístico *t* de *student*.

Tabela 3 Composição química das amostras

Amostras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Teor de cinzas (%)
BCA-G	40,44 ± 0,42	34,96 ± 0,38	23,55 ± 0,45	1,55 ± 0,03
BCA-M	40,27 ± 0,28	34,72 ± 0,47	23,58 ± 0,53	1,54 ± 0,05
BCA-P	40,00 ± 0,26	35,13 ± 0,49	23,49 ± 0,42	1,55 ± 0,05
PT1-G	54,73 ± 0,32	29,74 ± 0,31	13,64 ± 0,37	2,01 ± 0,03
PT2-G	60,00 ± 0,73	25,73 ± 0,42	13,57 ± 0,52	0,41 ± 0,04
PT1-M	59,85 ± 0,64	28,61 ± 0,56	11,45 ± 0,41	1,87 ± 0,06
PT2-M	62,73 ± 0,89	26,94 ± 0,38	10,13 ± 0,43	0,35 ± 0,04
PT1-P	60,14 ± 0,94	27,98 ± 0,59	10,33 ± 0,36	1,83 ± 0,07
PT2-P	63,64 ± 1,12	26,87 ± 0,32	9,33 ± 0,39	0,34 ± 0,04

Fonte: Elaborado pelo autor

Como demonstrado na Figura 6, após os pré-tratamentos ocorre uma leve alteração na coloração, principalmente nos pré-tratamentos utilizando menores partículas como já se era esperado, devido a utilização de produtos químicos, pode-se observar também uma aglomeração ao decorrer dos pré-tratamentos.

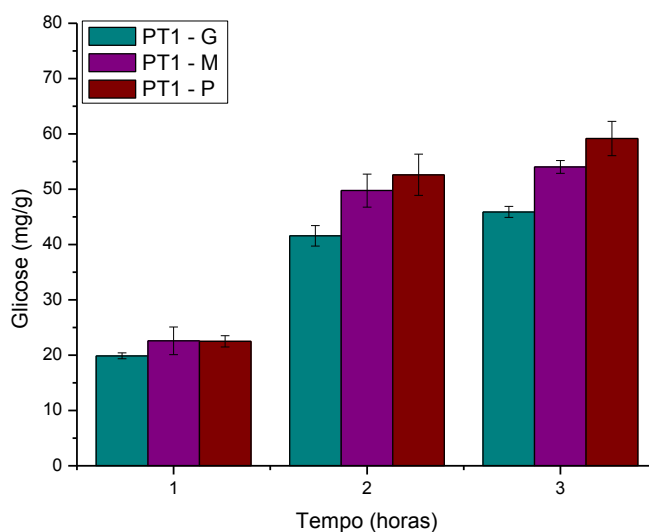
Figura 6 Fotos dos BCA e dos pré-tratamentos

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Teor de glicose na hidrólise ácida diluída (6 %)

4.2.1 Glicose liberada no pré-tratamento 1

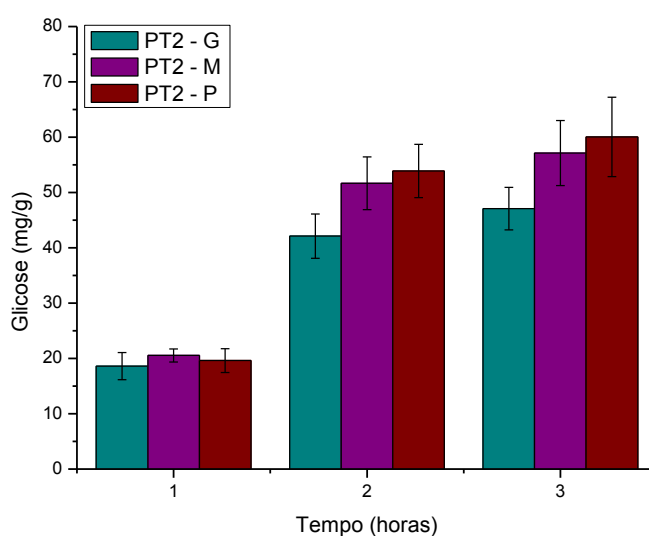
Durante a hidrólise, a glicose é produzida principalmente a partir da celulose. A glicose liberada no hidrolisado utilizando as amostras resultantes do pré-tratamento 1 com diferentes tamanhos de partículas (G, M e P), mostraram um aumento com o decorrer do tempo de hidrólise, e também um aumento referente a diminuição das partículas como demonstrado na Figura 7. O melhor resultado apresentado foi referente ao PT1-P após 3 horas de hidrólise com uma concentração de $59,17 \pm 3,11$ mg/g.

Figura 7 Glicose liberada PT1-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2.2 Glicose liberada do pré-tratamento 2

Ao decorrer do tempo de hidrólise, foi observado um aumento nas concentrações de glicose, onde a maior concentração foi observada com 3 horas de reação para o PT2-P ($60,04 \pm 7,19$ mg/g) como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 Glicose liberada PT2-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

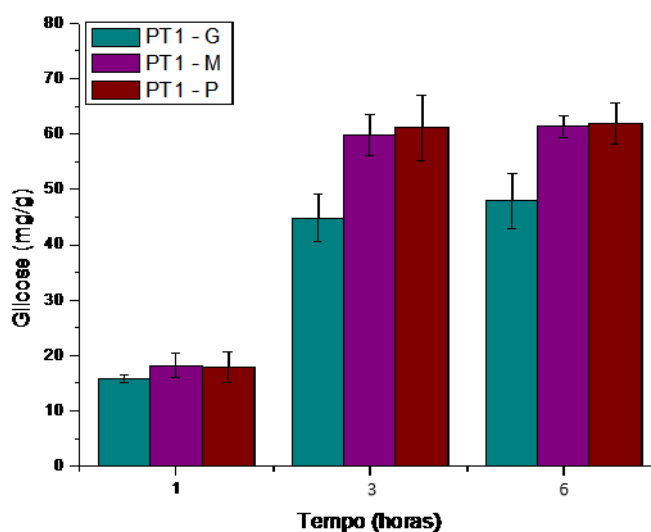
De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.3 Teor de glicose na hidrólise ácida concentrado (30 %)

4.3.1 Glicose liberada do pré-tratamento 1

Ao decorrer do tempo de reação nota-se um aumento da glicose, atingindo seu máximo com 3 horas de reação com uma concentração de $61,86 \pm 3,74$ mg/g para o PT2-P, observa-se também, que a diferença do tempo de hidrólise a partir de 2 horas, não apresentaram variações significativas na concentração de glicose (Figura 9).

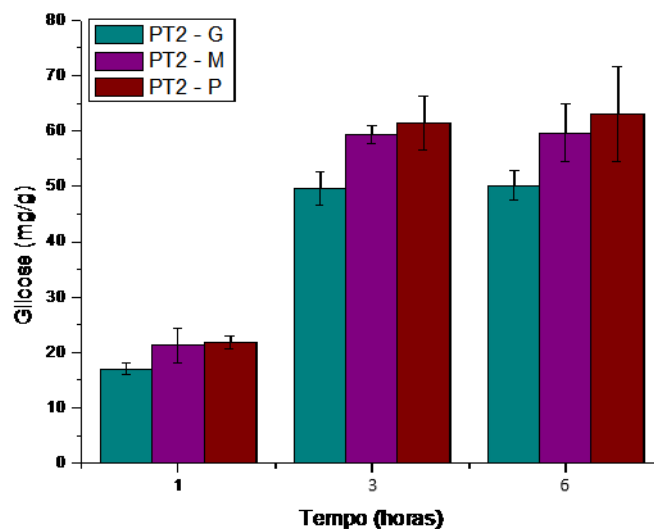
Figura 9 Glicose liberada PT1-30 %



Fonte: Elaborado pelo autor

4.3.2 Glicose liberada do pré-tratamento 2

A glicose liberada no processo de hidrólise concentrada, mostra um aumento ao decorrer do tempo de reação com um máximo de $63,11 \pm 8,51$ mg/g do PT2-P referente a 3 horas (Figura 10). Após 3 horas de reação nota-se uma variação pequena nas concentrações de glicose quando comparado com 6 horas.

Figura 10 Glicose liberada PT2-30 %

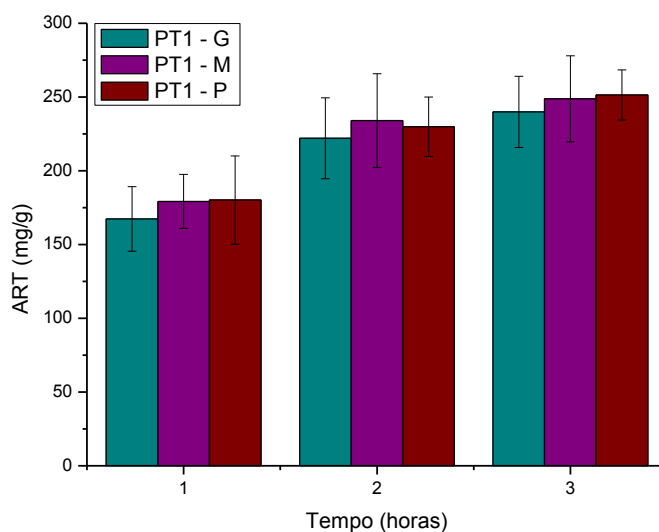
Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.4 Teor de açúcar redutor total (ART) na hidrólise ácida diluída (6 %)

4.4.1 ART liberado do pré-tratamento 1

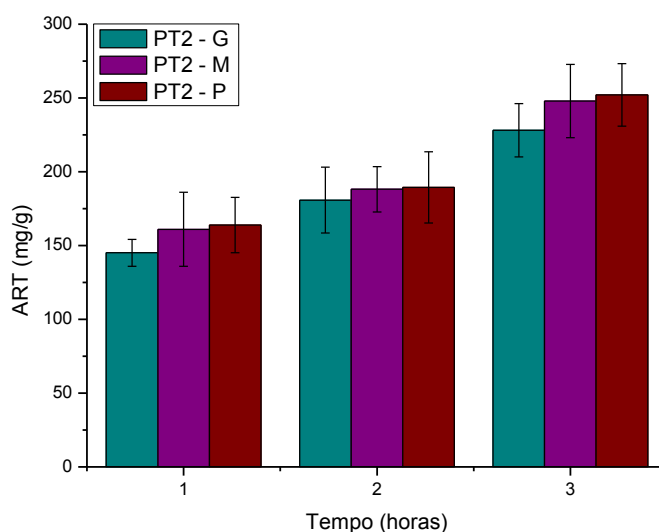
Ao decorrer do tempo de hidrólise, nota-se um aumento nas concentrações de ART, com um máximo de $251,37 \pm 17,02$ mg/g para o PT1-P com 3 horas (Figura 11). A maior concentração de ART, está no maior tempo de reação e menor tamanho de partícula (PT1-P com 3 horas de reação), mostrando assim, uma melhora de 4,76 %, com a diminuição do tamanho das partículas no processo.

Figura 11 ART liberado PT1-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

4.4.2 ART liberado do pré-tratamento 2

O ART liberado no processo de hidrólise utilizando o pré-tratamento 2, apresentou uma melhor concentração com o tempo de 3 horas para o PT2-P com valor de $252,16 \pm 21,19$ mg/g, como demonstrado na Figura 12. O tempo e tamanho de partículas, influenciam na liberação de ART, onde os melhores resultados foram observados às 3 horas de reação com um menor tamanho de partícula (P).

Figura 12 ART liberado PT2-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

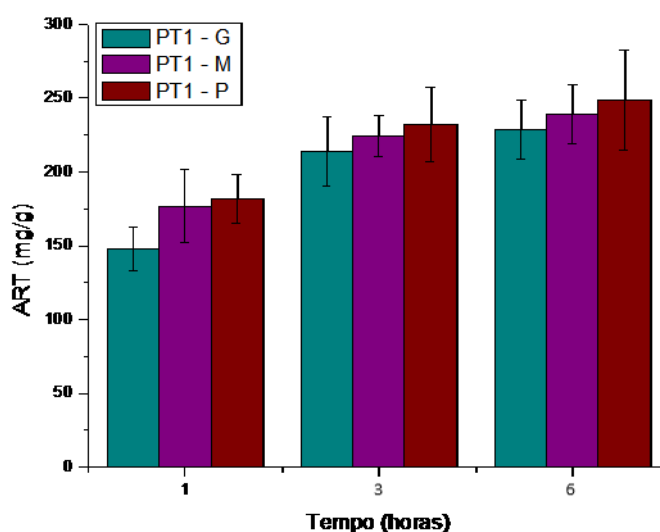
De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.5 Teor de açúcar redutor total (ART) na hidrólise ácida concentrada (30 %)

4.5.1 ART liberado do pré-tratamento 1

Na hidrólise ácida concentrada do material intitulado PT1, nota-se um aumento nas concentrações de ART com o decorrer do tempo de reação, e também um aumento na concentração referente a diminuição no tamanho das partículas. A concentração máxima observada é de $248,9 \pm 3,96$ mg/g para o PT1-P com 6 horas de reação como demonstrado na Figura 13.

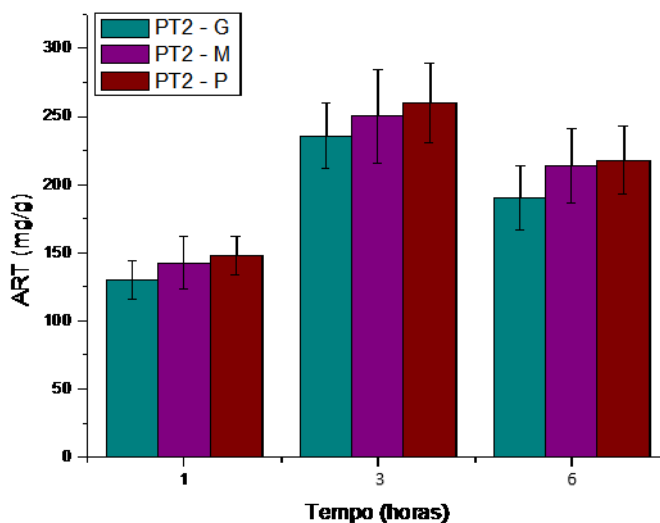
Figura 13 ART liberado PT1-30 %



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2 ART liberado do pré-tratamento 2

A concentração máxima de ART observada foi de $259,98 \pm 29,09$ referente ao PT2-P com 3 horas de hidrólise. Observou-se na Figura 14, um aumento nas concentrações de ART até 3 horas de reação, após este tempo, ocorreu uma diminuição de ART no meio nos 3 diferentes tamanhos de partículas, que pode estar relacionada a degradação destes açúcares com o passar do tempo de hidrólise.

Figura 14 ART liberado PT2-30 %

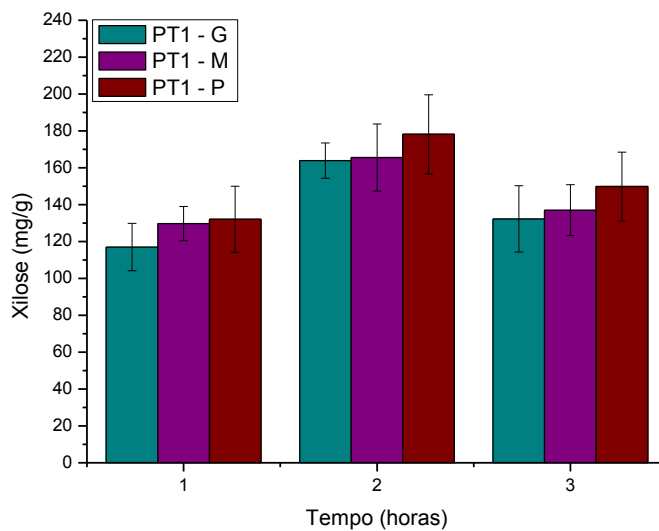
Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.6 Teor de xilose na hidrólise ácida diluída (6 %)

4.6.1 Xilose liberada do pré-tratamento 1

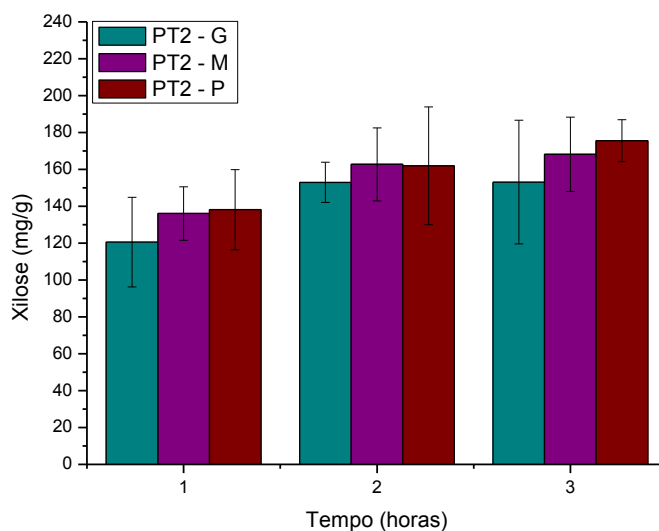
As concentrações de xilose máxima observada na Figura 15 ao decorrer da hidrólise, foi de $178,13 \pm 21,41$ mg/g referente ao PT1-P com 2 horas de reação. Pode-se observar também, uma diminuição da concentração após 2 horas de reação, que pode estar sendo causada, pela degradação deste açúcar pelo tempo de hidrólise.

Figura 15 Xilose liberada PT1-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

4.6.2 Xilose liberada do pré-tratamento 2

No processo de hidrólise do material intitulado PT2, ocorre um aumento nas concentrações de xilose como demonstrado na Figura 16, onde apresenta seu máximo com 3 horas de reação com um valor de $175,61 \pm 11,4$ mg/g para o PT2-P.

Figura 16 Xilose liberada PT2-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

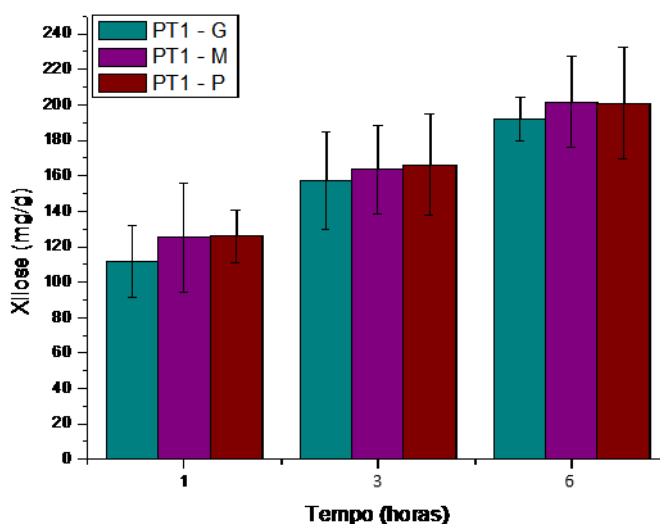
De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.7 Teor de xilose na hidrólise ácida concentrada (30 %)

4.7.1 Xilose liberada do pré-tratamento 1

No hidrolisado utilizando ácido concentrado referente ao PT1, as concentrações de xilose aumentaram ao decorrer do tempo de hidrólise, onde o maior valor observado foi de $201,74 \pm 26,01$ mg/g referente ao PT1-M (Figura 17).

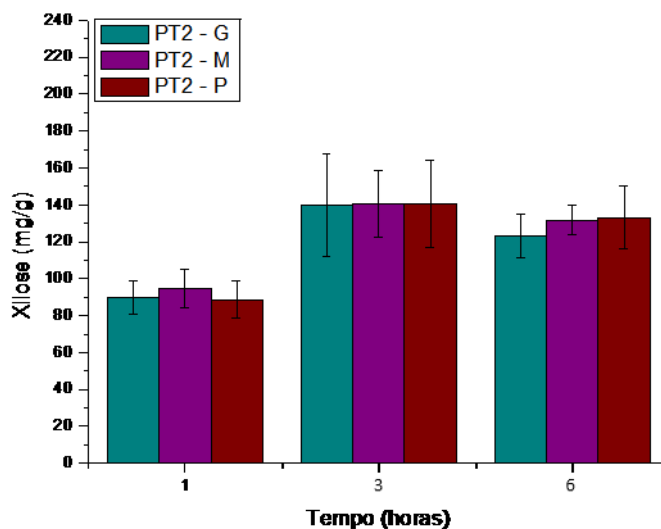
Figura 17 Xilose liberada PT1-30 %



Fonte: Elaborado pelo autor

4.7.2 Xilose liberada do pré-tratamento 2

O teor de xilose observado durante a reação de hidrólise, não apresentou um aumento significativo referente a diminuição das partículas como demonstrado na Figura 18. A variação de xilose liberada entre o tempo de 3 horas e 6 horas não apresenta variação significativa, não justificando um tempo de hidrólise maior de 3 horas.

Figura 18 Xilose liberada PT2-30 %

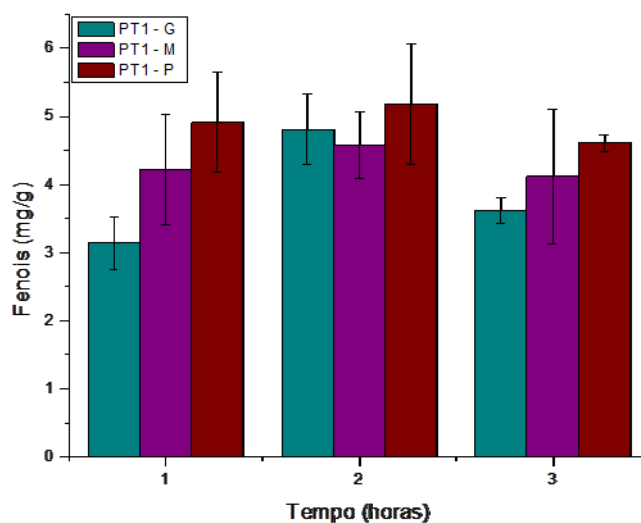
Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.8 Teor de fenóis totais na hidrólise ácida diluída (6 %)

4.8.1 Fenóis liberados do pré-tratamento 1

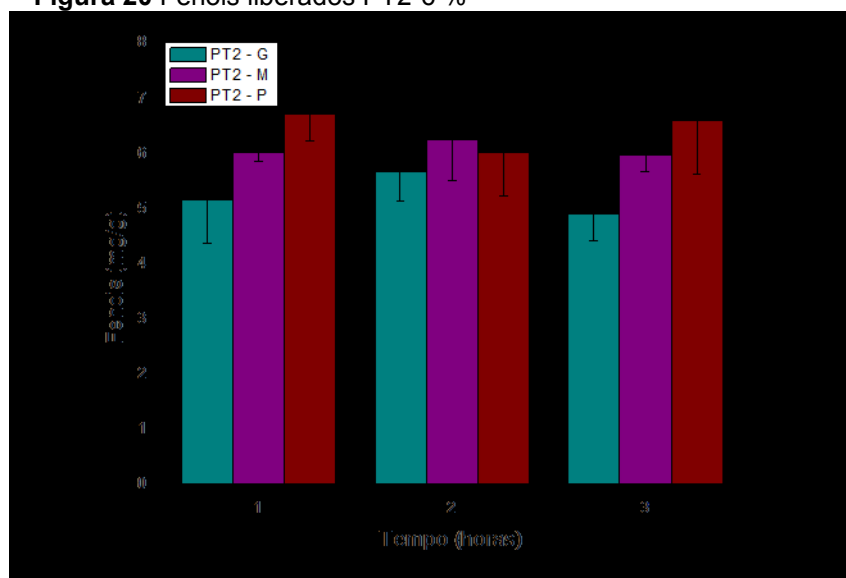
Como observado na Figura 19, a variação de Fenóis com o tempo de hidrólise, não variou significativamente, apresentando o máximo de concentração com 2 horas de reação para o PT1-P com um valor de $5,18 \pm 0,88$ mg/g.

Figura 19 Fenóis liberados PT1-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

4.8.2 Fenóis liberados do pré-tratamento 2

Como no PT1, os valores de fenóis liberados na reação de hidrólise, não variam significativamente em relação ao tempo, como pode ser observado na Figura 20, onde apresentou um máximo de $6,72 \pm 0,49$ mg/g para o PT2-G com 1 hora de reação.

Figura 20 Fenóis liberados PT2-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

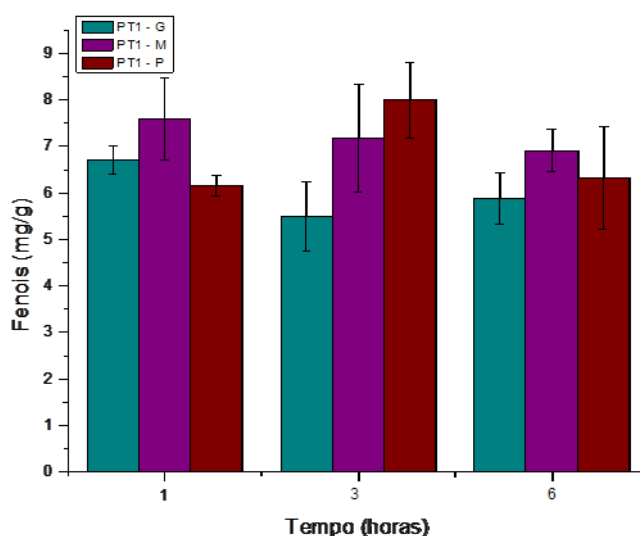
De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.9 Teor de fenóis totais na hidrólise ácida concentrada (30 %)

4.9.1 Fenóis liberados do pré-tratamento 1

Como observado na Figura 21, a quantidade de fenol produzida na reação de hidrólise concentrada (30 %), apresentou um máximo de $7,99 \pm 0,81$ mg/g para o PT2-P com 3 horas de reação.

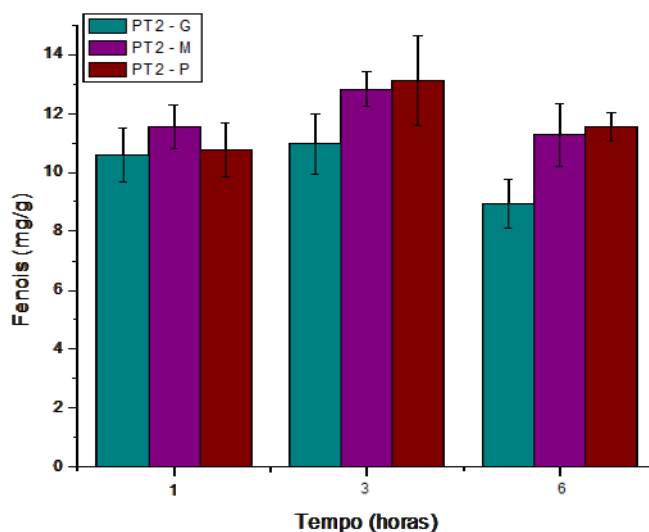
Figura 21 Fenóis liberados PT1-30 %



Fonte: Elaborado pelo autor

4.9.2 Fenóis liberados do pré-tratamento 2

O PT2, apresentou um aumento de liberação de fenol quando comparado ao PT1 nas mesmas condições de hidrólise (Figura 22), com um máximo para o PT2-P de $13,11 \pm 1,53$ mg/g com 3 horas de reação.

Figura 22 Fenóis liberados PT2-30 %

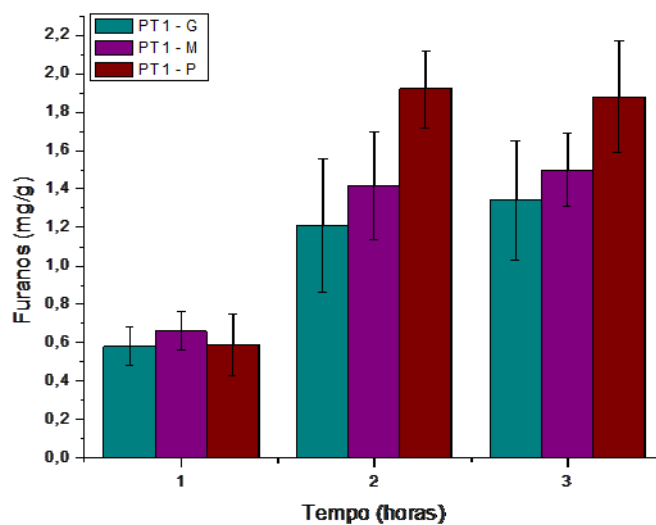
Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas, demonstrando assim uma similaridade entre elas.

4.10 Teor de furanos na hidrólise ácida diluída (6 %)

4.10.1 Furanos liberados do pré-tratamento 1

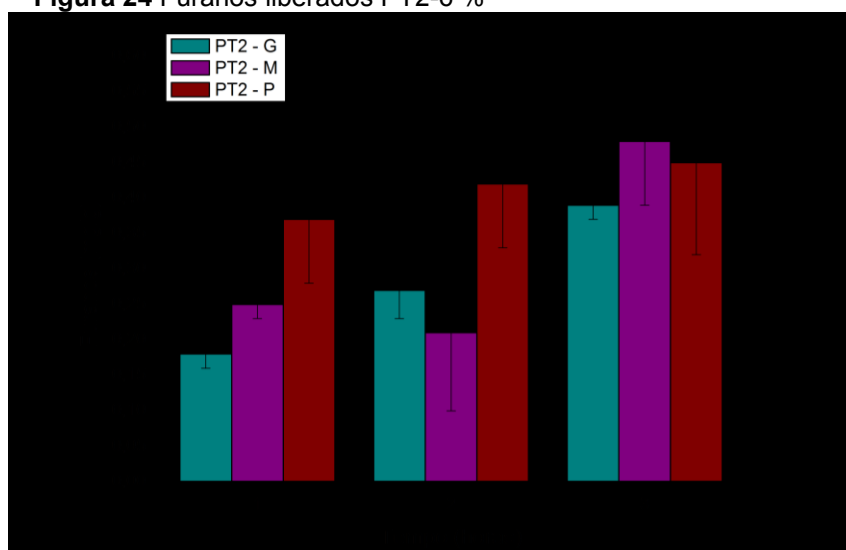
Como observado na Figura 23, ocorre um aumento da concentração de furanos ao decorrer do tempo de reação de aproximadamente 231 %. Os valores mostram que com o decorrer do tempo de hidrólise a concentração de furanos aumenta, como descrito por JÖNSSON et al., 2013, a geração de furanos é proveniente da degradação de pentoses e hexoses, onde a maior parte vem devido a degradação da xilose.

Figura 23 Furanos liberados PT1-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

4.10.2 Furanos liberados do pré-tratamento 2

Como pode-se observar na Figura 24, ocorreu um aumento referente ao tempo de hidrólise, mas quando comparados estatisticamente, a variação não é significativa. O valor máximo obtido de furanos foi de $0,48 \pm 0,09$ mg/g para o PT2-M com 3 horas de reação.

Figura 24 Furanos liberados PT2-6 %

Fonte: Elaborado pelo autor

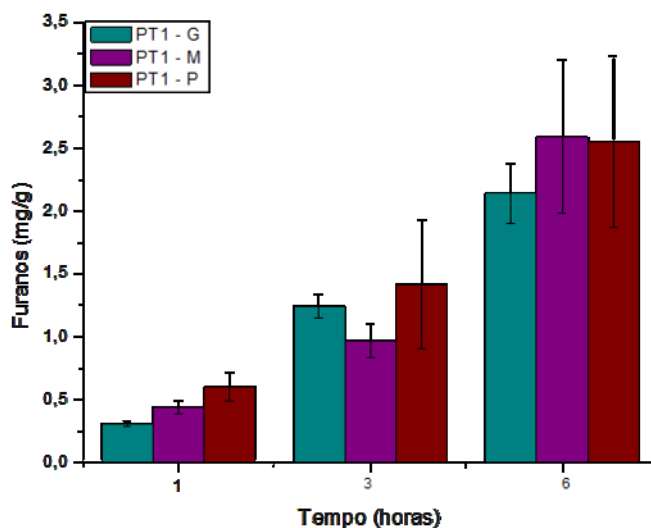
De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados mostraram-se significativas quando comparadas entre os tempos de reação para o PT1, já em relação ao tamanho das partículas as variações observadas não são significativas. Para o PT2, a variação não é significativa, para o tamanho de partícula e nem para o tempo de reação.

4.11 Teor de furanos na hidrólise ácida concentrada (30 %)

4.11.1 Furanos liberados do pré-tratamento 1

Ao decorrer do tempo de reação, observa-se (Figura 25) um aumento de aproximadamente 735 %, onde o valor máximo observado foi de $2,59 \pm 0,61$ mg/g para o PT1-M com 6 horas de reação. A variação em relação aos diferentes tamanhos de partículas, não apresentou diferenças significativas, diferentemente da diferença de valores apresentados em relação ao tempo de reação de hidrólise.

Figura 25 Furanos liberados PT1-30 %



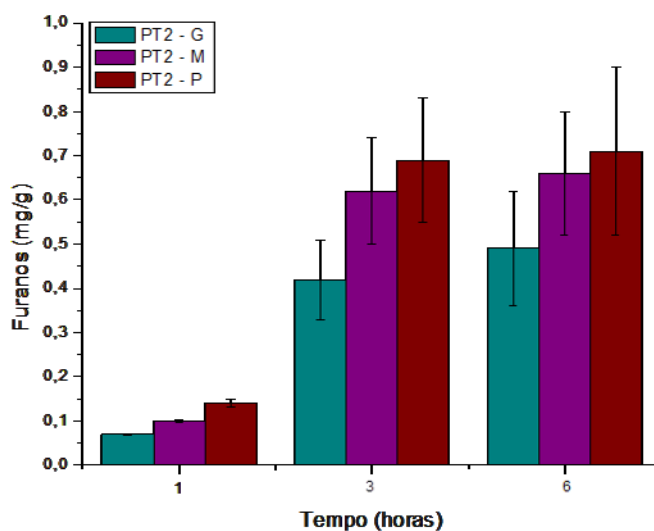
Fonte: Elaborado pelo autor

4.11.2 Furanos liberados do pré-tratamento 2

Como observado na Figura 26, o teor de furanos aumenta em relação ao decorrer do tempo de hidrólise, mantendo-se praticamente o mesmo entre 3 e 6 horas de reação. A variação que ocorre devido aos diferentes tamanhos de

partículas, mostra-se não significativa, quando realizada análise estatística. O maior teor de furanos foi observado com 6 horas de reação para o PT2-P, com um valor de $0,71 \pm 0,19$ mg/g.

Figura 26 Furanos liberados PT2-30 %



Fonte: Elaborado pelo autor

De acordo com o teste estatístico (*t student*) empregado nas análises realizadas, as variações dos resultados não se mostraram significativas quando relacionados os tamanhos das partículas, mas quando comparado ao tempo de reação são significativos.

5 CONCLUSÕES

Os resultados quando comparados entre o pré-tratamento 1 e 2, não apresentam uma variação significativa, não justificando assim, a utilização de um processo adicional.

O PT1, apresentou um teor de cinzas elevado, quando comparado ao PT2 nos 3 diferentes tamanhos, pois trata-se de um pré-tratamento básico, podendo assim estar atrapalhando na oxidação do material.

Como observado por ROLDÁN (2014), os pré-tratamentos utilizando micro-ondas demonstraram um ótimo resultado quando comparados a outros pré-tratamentos presentes na literatura, e são realizados a pressão atmosférica, baixa concentração dos reagentes (NaOH e H₂SO₄) e curto tempo de processo.

Os níveis de Fenóis totais e Furanos, aumentaram com o tempo de hidrólise, o que é ruim para o processo de produção de etanol de segunda geração, pois inibem o processo de fermentação.

Os dados obtidos nas análises dos hidrolisados, demonstram que a melhor condição para a hidrólise ácida diluída seria com 2 horas de reação e para hidrólise ácida concentrada com 3 horas de reação. Não justificando assim, um tempo maior de hidrólise.

Os resultados obtidos, mostram que se pensarmos nos custos envolvidos para instalação e manutenção de um novo moinho, para se obter partículas menores, o rendimento apresentado no presente trabalho, não justifica o gasto empregado já que estatisticamente não apresentaram diferenças significativas.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinect study of the acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO DE ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Tecnologias avançadas na agroindústria de cana-de-açúcar. In: _____. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2008. Cap. 5, p. 123-150.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. 37, p. 109-116, 2012.

BOOPATHY, R.; DAWSON, L. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **BioResources**, v. 3, n. 2, p. 452-460, 2008.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1967. v. 2, 406 p.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012. doi:10.1155/2012/989572.

CARVALHO, R. N. L. **Dilute acid and enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for biogás production**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica) - Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

DIAS, M. O. S.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSEL, C. E. V.; MACIEL, M. R. W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: Integration to conventional bioethanol production process. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1206-1216, 2009.

EBERTS, T. J.; SAMPLE, R. H. B.; GLICK, M. R.; ELLIS, G. H. A simplified, colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phioroglucinol. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1440-1443, 1979.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Enzymatic hydrolysis. In: _____. **Cellulose hydrolysis**. Berlin: Springer, 1987. Chap. 3, p. 21-120. (Biotechnology monographs, v. 3).

FARINAS, C. S. A parede celular vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. **Embrapa Instrumentação/Documentos**, n. 54, 2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/61175/1/DOC54-2011.pdf>>. Acesso em: 09 fev. 2016.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Water de Gruyter, 1989. 613 p.

HECTOR, R.; HUGLES, S.; LIANG-LI, X. Developing yeast strains for biomass-to-ethanol production. **Biomass Magazine**. Disponível em: <<http://biomassmagazine.com/articles/1533/developing-yeast-strains-for-biomass-to-ethanol-production>>. Acesso em: 28 set. 2016.

HENRIQUE NETO, S. **A defesa do etanol**: as estratégias da União da Indústria de Cana-de-açúcar (ÚNICA) frente a US Environmental Protection Agency (EPA), de 2002 a 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Relações Internacionais) - Instituto de Filosofia e Ciência Humanas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 1-10, 2013.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Use of UV absorbance to monitor furans in dilute acid hydrolysates of biomass. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 637-641, 2000.

McCLEARY, B. V.; SHAMMER, I.; GLENNIE-HOLMES, M. Measurement of (1 → 3), (1 → 4)-β-D-Glucan. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 545-551, 1988.

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

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. Procedimentos para análise lignocelulósica. **Embrapa Algodão/ Documentos**, n. 236, 2010. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883400/1/DOC236.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2016.

MOSIER N.; WYMAN C. E.; DALE B. E.; ELANDER R. T.; LEE Y. Y.; HOLTZAPPLE M.; LADISCH M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PENG, F.; PENG, P.; XU, F.; SUN, R. C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 870-903, 2012.

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

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Exports and trade**. Washington, DC. Disponível em: <<http://ethanolrfa.org/issues/exports-and-trade/>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

RODRIGUES, R. C. L. B.; ROCHA, G. J. M.; RODRIGUES JUNIOR, D.; IZÁRIO FILHO, H. J.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA JUNIOR, A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1247-1253, 2010.

ROLDÁN, I. U. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise ácida e sua caracterização química e estrutural, visando a produção de etanol de segunda geração**. 2014. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 14, p. 841-845, 2008.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, A. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S.; SANTOS, D. T.; CONVERTI, A. Technical/economical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. **Chemical Engineering Technology**, v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SCHUCHARDT, U.; DUARTE, H. C. Hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid, promoted by metallic cations. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 36, p. 329-334, 1986.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

TEIXEIRA, E. M.; BONDANCIA, T. J.; TEODORO, K. B. R.; CORRÊA, A. C.; MARCONCINI, J. M.; MATTOSO, L. H. C. Sugarcane bagasse whiskers: extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 63-66, 2011.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. (Ed.). **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2002. UNIT I1.1.1-I1.1.8.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; CHENG, Q.; WU, G.; YU, F.; WAG, C.; JIN, S. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v. 94, n. 3, p. 437-442, 2006.

APÊNDICE

Figura 27 Curva padrão de ART

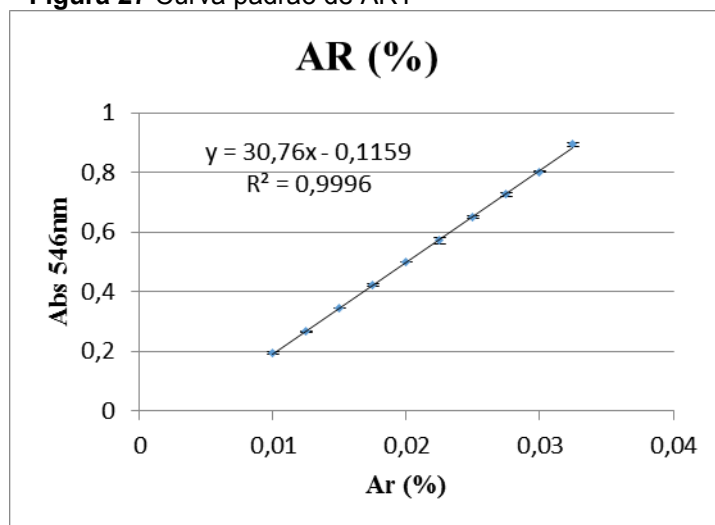


Figura 28 Curva padrão de glicose

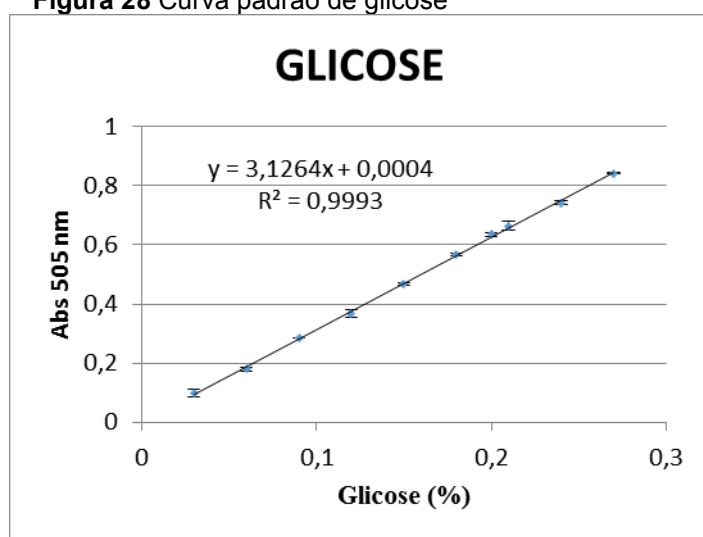
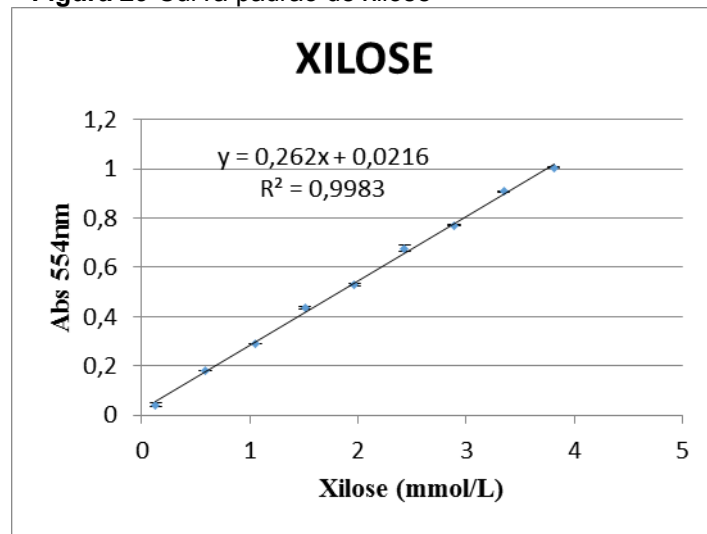


Figura 29 Curva padrão de xilose**Figura 30** Curva padrão de fenóis totais