

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SISTEMAS ENERGÉTICOS E MEIO AMBIENTE

MARTHA SUZANA RODRIGUES DOS SANTOS

ESTUDO DE PRÉ - TRATAMENTOS DE PALHA E SABUGO DE MILHO
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

Maceió

2014

MARTHA SUZANA RODRIGUES DOS SANTOS

**ESTUDO DE PRÉ - TRATAMENTOS DE PALHA E SABUGO DE MILHO
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em engenharia química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Roberto de Oliveira Pimentel

Maceió
2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário: Valter dos Santos Andrade

S237e Santos, Martha Suzana Rodrigues dos.
Estudo de pré-tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G / Martha Suzana Rodrigues dos Santos. -- 2014.
74 f. : il., tabs.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida
Co-orientador: Wagner Roberto de Oliveira Pimentel.
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 68-74.

1. Biomassa lignocelulósica. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrólise enzimática.
4. Fermentação. I. Título.

CDU: 661.722

Martha Suzana Rodrigues dos Santos

**ESTUDO DE PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA E SABUGO DO MILHO
VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 26 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Renata Almeida

Prof^ª. Dr^ª. Renata Maria Rosas Garcia Almeida
(PPGEQ/UFAL - Orientadora)

Wagner Roberto de Oliveira Pimentel

Prof. Dr. Wagner Roberto de Oliveira Pimentel
(PPGEQ/UFAL - Coorientador)

João Inácio Soletti

Prof. Dr. João Inácio Soletti
(PPGEQ/UFAL)

Antonio José Gonçalves da Cruz

Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz
(UFSCar – Membro Externo)



AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que me deu a vida e me concede a cada dia forças para prosseguir em minha caminhada;

Aos meus pais, que me ensinaram a viver e me fizeram ser quem sou hoje, acreditaram em mim e me incentivaram para que eu chegasse até aqui;

A minha irmã Ana Lídia, que me ajudou nesta jornada;

Ao meu marido José Augusto, que esteve do meu lado nos momentos críticos e sempre me fortaleceu e mostrou minha capacidade;

A todos os familiares que direta ou indiretamente contribuíram para o meu sucesso;

Aos professores Renata Rosas e Wagner Pimentel, que aceitaram me orientar neste trabalho e me ajudaram em todos os aspectos da construção dessa dissertação;

Aos professores da banca João Inácio Soletti e Antônio José Gonçalves da Cruz que tiveram a disposição de avaliar esse trabalho;

A equipe da UFSCar, pelo acompanhamento no estágio realizado no laboratório de engenharia bioquímica e por fazer o possível pra que eu ficasse bem instalada nos dias que passei em São Carlos;

Aos alunos do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos – LTBA, da UFAL, pela contribuição nas análises, experimentos e conhecimentos;

A mestranda e técnica do LTBA Margarete Cabral dos Santos Silva, por contribuir esclarecendo diversas dúvidas e ajudando em muitos aspectos desse trabalho;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos os professores do curso de Engenharia Química da UFAL, que ao longo do mestrado enriqueceram a minha bagagem de conhecimentos não só técnicos, mas também de situações de vida que, para mim, serviram de exemplos.

Obrigada a todos!

RESUMO

No panorama energético atual, nota-se que a utilização do petróleo e seus derivados ainda têm representado a maior fonte de energia em nosso país. Visto que essas fontes são não renováveis e poluentes, a necessidade de utilização de outras rotas, que sejam mais limpas, tem crescido ao longo dos anos. Quando se trata de materiais lignocelulósicos para a produção do bioetanol, encontra-se uma ampla variedade de biomassas, como é o caso da palha e do sabugo do milho. Porém essas biomassas possuem uma estrutura complexa, que dificulta as etapas posteriores de hidrólise. Logo, torna-se imprescindível a realização de um pré-tratamento que irá alterar essa estrutura, tornando-a mais acessível ao ataque de microrganismos e enzimas. Nesse trabalho, dois tipos de pré-tratamentos foram estudados, o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e o pré-tratamento hidrotérmico, com o intuito de avaliar o mais viável, levando em conta todos os fatores envolvidos. O planejamento experimental foi uma ferramenta utilizada para a escolha das melhores condições operacionais do pré-tratamento com ácido diluído. Uma caracterização química foi realizada para avaliar a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico. Análises de poder calorífico superior (PCS) também foram realizadas com as duas matérias-primas e os resultados do PCS foram de 17.276,5 J/g para a palha de milho e de 17.872,0 J/g para o sabugo. Em relação ao pré-tratamento hidrotérmico realizado, os resultados mostraram redução nos três componentes: celulose, hemicelulose e lignina. O ideal é que a celulose sofra desorganização, contudo que não seja degradada, porém aqui se avaliou a melhor condição pela menor remoção de celulose, que foi dada com o pré-tratamento da palha de milho sob as condições de 170°C por 15 minutos e com o pré-tratamento do sabugo sob as condições de 195°C por 10 minutos. Já com relação ao pré-tratamento ácido, que ocorreu com utilização dos fatores: concentração de ácido sulfúrico, temperatura e tempo de aquecimento, um planejamento experimental em estrela com triplicata no ponto central mostrou que maiores percentuais de ART são dados quando se trabalha com baixas concentrações de ácido e elevadas temperaturas, na faixa investigada. O fator tempo não se mostrou significativo. As melhores condições foram obtidas nos ensaios 3 e 12 para ambas as biomassas. Com a temperatura de 120°C, tempo de 15 minutos e 0,5% de concentração de ácido sulfúrico, condição 3, obteve-se 50,9% de ART para a palha e 42,6% para o sabugo. Já com a temperatura de 110°C, tempo de 7 minutos e 2% de ácido, que foi a condição 12, obteve-se 59,4% de ART para a palha e 61,5% para o sabugo.

Palavras-chave: Biomassa lignocelulósica; Pré-tratamento; Hidrólise; Fermentação.

ABSTRACT

Petroleum and its derivatives make up the largest portion of Brazil's current energy matrix. It is well known that these are non-renewable and pollution-causing sources of energy; as such, the last decades have been marked by research and development of new, cleaner technologies. One of them being the hydrolysis of lignocellulosic materials to produce bioethanol. Brazil has an ample variety and large volumes of lignocellulosic biomass like corn husk and corncob. However, these biomass sources have complex structures which give rise to difficulties during the posterior stages of hydrolysis. Thus, it becomes necessary to conduct a pretreatment in order to alter these complex structures and make them more accessible to attack by microorganisms and enzymes. This work investigated two pretreatment methods for biomass coming from corn husk and corncob: pretreatment with dilute sulfuric acid and hydrothermal pretreatment; aiming to determine which method was more suitable for the given experimental conditions. An experimental design method was used to determine the best operating conditions for the acid pretreatment. Chemical characterization was used to evaluate the efficiency of the hydrothermal pretreatment. Both biomass sources were analyzed via Superior Calorific Power (SCP) resulting in 17.276,5 J/g for corn husk and 17.872,0 J/g for corncob. Regarding the hydrothermal pretreatment, results showed reduction of the three components of biomass: cellulose, hemicellulose and lignin. Ideally, cellulose should not be degraded during the pretreatment. Therefore, the conditions leading to the lowest cellulose removal were determined: corn husk pretreatment at 170°C for 15 minutes and corncob pretreatment at 195°C for 10 minutes. The factors evaluated during the sulfuric acid pretreatment were: concentration, heating time and temperature. The two-variable factorial experiment with three replicates suggested that the highest reduced sugar percentages are obtained with low acid concentrations and high temperatures. Moreover, time was not a significant factor. Test 3 and 12 yielded the best results for both sources of biomass. The conditions for test 3 were: 120°C, a 15 minutes heating time and 0,5% sulfuric acid which resulted in 50,9% reduced sugars for corn husk and 42,6% for corncob. The conditions for test 12 were: 110°C, a 7 minutes heating time, and 2% sulfuric acid which resulted in 59,4% reduced sugars for corn husk and 61,5% for corncob.

Keywords: lignocellulosic biomass; pretreatment; hydrolysis; fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Repartição da oferta de energia no Brasil em 2011.....	17
Figura 2 - Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.....	18
Figura 3 - Constituição geral dos materiais lignocelulósicos.....	20
Figura 4 - Estrutura da celulose.....	20
Figura 5 - Estrutura parcial da hemicelulose.....	21
Figura 6 - Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina. ...	22
Figura 7 - Alterações estruturais na estrutura lignocelulósica determinadas pelo pré-tratamento.....	26
Figura 8 - Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose.....	31
Figura 9 - Fluxograma das etapas envolvidas no estudo dos pré-tratamentos ácido e hidrotérmico.....	34
Figura 10 - Sabugo de milho em processo de secagem em estufa.....	35
Figura 11 - Palha de milho em processo de secagem em estufa.....	36
Figura 12 - Sabugo sendo triturado em liquidificador industrial.....	36
Figura 13 - Palha sendo cominuída em um moinho de facas.....	36
Figura 14 - Palha e sabugo obtidos após trituração.....	37
Figura 15 - Equipamento determinador de umidade.....	37
Figura 16 - Calorímetro usado nas análises.....	38
Figura 17 - Reator PARR.....	39
Figura 18 - Autoclave onde foram realizados os pré-tratamento ácidos.....	45
Figura 19 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões, respectivamente, para o ART da palha no nível inferior de tempo.....	55

Figura 20 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões para a Acidez da palha no nível inferior de tempo.	57
Figura 21 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões para o ART do sabugo no nível inferior de tempo.	58
Figura 22 - Superfícies de resposta em 3 e 2 D para a Acidez do sabugo no nível inferior de tempo.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção do bioetanol.	19
Tabela 2 - Poder Calorífico Superior de alguns materiais lignocelulósicos.....	25
Tabela 3 - Pré-tratamentos de matérias-primas lignocelulósicas para a obtenção de bioetanol.	26
Tabela 4 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental para as duas biomassas.	44
Tabela 5 - Diluições para preparo da curva padrão de glicose.....	47
Tabela 6 - Composição química das amostras de palha de milho in natura e após pré-tratamento hidrotérmico.	50
Tabela 7 - Composição química das amostras de sabugo de milho in natura e após pré-tratamento.	52
Tabela 8 - Matriz de planejamento: Resultados para a palha de milho.....	53
Tabela 9 - Matriz de planejamento: Resultados para o sabugo de milho.....	54
Tabela 10 - ANOVA para o modelo cúbico – ART palha.	55
Tabela 11 - ANOVA para o modelo cúbico – Acidez palha.	57
Tabela 12 - ANOVA para o modelo cúbico – ART sabugo.....	58
Tabela 13 - ANOVA para o modelo cúbico – Acidez sabugo.	59
Tabela 14 - Poder calorífico superior das biomassas em estudo.	60
Tabela 15 - Condições escolhidas para a realização da hidrólise enzimática e fermentação...	61
Tabela 16 - Teor de umidade dos materiais.....	61
Tabela 17 - Rendimento mássico obtido após pré-tratamentos.....	62
Tabela 18 – Resultados obtidos após as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AFEX	Ammonia Fiber Explosion
ANOVA	Analysis of Variance
ATP	Adenosina trifosfato
CBHs	Glucanohidrolases
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
GHs	Glucanohidrolases
HMF	Hidroximetilfurfural
NAD	Nicotinamida Adenosina Dinucleotídeo
PCI	Poder Calorífico Inferior
PCS	Poder Calorífico Superior
pH	Potencial hidrogeniônico
PID	Controlador proporcional integral derivativo
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos	14
1.1.1	Geral	14
1.1.2	Específicos.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Biomassa	16
2.1.1	Fontes de Obtenção do Bioetanol.....	17
2.1.2	Biomassa Lignocelulósica	18
2.1.3	A Palha e o Sabugo do Milho para Produção de Etanol 2G.....	23
2.1.4	Caracterização Química da Matéria-Prima.....	24
2.2	Pré-Tratamentos de Materiais Lignocelulósicos.....	25
2.2.1	Pré-Tratamentos por Métodos Químicos.....	27
2.2.2	Pré-Tratamentos por Métodos Combinados	27
2.2.3	Pré-tratamentos Biológicos	29
2.2.4	Pré-tratamentos Físicos	29
2.2.5	Formação de Inibidores	29
2.3	Hidrólise do Material Lignocelulósico	30
2.3.1	Hidrólise Enzimática	30
2.4	Fermentação da Biomassa.....	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Matéria Prima	35

3.2	Higienização, Secagem e Trituração para obtenção da farinha	35
3.3	Determinação do Teor de Umidade.....	37
3.4	Determinação do Poder Calorífico Superior	38
3.5	Pré-Tratamento Hidrotérmico	39
3.5.1	Caracterização Química do Material <i>In Natura</i> e Após Pré-tratamento Hidrotérmico	40
3.5.1.1	Extrativos	40
3.5.1.2	Hidrólise com Ácido Sulfúrico 72%	40
3.5.1.3	Determinação de Lignina Insolúvel na Fração Sólida	41
3.5.1.4	Determinação de Lignina Solúvel na Fração Líquida.....	41
3.5.1.5	Determinação de Carboidratos, Ácidos Orgânicos, Furfural e Hidroximetilfurfural na Fração Líquida	41
3.5.1.6	Determinação de Cinzas.....	42
3.5.1.7	Determinação de Proteínas.....	42
3.6	Pré-Tratamento com Ácido Sulfúrico.....	43
3.6.1	Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) e Acidez	45
3.6.1.1	Preparo da Solução de Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).....	46
3.6.1.2	Hidrólise dos Açúcares Não-redutores.....	46
3.6.1.3	Reação para Determinação dos Açúcares pelo Método do DNS	46
3.6.1.4	Preparo da Curva Padrão de Glicose.....	47
3.6.1.5	Determinação da Acidez	47
3.7	Hidrólise Enzimática	48
3.8	Fermentação do Hidrolisado Enzimático	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50

4.1	Caracterização da Palha e Sabugo <i>In Natura</i> e Tratados por Pré-Tratamento Hidrotérmico	50
4.2	Matriz de Planejamento do Pré-Tratamento Ácido	53
4.2.1	Análise de Variância - Modelo Estatístico	54
4.3	Poder Calorífico Superior (PCS).....	60
4.4	Teor de Umidade das amostras de Palha e Sabugo de milho	61
4.5	Rendimentos Mássicos após Pré-Tratamentos.....	62
4.6	Etapas de Hidrólise Enzimática e Fermentação	62
5	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, com a questão do desenvolvimento sustentável sendo amplamente discutida, a busca pela ampliação da matriz energética tem sido assunto de destaque. Torna-se cada vez mais clara a necessidade do uso de biocombustíveis, substituindo a utilização em larga escala das reservas de petróleo. Nesse sentido, os materiais lignocelulósicos, que possuem em sua composição basicamente celulose, hemicelulose e lignina, se apresentam como alternativa promissora, sobre os quais existem diversas referências na literatura (DAGNINO et al., 2012).

A palha e o sabugo do milho são exemplos de matérias-primas lignocelulósicas. No Brasil, a produção de milho ficou em torno de 53 milhões de toneladas no ano de 2011 e 55 milhões de toneladas no ano de 2012, de acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (2012), mostrando que entre as principais culturas de verão, o milho tem apresentado crescimento considerável ao longo dos anos e possui grandes áreas cultiváveis em diversas regiões do país. Há, portanto, grande geração de resíduos desse produto alimentício, como é o caso da palha e do sabugo, que são na maioria dos casos subutilizados, mostrando-se promissores para a produção de etanol de segunda geração. Esse tipo de matéria-prima possui em sua constituição um teor elevado de carboidratos, que se encontram em cadeias poliméricas e podem ser sacarificados e fermentados para a obtenção de bioetanol, também chamado etanol de segunda geração (2G). O principal obstáculo para essa conversão é conseguir desmontar a resistente estrutura da biomassa lignocelulósica, e conseguir liberar os açúcares suscetíveis à fermentação de forma eficaz e que se apresente economicamente viável (SANTOS et al., 2012).

A realização de um pré-tratamento desse material tem um papel decisivo na desorganização dessa complexa estrutura química, facilitando o processo subsequente de hidrólise, uma vez que após tratado, esse material apresentará maior digestibilidade. Existem diversos tipos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos que estão sendo estudados. No geral, classificam-se em físicos, químicos, biológicos e combinados. Uma lista com as características para um pré-tratamento ideal foi construída por Mosier et al. (2005). Um pré-tratamento ideal produz um sólido pré-tratado com a mais fácil digestão, não degrada os açúcares, remove significativamente a lignina, não inibe o passo subsequente da fermentação, requer pouco ou nenhum estoque de alimentação da biomassa, pode ocorrer em reatores de tamanho razoável e custo moderado, produz resíduos sem desperdício do material sólido, tem

um alto grau de simplicidade e é efetivo a um baixo teor de umidade (PIENKOS; ZHANG, 2009).

A etapa de caracterização química da biomassa, antes e depois do tratamento, é de fundamental importância, uma vez que irá determinar o grau de eficiência do processo. Com a caracterização é possível, também, realizar estudos de valorização de materiais lignocelulósicos.

A hidrólise e posterior fermentação são as etapas subsequentes do procedimento, que determina finalmente o teor de etanol produzido ao final do processo.

A crescente demanda pela produção de etanol combustível com elevada eficiência e principalmente que se apresente sustentável, como é o caso do bioetanol, mostra a real necessidade de aumentar significativamente sua produção num futuro bem próximo. Poderá se atingir esse aumento com o aproveitamento integral da palha e sabugo do milho e de outros tipos de biomassas que viabilizem a produção de etanol 2G (SANTOS et al., 2012).

Neste contexto, foi realizado nesse trabalho um estudo de pré-tratamentos de matérias-primas lignocelulósicas (palha e sabugo de milho), bem como as etapas posteriores, para a obtenção de etanol de segunda geração.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Apresentar um estudo de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos provenientes do sabugo e da palha do milho visando a produção de etanol de segunda geração;

1.1.2 Específicos

- Caracterizar o material antes e após o pré-tratamento para avaliar a eficiência do pré-tratamento utilizado em termos de material celulósico obtido no final do processo;
- Avaliar, entre as matérias-primas sabugo e palha de milho, a de maior poder calorífico;
- Avaliar, entre os pré-tratamentos estudados, o que apresenta maior produção de etanol ao final do processo;

- Realizar um planejamento experimental verificando as melhores condições operacionais para os pré-tratamentos escolhidos;
- Realizar as etapas de hidrólise e fermentação etanólica do sabugo e palha de milho oriundos dos pré-tratamentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo apresentam-se os principais conceitos sobre a biomassa lignocelulósica, com suas propriedades e composição química, os tipos de pré-tratamentos mais utilizados na desconstrução de seus constituintes, enfatizando o pré-tratamento hidrotérmico e ácido diluído visando à produção de etanol, como também uma revisão dos conceitos principais de hidrólise enzimática e fermentação.

2.1 Biomassa

Diante do fato de que as reservas de petróleo, principais fontes de energia utilizadas no mundo, podem esgotar, é crescente a preocupação por novas rotas energéticas. Além do mais, as fontes de energia derivadas do petróleo são bastante poluentes, causando mudanças climáticas ameaçadoras e contribuindo para o aquecimento global. É nesse contexto que surgem fontes promissoras, renováveis, para a produção de etanol, as biomassas (WOLF, 2011).

De acordo com o Ministério de Minas e Energia (2007), “o termo biomassa compreende a matéria vegetal gerada pela fotossíntese e seus diversos produtos e subprodutos, tais como florestas, culturas e resíduos agrícolas, dejetos animais e matéria orgânica, contida nos rejeitos industrial e urbano.” Nessa matéria vegetal há acúmulo de energia química, que é obtida pela transformação energética da radiação solar e que pode ser convertida a etanol (ou outros produtos energéticos) ou até mesmo liberada diretamente através de processos de combustão. Desse modo, tem-se a produção de bioenergia, que é a energia produzida a partir de biomassa.

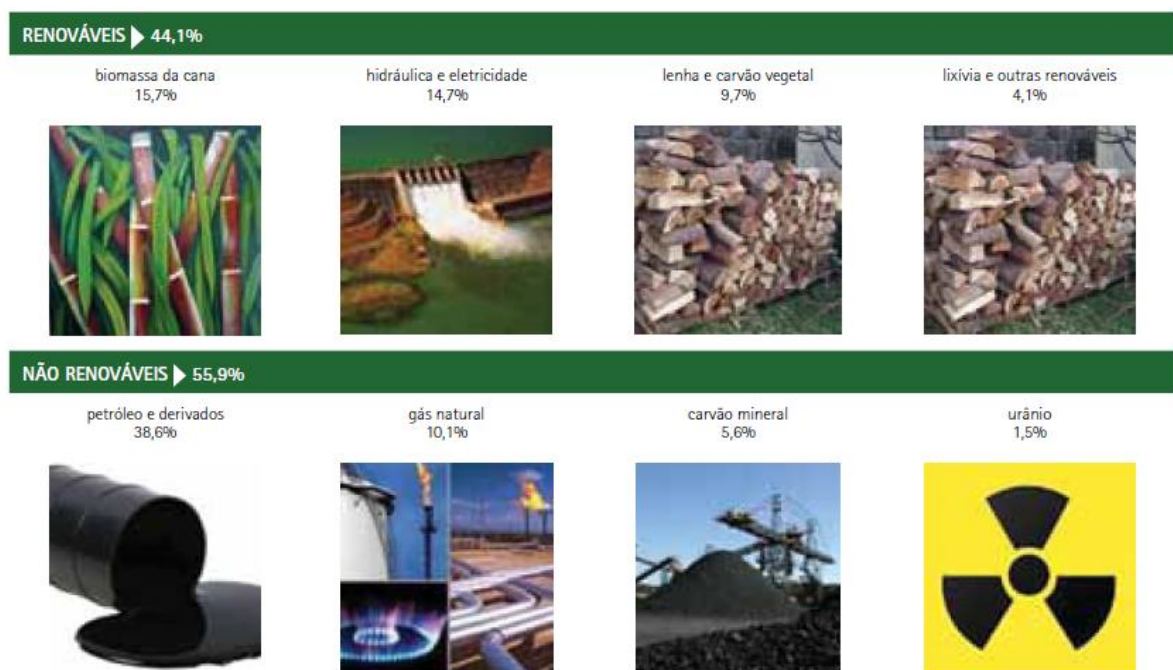
Para a obtenção dessa biomassa energética existem diversas rotas, com fontes variadas, que vão desde os resíduos agrícolas, industriais e urbanos até as culturas dedicadas. Há também uma ampla variação nas tecnologias de conversão dessas biomassas, que incluem desde uma simples combustão até processos complexos, que podem ser físicos, químicos, biológicos ou uma combinação desses (GOLDEMBERG, 2010).

Quando se trata da produção e uso de biomassas como fonte de energia, o Brasil possui condições naturais e geográficas que são bastante propícias para que o país se apresente em posição de destaque, no âmbito mundial. Entre essas condições, as mais relevantes são a vasta quantidade de terras, que possuem particularidades adequadas do solo e das condições climáticas, que podem ser agricultáveis, diversas alternativas de cultivo durante

o ano e a possibilidade da inclusão de novas áreas agricultáveis em que os impactos causados ao meio ambiente estão dentro dos limites de aceitabilidade. Além disso, o Brasil recebe intensa radiação solar durante o ano inteiro, que é a principal fonte de energia para a produção de biomassa (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2007).

Pela avaliação da Figura 1 observa-se que a matriz energética brasileira já se apresenta bastante diversificada e renovável, o que enfatiza ainda mais que o uso desses tipos de energia irá crescer ao longo dos anos.

Figura 1 - Repartição da oferta de energia no Brasil em 2011.



Fonte: Empresa de Pesquisa Energética – EPE, 2012.

2.1.1 Fontes de Obtenção do Bioetanol

O bioetanol é um combustível que pode ser produzido mediante qualquer biomassa que contenha quantidades expressivas de açúcares, amido ou celulose (SILVA, 2009).

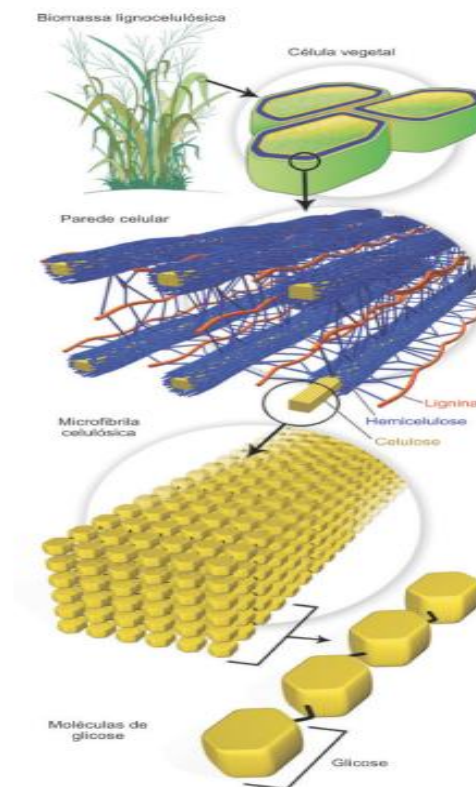
No caso das matérias sacaríneas, em que a fermentação ocorre diretamente do caldo seja da cana-de-açúcar, da beterraba ou de outra matéria, os açúcares fermentescíveis já estão disponíveis, dispensando qualquer outra etapa. O etanol aqui produzido é, no entanto, o de primeira geração, disputando com a indústria alimentícia, o que acarreta em uma grande desvantagem do uso desse tipo de fonte energética. Para o uso das matérias-primas amiláceas, como é o caso do milho, é necessária uma etapa enzimática de conversão do amido em

açúcares antes da etapa de fermentação. Com a realização dessa etapa adicional, os custos de operação são elevados e, quando comparados às matérias-primas sacaríneas, em que a fermentação é direta, o rendimento do processo é reduzido. Por fim, outra alternativa para produção de bioetanol é a partir da hidrólise da celulose disponível na matéria-prima lignocelulósica, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar e o sabugo e a palha de milho, seguida da etapa de fermentação dos açúcares disponíveis. Esse é o etanol chamado de segunda geração (BIOETANOL, 2008).

2.1.2 Biomassa Lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos, na forma de biomassas, representam a maior fonte de carboidratos naturais do mundo. Porém, possuem como principal gargalo a dificuldade de serem convertidos em insumos químicos devido às suas características químicas e morfológicas. Esses materiais são constituídos de fibras de celulose envolvidas em uma matriz amorfa, que atua na estrutura como uma barreira natural ao ataque de microrganismos e/ou enzimas, tornando esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (GOUVEIA et al., 2009). Observa-se, na Figura 2, essa estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.

Figura 2 - Estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica.



Fonte: SANTOS et al., 2012.

Percebe-se pela Figura 2, que as moléculas de glicose presentes na célula vegetal são de difícil acesso, uma vez que, pela estrutura da célula, nota-se que essas moléculas apresentam-se em um emaranhado que dificulta o acesso à glicose.

A composição química da biomassa lignocelulósica varia de acordo com o tipo de biomassa, todavia, em geral, possui: 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (SANTOS et al., 2012). Na Tabela 1, pode-se observar a composição de alguns tipos de biomassas.

Tabela 1 - Composição química de biomassas lignocelulósicas com potencial para produção do bioetanol.

Biomassa	%	%	%	%	Referência
Lignocelulósica	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros	
Palha de cana	39,8	28,6	22,5	8,6	Oliveira, 2010
Bagaço de cana	42,8	25,9	22,1	7,5	Silva, 2009
Palha de milho	54,4	16,2	23,8	8,0	Bianchi, 1995
Sabugo de milho	41,0	36,0	6,0	14,0	Goldestein, 1981
Palha de trigo	30,0	24,0	18,0	10,0	Kuhad; Singh, 1993
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussato; Roberto, 2002

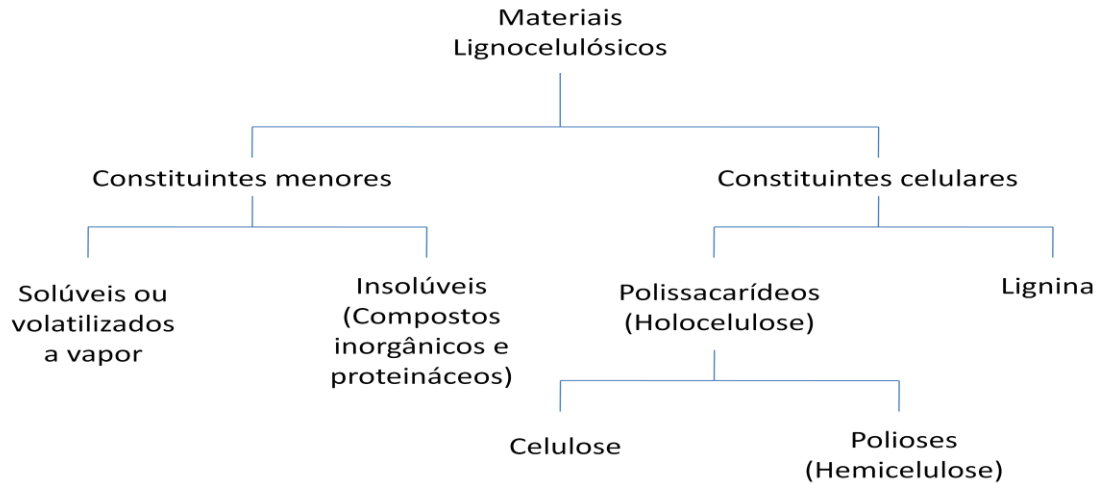
Fonte: Adaptado de WOLF, 2011.

A partir da Tabela 1, observa-se que todas as biomassas apresentadas possuem como componente principal a celulose, que é o polímero de maior interesse visto que pode ser convertido a açúcares fermentescíveis após as etapas de pré-tratamento e hidrólise, e seu processo fermentativo ocorre pelo uso de leveduras comerciais. Além disso, a utilização de materiais lignocelulósicos para a obtenção de etanol tem se tornado cada vez mais uma alternativa viável, uma vez que contribui para reduzir a competição com a indústria de alimentos e para a geração de valor agregado aos resíduos agroindustriais (DAGNINO et al., 2012).

O etanol celulósico, que é o etanol proveniente de resíduos agroindustriais, hoje em dia também é denominado etanol de segunda geração (2G). A aceitação desse tipo de combustível tem crescido ao longo dos anos e isso se deve justamente ao fato de que, com o uso em larga escala de resíduos para a produção de etanol, haverá cada vez menos a utilização de fontes alimentícias para esse fim (SIVAKUMAN et al., 2008).

Com relação a composição geral dos materiais lignocelulósicos, será apresentado a seguir os constituintes celulares (celulose, hemicelulose e lignina) e os constituintes menores. A Figura 3 mostra essa composição geral.

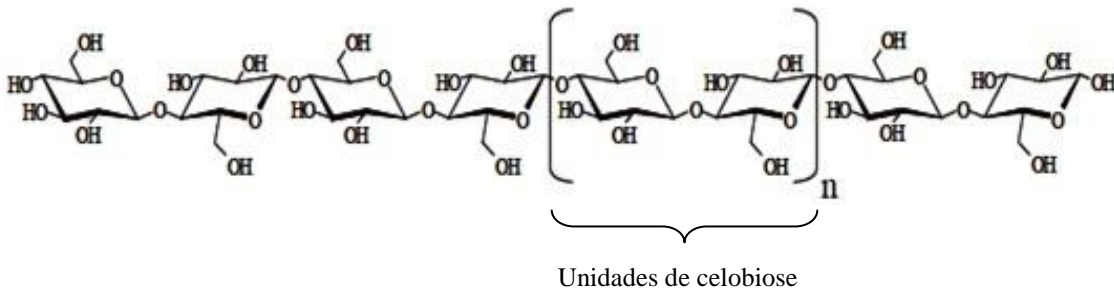
Figura 3 - Constituição geral dos materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de RUEDA, 2010.

A celulose é considerada o polímero natural de maior ocorrência no mundo e encontra-se na estrutura básica das células de todas as plantas respondendo por cerca de 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. (NASCIMENTO, 2011). É um polímero que apresenta regiões altamente ordenadas e sua unidade repetitiva é a celobiose, sendo considerado como um homopolissacarídeo (Figura 4). É constituída de unidade de β -Dglicopirranose que se ligam entre si por ligações covalentes, através dos carbonos 1-4, formando o homopolímero de anidroglicose, que apresenta fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. (RABELO, 2007; SANTOS et al., 2012).

Figura 4 - Estrutura da celulose.

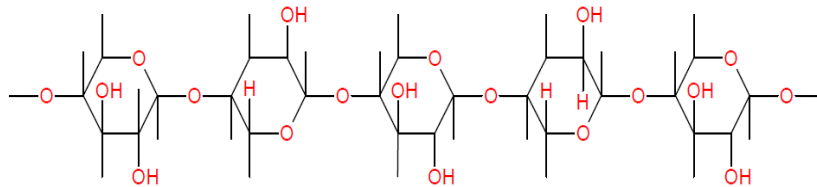


Fonte: Adaptado de TÍMÁR-BALÁZSY; EASTOP, 1998.

As hemiceluloses ou polioses são heteropolissacarídeos complexos que apresentam cadeias menores que as das celuloses. São compostas por D-glucose, D-galactose, D-manose, D-xilose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. Em relação à estrutura, são mais semelhantes às celuloses do que a lignina. As hemiceluloses são ramificadas e mais suscetíveis à hidrólise ácida, quando comparadas às celuloses, uma vez que oferecem maior acesso aos ácidos minerais normalmente usados para catalisar essas reações (CANILHA et al., 2010).

A cadeia principal de uma hemicelulose, conforme Figura 5, pode se consistir de uma só unidade, como a xilana, ou de duas ou mais unidades, como a glucomanana, unidas entre si por ligações de hidrogênio (ALVES, 2011).

Figura 5 - Estrutura parcial da hemicelulose.



Fonte: ALVES, 2011.

A lignina é um heteropolímero amorfo sintetizado por via radicalar a partir de três unidades diferentes de fenilpropanos: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico. Dependendo do grau de metoxilação do anel aromático, diz-se que a unidade básica é p-hidróxifenil (não metoxilada, derivada do álcool p-cumarílico), guaiacil (com uma metoxila, derivada do álcool coniferílico) ou siringil (com duas metoxilas, derivada do álcool sinapílico) (CARVALHO, et al., 2009).

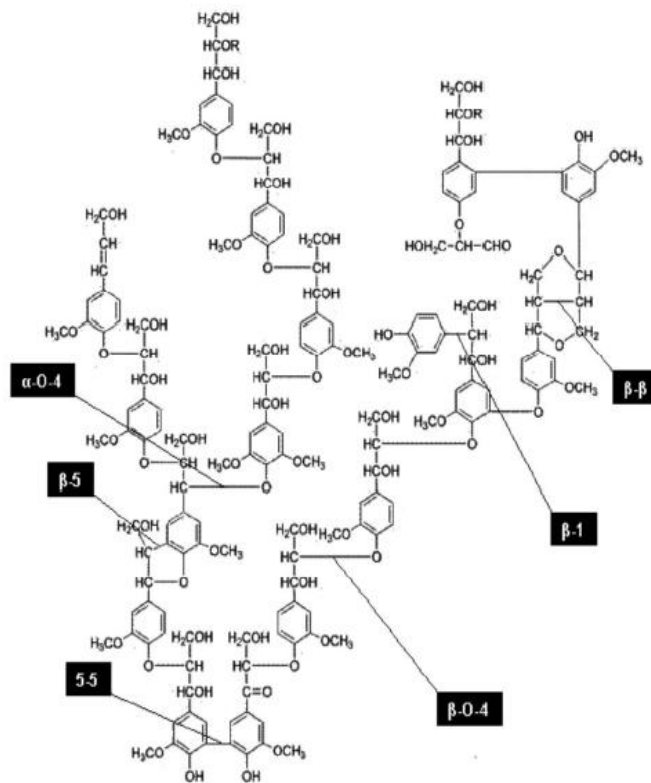
Depois da celulose, a lignina é a macromolécula orgânica mais importante e abundante dentre os materiais lignocelulósicos. Ela aumenta a resistência mecânica das plantas de tal forma que árvores de mais de 100 metros podem se manter em pé (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina representa a maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos, pois forma uma barreira física na estrutura, impedindo o aproveitamento da celulose nativa, uma vez que, pela barreira formada, as enzimas não conseguem penetrar com

facilidade, impossibilitando o acesso dessas enzimas de forma eficaz às fibras de celulose (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Na Figura 6, tem-se a representação das principais ligações entre os constituintes da lignina.

Figura 6 - Principais tipos de ligações entre as unidades básicas que constituem a lignina.



Fonte: CARVALHO et al., 2009.

Entre os constituintes menores dos materiais lignocelulósicos, como mostrado na Figura 3, estão os compostos orgânicos e inorgânicos. Os orgânicos pertencem a diferentes classes de compostos, tais como ácidos graxos, ésteres, álcoois, hidrocarbonetos entre outros. Esses compostos são os responsáveis diretos das inúmeras características que as plantas podem apresentar. Sua quantidade e composição relativa dependem de diversos fatores, como espécie, idade da planta e região de ocorrência (ANNUNCIADO, 2005).

Os compostos orgânicos solúveis ou volatilizados a vapor são chamados de extraíveis (ou extrativos), tendo a capacidade de exercer vários tipos de influência na fabricação de pasta

celulósica, tais como: redução no rendimento (quando o material possui um alto teor de extraíveis), aumento no consumo de reagentes (quando os extraíveis reagem com os agentes químicos do licor de cozimento), inibição da reação de deslignificação (impermeabilidade, solubilidade dos fragmentos de lignina, decomposição do licor), corrosão de equipamento, diminuição da qualidade da polpa, dificuldade de recuperação do licor e incrustação (RUEDA, 2010).

Já os compostos inorgânicos, que são a parte complementar dos constituintes menores, estão presentes em quantidades que variam em geral de 1 a 10%. São comumente chamados de cinzas, constituídas principalmente de sulfatos, oxalatos, carbonatos, e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, além de outros sais em quantidades menores (BIANCHI, 1995).

2.1.3 A Palha e o Sabugo do Milho para Produção de Etanol 2G

No Brasil, sabe-se que os resíduos do setor sucroalcooleiro são os mais amplamente estudados, diante da vasta disponibilidade; porém, existem outros tipos de resíduos lignocelulósicos que se apresentam como promissores para a produção do etanol 2G, como é o caso da palha e do sabugo de milho, objetos de estudo desse trabalho.

O milho é um produto usado principalmente para fins alimentícios, mas partes dessa planta não possuem um uso direto, o que gera uma subutilização desses resíduos. Surge, com isso, a possibilidade do aproveitamento desses resíduos agroindustriais, gerando produtos de alto valor agregado.

O sabugo, que é o resíduo gerado após o milho ser debulhado, e que geralmente é usado para ração animal, possui em sua composição: celulose (31,7%), hemicelulose (34,7%) e lignina (20,3%). Do mesmo modo, a palha, que na maioria dos casos é deixada no campo após a colheita, também se torna um resíduo excedente e sem utilização definida. A palha apresenta em sua composição: celulose (25-41%), hemicelulose (34,5%) e lignina (14,1%) (AGUIAR, 2010).

Com todos esses açúcares disponíveis na sua composição, esses resíduos se apresentam como promissores para produção de bioetanol. No entanto, necessitam de um pré-tratamento para que a estrutura da hemicelulose e da lignina, que dificulta o acesso de reagentes e catalisadores, possa ser rompida ou até mesmo removida, facilitando o acesso das enzimas à celulose (OLIVEIRA et al., 2011).

MacDonald et al. (1983) reportaram que quase toda a lignina na palha do milho foi dissolvida após pré-tratamento utilizando 2% de NaOH a 50°C por 15 minutos.

O processo para produção de etanol a partir da palha e do sabugo do milho envolve quatro etapas principais: pré-tratamento da matéria-prima, hidrólise do material pré-tratado, fermentação do hidrolisado e destilação do fermentado. A fração de hemicelulose e celulose devem estar acessíveis, situação conseguida pelo pré-tratamento, para em seguida serem hidrolisadas e transformadas em açúcares através do processo de hidrólise (HICKERT, 2010).

2.1.4 Caracterização Química da Matéria-Prima

A etapa de caracterização do material lignocelulósico é de fundamental importância, antes e depois das etapas de tratamento, para que se possa obter informações preciosas sobre os rendimentos ao longo dos processos. Sem ela é impossível avaliar se as condições utilizadas estão sendo favoráveis à produção do etanol, que é o objetivo principal.

É de extrema importância, portanto determinar a composição química do material para a realização de estudos de valorização de materiais lignocelulósicos. O desenvolvimento de processos para a produção de etanol a partir de biomassas envolve a otimização, de forma integrada, de todas as etapas já abordadas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação dos hidrolisados. Para que se possa avaliar a eficiência dos diferentes processos em estudo, é essencial realizar uma caracterização da composição química da biomassa utilizada durante a sua conversão nas diferentes etapas envolvidas (GOUVEIA et al., 2009).

A caracterização envolve as seguintes etapas:

- Determinação da umidade;
- Determinação do rendimento após pré-tratamento;
- Hidrólise com ácido sulfúrico 72%;
- Determinação de lignina insolúvel na fração sólida;
- Determinação de lignina solúvel na fração líquida;
- Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida;
- Determinação de cinzas na fração sólida;
- Determinação de açúcares (*kit* enzimático de glicose-oxidase ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou ainda pelo método do DNS);
- Determinação do poder calorífico da biomassa.

Quando se trata de avaliar, entre diversos tipos de matéria-prima, qual a que se apresenta como a de maior valor agregado para a produção de etanol, o poder calorífico é uma variável importante a ser medida. O poder calorífico define-se como a quantidade de energia na forma de calor liberada pela combustão de uma unidade de massa de material (JARA, 1989). No Sistema Internacional o poder calorífico é expresso em joules por grama ou quilojoules por quilograma, mas também pode ser expresso em calorias por grama ou quilocalorias por quilograma, segundo Briane e Doat (1985).

O poder calorífico pode ser classificado em superior e inferior. O poder calorífico superior (PCS) é o que a combustão se efetua a volume constante e no qual a água formada durante a combustão é condensada e o calor que é derivado desta condensação é recuperado (BRIANE; DOAT, 1985). Já o poder calorífico inferior (PCI) é a energia efetivamente disponível por unidade de massa de combustível após calcular as perdas com a evaporação da água (JARA, 1989).

Fica claro que para que se tenham bons rendimentos em termos de queima do combustível, o poder calorífico do material utilizado deve ter valores expressivos para que se possa indicar o material como bom gerador de energia (RAMOS E PAULA et al., 2011).

A Tabela 2 mostra valores para o PCS de alguns materiais lignocelulósicos encontrados na literatura.

Tabela 2 - Poder Calorífico Superior de alguns materiais lignocelulósicos.

Biomassa	PCS (J/g)
Casca de arroz	16.140
Bagaço de cana	17.330
Casca de coco	19.040
Sabugo de milho	18.770
Palha de milho	14.923

Fonte: Adaptado de GOMES, 2010; QUIRINO et al., 2005.

2.2 Pré-Tratamentos de Materiais Lignocelulósicos

Para resolver os problemas da difícil estrutura da biomassa lignocelulósica, os pré-tratamentos têm sido alternativas plausíveis que vem sendo amplamente estudadas. A difícil conversão dessa matéria-prima é aliviada quando se utiliza o pré-tratamento do material, que irá melhorar a digestibilidade química e enzimática dessa biomassa e enfim obter uma eficiente conversão dos açúcares a etanol (SILVA, 2009).

Na etapa do pré-tratamento, vários processos têm sido propostos e desenvolvidos, podendo-se destacar os físicos, químicos, biológicos ou uma combinação desses (SUN; CHENG, 2002). Alguns tipos de pré-tratamentos de cada uma dessas categorias estão dispostos na Tabela 3.

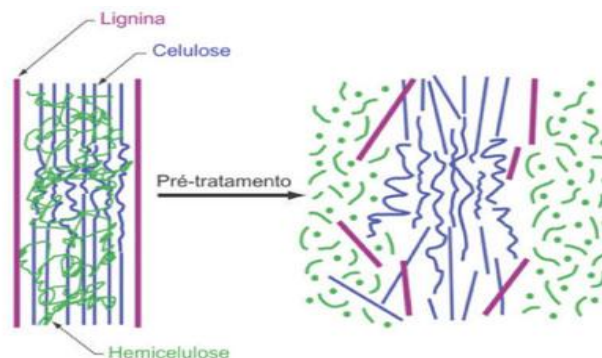
Tabela 3 - Pré-tratamentos de matérias-primas lignocelulósicas para a obtenção de bioetanol.

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Métodos combinados
Vapor	Ozonólise	Por fungos	Explosão à vapor
Radiação	Hidrólise com ácido diluído	Bioorganossolv	Hidrotérmico
Moinho de bolas	Hidrólise com ácido concentrado		SO ₂ e vapor
Umidificação	Organossolv		NO ₂ e irradiação
Pirólise	Hidrólise alcalina		Amônia e vapor (AFEX)

Fonte: Adaptado de SILVA, 2009.

Os métodos físicos têm a capacidade de converter a biomassa em pós mais finos, aumentando a superfície específica da celulose, tornando a etapa da hidrólise dessa biomassa mais facilmente realizável (BAUDEL, 2006). Já os métodos químicos têm o objetivo de remover a lignina, com o cuidado de não degradar a cadeia celulósica, pois a mesma deve apresentar propriedades adequadas à sua posterior utilização. Como a lignina está ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre durante o processo de pré-tratamento, e dependendo das condições empregadas, a celulose pode ser degradada (SILVA, 2011). A Figura 7 ilustra as alterações estruturais conseguidas com o pré-tratamento.

Figura 7 - Alterações estruturais na estrutura lignocelulósica determinadas pelo pré-tratamento.



Fonte: SANTOS et al., 2012.

Além de todos os fatores já citados, o pré-tratamento será ideal se for sustentável, considerando o consumo de energia e impacto ambiental, se a acessibilidade ao ataque biológico, isto é, às enzimas, for maximizada e se a formação dos co-produtos inibidores for minimizada (RUEDA, 2010). Os tipos de pré-tratamentos que vem sendo mais amplamente utilizados são os químicos e os combinados.

2.2.1 Pré-Tratamentos por Métodos Químicos

O pré-tratamento químico visa conseguir a maior solubilização da hemicelulose e lignina, em ordem, com o intuito de expor a celulose à conversão. Como pré-tratamentos nessa categoria podem-se citar os ácido e os alcalinos. No Brasil, os reagentes ácidos mais utilizados na etapa de pré-tratamento são: o ácido sulfúrico, H_2SO_4 , o clorídrico, HCl , e o nítrico, HNO_3 (concentrados ou diluídos). O pré-tratamento com ácido sulfúrico pode alcançar elevadas taxas de reação e, com isso atingir o objetivo de melhorar a hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002).

Segundo Nascimento (2011), uma das vantagens do pré-tratamento ácido é a solubilização da hemicelulose. Em contrapartida, existe o risco de formação de produtos voláteis de degradação do carbono e estes, na maioria dos casos, diminuem a conversão a etanol, o que é indesejado.

A realização do pré-tratamento químico por peróxido de hidrogênio alcalino tem despertado interesse nos últimos anos, uma vez que apresenta diversas vantagens, como:

- Uso de reagentes de fácil acesso, que apresentam baixa toxicidade e impacto ambiental;
- Condições brandas de temperatura e pressão sem o emprego de ácidos;
- Praticamente não forma produtos secundários de degradação;
- Apresenta quase 100% de recuperação da celulose na forma de glicose após hidrólise enzimática (BANERJEE et al., 2012; RABELO et al., 2011; RIVERA et al., 2010).

2.2.2 Pré-Tratamentos por Métodos Combinados

O método de pré-tratamento com explosão a vapor, que é um tipo de pré-tratamento combinado, tem sido muito utilizado em materiais lignocelulósicos (McMILLAN, 1994). O processo de realização desse tipo de tratamento é submeter o material a alta pressão saturada, entre 6 a 34 bar, e uma temperatura que varia entre 160 a 240°C durante tempo de reação

entre 1 e 15 min. Ao término da reação, o material é submetido a uma rápida descompressão e coletado em um tanque de expansão.

Com a realização desse pré-tratamento, a idéia é que ocorra hidrólise das hemiceluloses, liberando os carboidratos que podem sofrer degradação térmica, e a lignina é parcialmente fragmentada, tornando a estrutura da biomassa passível à penetração de água, ácidos e enzimas, de modo que o potencial hidrolítico da celulose é aumentado significativamente (SUN E CHENG, 2002; BAUDEL, 2006). O pré-tratamento com explosão a vapor atua tanto química quanto fisicamente na biomassa.

Outro tipo importante de pré-tratamento combinado é o hidrotérmico. Nos últimos anos, houve um grande interesse no estudo da influência da água quente sob alta pressão nos processos de conversão de biomassa. A água, que age nessa situação como o solvente, deve estar entre 150 e 230 °C. Esse tipo de tratamento vem sendo considerado como bastante promissor para a biomassa lignocelulósica, uma vez que a utilização apenas de água em um pré-tratamento não gera a princípio nenhum tipo de resíduo nem corrosão dos equipamentos (ROGALINSK et al., 2008).

Sob elevada pressão, a água quente tem o poder de se infiltrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e enfim, remover a hemicelulose. O processo hidrotérmico é capaz de remover até 80% de hemicelulose e melhorar a digestibilidade enzimática do material lignocelulósico (MOSIER et al., 2005).

Allen et al. (1996) relataram completa dissolução de xilana e mais de 90% de recuperação de pentosanas pelo pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana de açúcar em reator de fluxo contínuo.

Petersen et al. (2009) estudaram a otimização do pré-tratamento hidrotérmico de palha de trigo para a produção de etanol. Os experimentos mostraram que as melhores condições de pré-tratamento foram de 195° C em um tempo de 6 a 12 min, obtendo-se uma recuperação de aproximadamente 70% de hemicelulose, 94% de celulose, sendo que 89% dessa celulose puderam ser convertidas em etanol.

Freitas (2011) estudou o pré-tratamento hidrotérmico do sabugo de milho e verificou que a melhor condição para a extração de hemicelulose foi com 30 minutos de reação à 185°C.

Em comparação ao tratamento com ácido diluído, o hidrotérmico oferece duas grandes vantagens:

- Como não há utilização de ácido, torna-se desnecessária o uso de reatores resistentes a corrosão, o que diminui o custo do processo;
- O tratamento hidrotérmico produz quantidades bem menores de resíduos por neutralização do hidrolisado (SILVA, 2009).

2.2.3 Pré-tratamentos Biológicos

No pré-tratamento biológico, os fungos são os componentes que promovem a deslignificação. O desejo do processo de biodeslignificação é que a lignina seja solubilizada através da ação dos microrganismos, porém esses processos são muito lentos, com baixos rendimentos e, além do mais, ainda não existe muito estudo com esse tipo de tratamento (BALAT et al., 2008).

2.2.4 Pré-tratamentos Físicos

Os métodos físicos para realização de pré-tratamento consistem na redução do tamanho das partículas da biomassa, fazendo com que a superfície específica da celulose torne-se mais desenvolvida, de modo que a hidrólise da mesma ocorra com relativa facilidade. Porém, apenas a redução das partículas, em muitos casos, não é suficiente para que as etapas posteriores sejam eficazes (BAUDEL, 2006).

2.2.5 Formação de Inibidores

De acordo com Martín et al. (2007), o uso conjunto de alguns tipos de tratamentos leva à formação de alguns subprodutos que interferem, posteriormente, no processo de fermentação do hidrolisado. Esses produtos, em geral, são ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil que está presente na fração de hemicelulose, ácidos fórmicos e levulínicos, produtos de degradação do açúcar, compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da fração de lignina e furaldeídos como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente.

Há, portanto a necessidade de se realizar algum tipo de destinação para esses resíduos que são gerados com a etapa de pré-tratamento. No caso do chamado licor negro, por exemplo, que é a fração líquida gerada no pré-tratamento, apresenta-se bastante tóxico e pode causar grandes impactos ambientais, devendo ser tratado.

2.3 Hidrólise do Material Lignocelulósico

O processo de obtenção do etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve a etapa de hidrólise dos polissacarídeos, expostos após etapa de pré-tratamento, em açúcares de cadeias menores que são fermentescíveis. Um processo de hidrólise enzimática com prévia etapa de pré-tratamento pode ter o seu rendimento aumentado de 20% para 90%, o que faz com que o pré-tratamento seja etapa decisiva na produção do etanol (NOJIRI, 2009).

A hidrólise pode ocorrer tanto pela ação de ácidos como de enzimas. A última se mostra mais promissora por ser mais seletiva e necessitar de equipamentos menos rigorosos do que a hidrólise ácida, visto que os custos do processo devem sempre ser levados em conta (LYND et al., 1996).

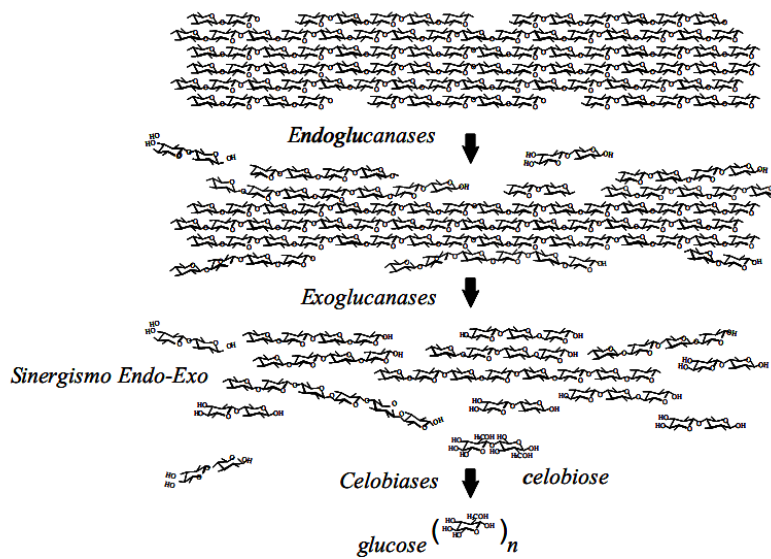
Em ambos os processos de hidrólise, a celulose é convertida em glicose conforme a Equação 1.



2.3.1 Hidrólise Enzimática

A ação de enzimas para realizar a etapa de hidrólise da celulose constitui a hidrólise enzimática. Essa reação é catalisada por enzimas altamente específicas, as celulasas. Na verdade, trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulasas: as endoglucanases, as exoglucanases (subdivididas em celobiohidrolases e glucanohidrolases (GHs)) e as β -glucosidases (SILVA, 2010). A função básica das endoglucanases é hidrolisar de forma aleatória as regiões internas da estrutura amorfa da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor. As exoglucanases, por sua vez, são enzimas divididas em celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). As GHs são capazes de liberar glicose diretamente do polímero e são estruturas raras. Já as CBHs são responsáveis pela liberação de celobiose a partir das extremidades da cadeia de celulose. O último grupo das celulasas, as β -glicosidases são enzimas que completam a hidrólise, pois têm a capacidade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (AGUIAR, et al., 2008). A Figura 8 mostra o modo de ação desse complexo enzimático.

Figura 8 - Mecanismo de ação das enzimas celulolíticas na degradação da celulose.



Fonte: PITARELO, 2007.

O processo enzimático apresenta-se, portanto muito eficaz e vantajoso, já que é possível obter altos rendimentos em condições menos críticas. Além disso, o processo é menos poluente. No entanto, o elevado custo das enzimas ainda é um obstáculo de escala industrial (ODEGA; PETRI, 2010; WYMAN, 1999).

2.4 Fermentação da Biomassa

Existem diversas formas para realizar a conversão do material celulósico a etanol. No entanto, a abordagem em que se tem uma maior facilidade de controle das condições de operação é a sacarificação seguida de fermentação, ou seja, os estágios de hidrólise e fermentação ocorrem separadamente. A desvantagem do uso dessa abordagem é que como os produtos da hidrólise ácida inibem as enzimas, há limitação da taxa de sacarificação, o que pode acarretar em baixos rendimentos de etanol (SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Sabe-se que a taxa de hidrólise e a composição dos açúcares resultantes dependem dos métodos de pré-tratamento, hidrólise e das condições experimentais utilizadas. Porém, de forma geral, os constituintes principais dos hidrolisados são a glicose e xilose liberados da celulose e hemicelulose, respectivamente. A glicose, que é produzida com a hidrólise da celulose, pode facilmente ser fermentada por microrganismos como é feito atualmente. Em contra partida, a hidrólise da hemicelulose produz em pequena quantidade hexoses, que são estruturas facilmente fermentadas, e pentoses, que, por sua vez, são conhecidas como

açúcares de difícil conversão. Os processos industriais de produção de etanol estão baseados essencialmente no uso de hexoses, que leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de consumir. Essa levedura tem se mostrado economicamente viável e com bons rendimentos de conversão. Diante desse fato, as tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo de conversão (LEE, 1997).

Existem diversos estudos e projetos de microrganismos de fermentação que utilizam as pentoses, através de modificações genéticas, mas os rendimentos em etanol ainda não são suficientes para tornar o processo economicamente viável em escala industrial. Além disso, existem ainda os produtos de degradação (ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis), que são produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, e que tem a capacidade de inibir consideravelmente o processo de fermentação, diminuindo os rendimentos do bioetanol, devendo ser removidos ou minimizados (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000; KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004). Todos esses fatores devem ser intensamente avaliados para que se possa escolher a melhor via fermentativa e tornar o processo economicamente viável.

O processo de fermentação alcoólica ocorre por uma série de reações químicas, que são catalisadas por um complexo de enzimas, presentes no metabolismo de diferentes microrganismos, sendo o mais utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A glicólise é conhecida como o processo de quebra e oxidação da glicose, que é um processo anaeróbio. A grande maioria dos organismos utiliza a glicose como substrato oxidável, dessa forma, ela é conhecida como fonte energética universal. Possui fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$ e é dividida em duas moléculas de piruvato na via glicolítica. No processo de obtenção do álcool a glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato (3C), onde dois pares de hidrogênios são liberados e os respectivos elétrons, que se encontram carregados de energia, são provisoriamente entregues à forma oxidada de duas moléculas de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), que passam a $NADH + H^+$ na forma reduzida. Na presença de oxigênio, este será o receptor final desses hidrogênios, após liberação da energia dos elétrons para formação de ATP, regenerando NAD. Na ausência de oxigênio, quando o álcool será formado, a enzima piruvato descarboxilase transforma piruvato em acetaldeído e a enzima desidrogenase alcoólica catalisa a entrega dos hidrogênios (que estavam na forma de

NADH + H⁺) ao acetaldeído, reduzindo este a etanol e, assim, regenerando NAD. Dois ATPs por molécula de glicose são obtidos nesse processo (LEHNINGER e COX, 2002).

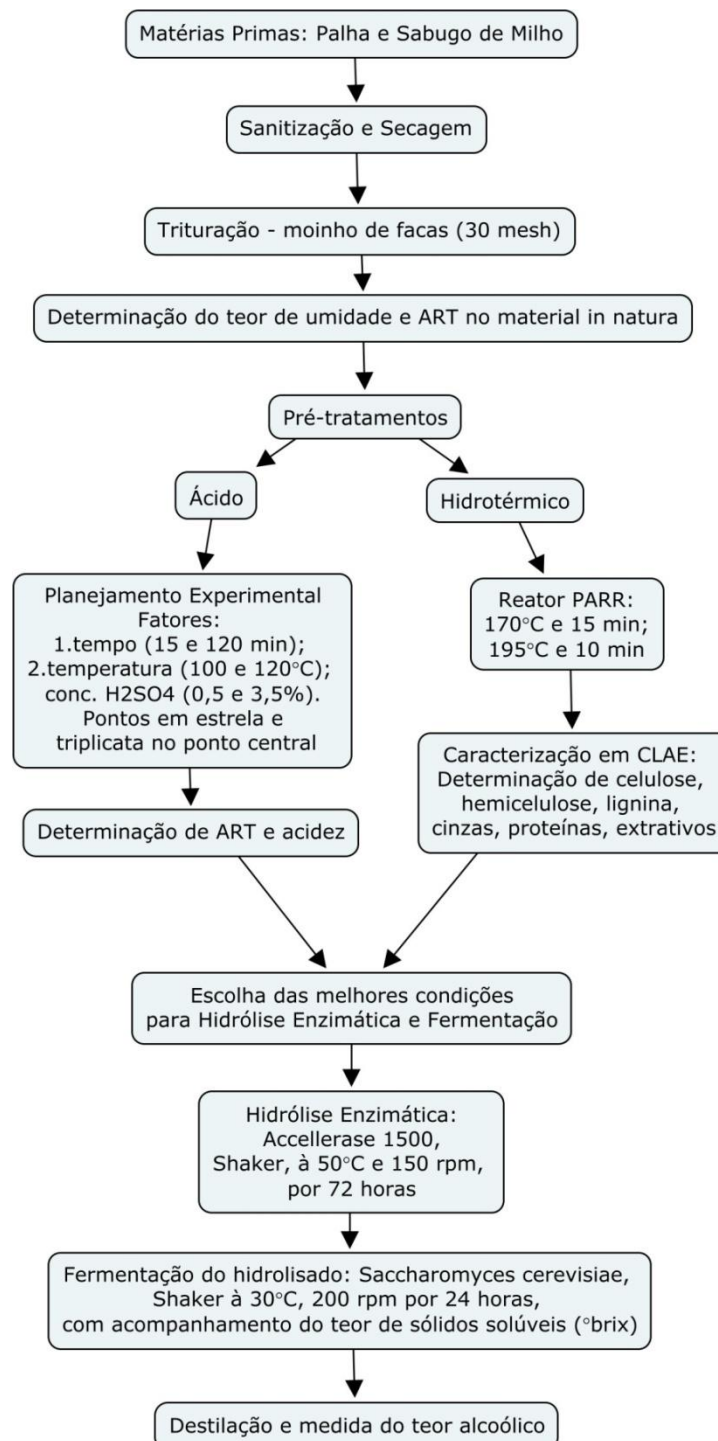
Pode-se observar que a fermentação alcoólica permite que em condições de ausência de oxigênio, a célula possa conseguir energia suficiente para garantir a manutenção das atividades vitais e crescimento celular, através desse mecanismo alternativo de regeneração do NAD (NASCIMENTO, 2011).

A maior parte das usinas, aproximadamente 70%, utilizam para a produção de etanol, o processo de “batelada alimentada” com recirculação e tratamento posterior da levedura, processo conhecido como Melle-Boinot. Este procedimento é considerado como o mais seguro, ao se levar em conta os fatores de assepsia e manutenção, já que ao final de cada batelada a dorna pode ser esvaziada para limpeza e possíveis manutenções no equipamento. Assim, uma nova fermentação poderá ser iniciada com segurança (MARTINS, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais requeridos para todas as etapas envolvidas nesse estudo, bem como para a caracterização química das biomassas, etapas de pré-tratamento, hidrólise e fermentação. As etapas empregadas nesse trabalho são apresentadas no fluxograma da Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma das etapas envolvidas no estudo dos pré-tratamentos ácido e hidrotérmico.



3.1 Matéria Prima

A palha e o sabugo de milho *in natura* utilizados nesse trabalho foram oriundos de espigas de milhos comprados na feira livre da cidade de Maceió – AL. O pré-tratamento hidrotérmico da palha e do sabugo foi realizado no laboratório de engenharia bioquímica da UFSCar.

O extrato enzimático (Accelerase 1500) utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela UFSCar, através de projeto de cooperação.

Na etapa de fermentação foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (levedura comercial na forma liofilizada da marca *Fermix*).

Os demais reagentes de laboratório utilizados neste trabalho foram adquiridos em grau analítico e não sofreram qualquer tratamento antes de sua utilização.

3.2 Higienização, Secagem e Trituração para obtenção da farinha

As palhas sofreram processo de sanitização após serem separadas das espigas. Esse processo consistiu em lavagem das palhas com 100 ppm de água sanitária durante 15 minutos. Após esse tempo, as palhas foram lavadas em água corrente. O sabugo foi também separado das espigas e cortado em tamanhos menores. Após essa etapa, ambas as matérias-primas, palha e sabugo, passaram por secagem em dessecadora (à 30°C) e estufa (à 45°C) conforme Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Sabugo de milho em processo de secagem em estufa.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 11 - Palha de milho em processo de secagem em estufa.



Fonte: Acervo do autor.

Após o material se apresentar desidratado (aspecto quebradiço), o que levou em torno de 7 dias, foi triturado para se obter a farinha, tanto do sabugo quanto da palha. O sabugo foi triturado em liquidificador industrial, enquanto que a palha foi cominuída em um moinho de facas, tipo Willye para obter-se uma granulometria de 30 mesh, conforme Figuras 12 e 13.

Figura 12 - Sabugo sendo triturado em liquidificador industrial.



Fonte: Acervo do autor.

Figura 13 - Palha sendo cominuída em um moinho de facas.



Fonte: Acervo do autor.

Após trituração, as farinhas foram obtidas (Figura 14) para se realizar as análises e demais tratamentos.

Figura 14 - Palha e sabugo obtidos após trituração.



Fonte: Acervo do autor.

3.3 Determinação do Teor de Umidade

A umidade das amostras foi determinada empregando determinador de umidade modelo ID50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) a 100°C em modo automático. Para cada amostra, a determinação da umidade foi feita sempre em duplicata, usando-se o valor médio. As amostras de material pré-tratado foram mantidas em capela de fluxo laminar por 24 horas, com o intuito de se obter um teor de umidade em torno de 10%. Após isso o teor de umidade foi determinado. O equipamento pode ser visualizado na Figura 15.

Figura 15 - Equipamento determinador de umidade.



Fonte: Acervo do autor.

3.4 Determinação do Poder Calorífico Superior

Para a determinação do poder calorífico da palha e do sabugo do milho *in natura* utilizou-se um Calorímetro IKA C200 (ASTM D-2382), seguindo as normas ABNT NBR 8633/84.

A amostra foi colocada num pequeno cadinho no interior da bomba calorimétrica. Essa câmara de combustão de aço inox, capaz de resistir a grandes pressões, tem válvula para a admissão de oxigênio e também contatos elétricos para provocar a inflamação da amostra. Depois que a amostra é inserida, a bomba é hermeticamente fechada e recebe carga de oxigênio sob pressão de aproximadamente 25 kgf/cm². A bomba calorimétrica é então imersa no calorímetro (vaso que apresenta excelente isolamento térmico) que contém massa de água conhecida, sob agitação. O sistema trabalha em condições adiabáticas, não havendo perda nem ganho de calor do calorímetro para as vizinhanças (OPERATING INSTRUCTIONS IKA C 200, 2011).

Quando todos os componentes dentro do calorímetro atingem uma temperatura uniforme e constante, provoca-se a inflamação da amostra, mediante uma corrente elétrica que passa por um fio condutor que fica em contato com a mesma. O calor liberado na combustão causa a elevação da temperatura da água. Esta temperatura é cuidadosamente medida, com um termômetro de precisão de Beckmann, antes e depois do término da reação, quando a temperatura no interior do calorímetro é novamente constante. A variação de temperatura ΔT , observada no calorímetro é proporcional ao calor que a reação liberta ou absorve (OPERATING INSTRUCTIONS IKA C 200, 2011).

Após o fim do processo tem-se o valor do PCS dado nas unidades J/g. Na Figura 16 pode-se visualizar o calorímetro utilizado para realizar as análises do PCS.

Figura 16 - Calorímetro usado nas análises.



Fonte: Acervo do autor.

3.5 Pré-Tratamento Hidrotérmico

Para a realização do pré-tratamento, a metodologia é apresentada de acordo com o pré-tratamento utilizado. Foram realizados dois pré-tratamentos: o hidrotérmico, com completa caracterização, e o com ácido diluído, de acordo com um planejamento experimental.

O pré-tratamento hidrotérmico ocorreu em um reator PARR (Fabricante PARR Instrument Company Moline, Illinois, EUA), modelo 4580 HP/HT com capacidade de 5 L (Figura 17). Sua metodologia, proposta por Silva et al. (2010), será apresentada a seguir.

- Uma amostra de base seca de palha e/ou sabugo de milho foi misturada com água numa proporção água/biomassa de 10:1 (massa líquido/massa sólido), em um reator de aço inoxidável com PID para controle de temperatura;
- As condições de tempo e temperatura avaliadas foram: 170°C por 15 minutos de reação e 195°C por 10 minutos; A melhor condição, tanto para a palha quanto para o sabugo, em termos de açúcares obtidos após o pré-tratamento, foi escolhida para seguir às etapas de hidrólise enzimática e fermentação;
- Ao final do pré-tratamento, a fração sólida, composta de material lignocelulósico, foi separada da fração líquida por meio de uma filtração em tecido;
- A fração sólida foi submetida a uma lavagem com água para a remoção da hemicelulose residual até pH neutro.

Figura 17 - Reator PARR.



Fonte: Acervo do autor.

3.5.1 Caracterização Química do Material *In Natura* e Após Pré-tratamento Hidrotérmico

Para as amostras de palha e sabugo de milho *in natura* a quantidade de extrativos foi determinada.

3.5.1.1 Extrativos

Adicionou-se 4,0g (massa seca) de palha/sabugo *in natura* em um cartucho e colocou-se em um sistema de extração (Soxhlet - Diogolab). Em um balão de fundo redondo adicionou-se 190 mL de etanol 95%. A manta foi ajustada para fornecer um ciclo mínimo de 6 sífões por hora. Refluxou-se por 12 horas. O líquido contendo os extrativos foi colocado em rotaevaporizador até se obter um líquido viscoso. Retirou-se este líquido utilizando um pouco de etanol. Colocou-se em uma placa de Petri, previamente tarada e deixou-se em capela ligada até se obter massa constante. A massa de extrativos da palha e sabugo *in natura* foi calculada.

As amostras de palha e sabugo de milho foram caracterizadas, *in natura* e após pré-tratamento, utilizando-se a metodologia para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar descrita por Gouveia et al. (2009), com exceção da análise de proteína, pelo método de Kjeldahl, proposto por Cotta et al. (2007). A fração líquida oriunda da etapa de caracterização foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cada etapa deste processo de caracterização será descrita nos próximos itens.

3.5.1.2 Hidrólise com Ácido Sulfúrico 72%

Amostras de 1 g (moídos em liquidificador industrial e moinho de facas) de palha / sabugo de milho, pesadas com precisão de 0,1 mg foram transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 10 mL de H₂SO₄ 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostaticado (Nova Ética) a 45°C por 8 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 120°C. Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada. A solução foi armazenada para análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e lignina solúvel.

3.5.1.3 Determinação de Lignina Insolúvel na Fração Sólida

O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 100 °C até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca conforme a Equação 2.

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} * 100 \quad (2)$$

Onde: L_{Ki} =Lignina Klason insolúvel; M_K =massa de lignina insolúvel seca; M_C =massa de cinzas; M_A =massa da amostra seca.

3.5.1.4 Determinação de Lignina Solúvel na Fração Líquida

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000). O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme a Equação 3.

$$C_{lig} = 4,187 * 10^{-2} (A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (3)$$

onde: C_{lig} = concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T = absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = (c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2)$ –absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvidades e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L /g.cm.

3.5.1.5 Determinação de Carboidratos, Ácidos Orgânicos, Furfural e Hidroximetilfurfural na Fração Líquida

Antes da determinação de carboidratos e de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Phenomenex). Para a construção das curvas de calibração dos carboidratos, foram injetadas no cromatógrafo líquido, soluções contendo celobiose, glicose, xilose e arabinose. A construção das curvas de calibração dos ácidos orgânicos foi realizada através da injeção de soluções contendo ácido acético e ácido fórmico. As condições das análises foram: coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad); fase móvel: H₂SO₄ 0,005 mol/ L; vazão

de 0,6 mL/min; temperatura do forno: 45 °C; em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10AD, empregando um detector de índice de refração Shimadzu modelo RID-6A.

Para determinar as concentrações de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural foram realizadas análises cromatográficas (CLAE). Construíram-se curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural injetando soluções padrões destes dois compostos. As amostras dos hidrolisados foram filtradas em membrana de 0,45 µm e analisadas. Condições experimentais: coluna C-18 (Waters, 3,9 x 300 mm), fase móvel solução de acetonitrila/água 1:8 com 1% de solução de ácido acético, vazão de 0,8 mL/min, temperatura do forno 25°C e detector UV/VIS (SPD-10A) a 274 nm, em cromatógrafo Shimadzu.

3.5.1.6 Determinação de Cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente à 150°C por 30 min, 250°C por 20 min e mais 120 min a 800 °C, em uma mufla (modificado de ROCHA et al., 1997).

Na determinação das cinzas totais, pesaram-se aproximadamente 1 g de material em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado conforme a Equação 4.

$$\% \text{cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (4)$$

onde: % cinzas = percentual em massa de cinzas; M_c = massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_a = massa da amostra em base seca.

3.5.1.7 Determinação de Proteínas

Digestão da matéria orgânica: 0,5 g de amostra foi transferido para um tubo de Kjeldahl e adicionado 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido de selênio na proporção 100:1:0,8 misturados e triturados em almofariz e pistilo). Na capela de exaustão de gases, adicionou-se ao tubo cerca de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Tentou-se fazer com que a amostra e os reagentes caíssem no fundo do tubo sem tocar as paredes. O tubo foi acoplado ao digestor de Kjeldahl, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo para evitar a digestão violenta e conseqüente perda do

material. A cada 15 min a temperatura foi elevada suavemente (mais 50°C) até que a mesma chegasse a 350°C. O tempo de digestão variou de 1 a 4 horas. A amostra está digerida quando apresentar coloração incolor ou levemente esverdeada. Desligou-se o aquecedor e deixou-se por 15 a 30 min para esfriar, colocando na boca do tubo um tampão de algodão.

Destilação do nitrogênio: Transferiu-se 25 mL de ácido bórico a 4% para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25% e 2 gotas de indicador verde de bromocresol 0,2%. O destilador de kjeldahl foi preparado, mergulhando a saída do condensador no Erlenmeyer, tendo o cuidado de observar se a extremidade final deste está completamente mergulhada na solução de ácido bórico. Adicionou-se ao tubo contendo a amostra digerida água destilada até um pouco menos da metade do tubo e 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%. O tubo foi acoplado ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, desligou-se o aquecimento e adicionou-se, lentamente, NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa). A destilação foi feita até recolher um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

Titulação do nitrogênio: A solução do Erlenmeyer foi titulada com ácido clorídrico 0,1 N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada. O teor de proteína foi determinado pela equação 5:

$$\text{Proteína total (g/100 g)} = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot f_{\text{HCl}} \cdot N_{\text{HCl}} \cdot F \cdot 1,4}{P} \quad (5)$$

Onde: V = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N; f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N; F = fator de correspondência nitrogênio – proteína. O valor de F para alimentos em geral é 6,25; P = massa tomada de amostra.

3.6 Pré-Tratamento com Ácido Sulfúrico

De acordo com estudos feitos por Baudel (2006) e Martín et al. (2007) o tratamento com ácido sulfúrico gera bons rendimentos de glicose, apesar de algumas desvantagens como a necessidade de equipamentos especiais. A geração de bons rendimentos de glicose motivou a realização de um pré-tratamento com ácido sulfúrico, que ocorreu através de um planejamento experimental.

Dois planejamentos experimentais (um para a palha e outro para o sabugo) com três fatores, em estrela com triplicata no ponto central foram realizados, com o objetivo de

verificar, entre os fatores estudados e seus níveis, quais os significativos e com isso otimizar a etapa de pré-tratamento. Os três fatores estudados com seus níveis e pontos centrais estão dispostos na Tabela 4. Os pontos em estrela estão a uma distância de $\sqrt{2}$ unidades codificadas do ponto central. As respostas avaliadas para esses planejamentos foram acidez e açúcares redutores totais (ART), onde duas melhores condições para cada biomassa, em termos de ART obtido, foram escolhidas para seguir às etapas posteriores de hidrólise enzimática e fermentação.

Tabela 4 – Fatores e níveis estudados no planejamento experimental para as duas biomassas.

Fatores	Nível inferior (-)	Nível superior (+)	Ponto central (0)	Pontos em estrela ($-\sqrt{2}$)	Pontos em estrela ($+\sqrt{2}$)
1. Tempo (min)	15	120	67,5	7	142
2. Temperatura (°C)	100	120	110	96	124
3. Concentração de H ₂ SO ₄ (%)	0,5	3,5	2,0	0,1	4,0

Deve-se destacar que as escolhas dos níveis das variáveis seguiram critérios coerentes, relacionados com limitações ou valores previamente conhecidos:

- As temperaturas escolhidas foram devido às restrições da autoclave utilizada;
- Com relação ao tempo, os níveis escolhidos foram com o intuito de abranger uma faixa de resultados já indicados na literatura;
- As concentrações de ácido sulfúrico usadas foram devido a trabalhos já realizados na literatura, observando que para concentrações inferiores a 0,5% não se obtém resultados efetivos e acima de 3,5% se torna inviável devido ao gasto de material e grande geração de resíduos ácidos.

A realização do experimento ocorreu em várias etapas, onde os ensaios que apresentavam as mesmas condições de tempo de aquecimento e temperatura puderam ir juntos para a autoclave (Figura 18), variando-se a concentração de ácido. A metodologia do pré-tratamento ácido é descrita a seguir.

Figura 18 - Autoclave onde foram realizados os pré-tratamentos ácidos.



Fonte: Acervo do autor.

- A massa seca de material a ser colocado no Erlenmeyer foi pesada em balança analítica de acordo com o teor de umidade do material, que foi calculado;
- A razão foi de 1:10 (massa de material seco/volume de solução ácida), como proposto por SILVA et al., 2010. Com a umidade de cada material, foi possível medir a massa, para um volume final de 100 mL;
- As soluções de ácido sulfúrico foram preparadas de acordo com a concentração requerida nos ensaios;
- A massa do material foi adicionada ao Erlenmeyer e em seguida a solução;
- Os Erlenmeyers foram tampados e colocados na autoclave;
- Após o tempo de experimento, essas amostras foram retiradas da autoclave e filtradas em papel filtro. O teor de ART e a acidez foram determinados do licor obtido desse pré-tratamento.

3.6.1 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) e Acidez

A determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi feita pelo método espectrofotométrico, proposto por Miller (1959), que utiliza a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e leitura a 540 nm. Para isto, foi necessário o preparo de uma curva padrão de glicose. Deve-se, também, salientar que, para a análise de açúcares redutores totais, faz-se necessária uma hidrólise ácida prévia. O preparo da solução de DNS, da reação em si, da curva padrão e da hidrólise para açúcares não-redutores são detalhados a seguir.

3.6.1.1 Preparo da Solução de Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

1g de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foi dissolvido à temperatura ambiente em 20mL de NaOH 2N e 50 mL de água destilada. 30g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio – $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) foi adicionado somente quando o DNS se encontrava totalmente dissolvido. Para facilitar a dissolução, a solução foi aquecida até no máximo 40°C. Após a adição do sal Rochelle, completou-se o volume para 100 mL com água destilada. A solução foi armazenada em frasco escuro e na geladeira.

3.6.1.2 Hidrólise dos Açúcares Não-redutores

1 mL da amostra foi transferida para um tubo de ensaio e foi adicionado 5 mL de H_2SO_4 1,5M, levando a banho fervente por 20min e agitando ocasionalmente para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores (ao menos a cada 5 min). Após esse tempo, a amostra foi resfriada e transferida para béquer. Adicionou-se 2 gotas de fenolftaleína 1% e, cuidadosamente, com o auxílio de pipeta Pasteur, NaOH 26% até a coloração rósea. Em seguida adicionaram-se gotas de H_2SO_4 1,5M até voltar à coloração original. A amostra foi homogeneizada e transferida para proveta, completando o volume com água destilada até 50 mL.

3.6.1.3 Reação para Determinação dos Açúcares pelo Método do DNS

Transferiu-se 0,25 mL da amostra para um tubo de ensaio com tampa e adicionou-se 0,5 mL de água destilada. Quando o banho de água estava fervendo, adicionou-se 0,25 mL do reagente de DNS e então a amostra foi levada para o banho fervente por 5min, permitindo que a reação entre a amostra e o DNS acontecesse. Após o tempo de reação, a amostra foi retirada da água fervente e colocada em banho de gelo. Ao atingir a temperatura ambiente, ajustou-se o volume com água destilada para 5mL (ou seja, adicionou-se 4 mL de água destilada) e realizou-se a leitura da amostra em espectrofotômetro, a 540nm, por absorvância. A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose obteve-se a equação da reta, que permitiu a realização do cálculo da concentração de ART em cada amostra.

Observação: para “zerar” o espectrofotômetro e ler as absorvâncias foi necessário se fazer um branco, substituindo-se na reação de DNS a amostra por água destilada. As leituras de absorvância devem estar dentro da faixa de leitura da curva de calibração. Caso o valor de absorvância seja maior, a amostra deve ser diluída e passar novamente pela reação de DNS.

3.6.1.4 Preparo da Curva Padrão de Glicose

Uma solução de glicose 1 g/L foi preparada, pesando-se em um bécker 0,05 g de glicose e diluindo em cerca de 30 mL de água destilada. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 50 mL, e o volume foi completado com água destilada. Homogeneizou-se o frasco. Utilizando esta solução padrão, realizaram-se diluições, conforme Tabela 5, para se obter diferentes concentrações da amostra.

Tabela 5 - Diluições para preparo da curva padrão de glicose.

Volume da solução de glicose 1g/L (mL)	Volume H ₂ O (mL)	Volume total (mL)	Concentração de glicose (g/L)
0,05	0,20	0,25	0,2
0,10	0,15	0,25	0,4
0,15	0,10	0,25	0,6
0,20	0,05	0,25	0,8
0,25	0,00	0,25	1,0

A reação de DNS foi realizada conforme procedimento anteriormente descrito no item 3.6.1.3. Para uma melhor precisão dos resultados, o coeficiente de correlação (R^2) deve ser maior que 0,97. A concentração de ART é dada pela equação 6:

$$\text{ART (g/L)} = \text{diluição de hidrólise} \times \text{absorbância} \times \text{fator da curva padrão} \quad (6)$$

3.6.1.5 Determinação da Acidez

A acidez foi determinada conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (1985). Este método baseia-se na titulação de neutralização de ácidos com solução padronizada de álcali (solução de NaOH 0,1 N) e com o uso de indicador fenolftaleína 1%. O procedimento será descrito a seguir.

2 mL da amostra, diluída em 50 mL de água destilada, foi titulada com solução de NaOH 0,1 N, adicionando-se a solução 2 gotas de fenolftaleína 1%. O teor de acidez é dado pela equação 7:

$$\text{acidez (g ácido orgânico/100 g)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot f_{\text{NaOH}} \cdot PM_{\text{ácido}}}{10 \cdot m \cdot nh} \quad (7)$$

Onde: V = volume gasto na titulação da solução de NaOH, em mL; N = normalidade da solução de NaOH; f = fator de correção da solução de NaOH; m = massa tomada da amostra; nh = número de hidrogênios ionizáveis; PM = peso molecular do ácido (nesse caso, o ácido acético, que possui PM= 60 g/mol e nh=1).

Os rendimentos mássicos obtidos ao final de cada pré-tratamento foram calculados utilizando a Equação 8:

$$R = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (8)$$

Onde: $m_{inicial}$ = massa inicial seca de material lignocelulósico (g); m_{final} = massa final seca de material lignocelulosico (g); R= rendimento mássico.

3.7 Hidrólise Enzimática

Os experimentos submetidos à hidrólise enzimática foram realizados utilizando a enzima comercial Accellerase 1500, apenas com as melhores condições de ambos os pré-tratamentos testados. Os ensaios ocorreram segundo Silva, 2011, com 1,0% de carga de sólidos (1 g de biomassa pré-tratada: 100 mL de solução). A solução para hidrólise continha 60 mL de tampão citrato, pH 4,8 (50 mM), 38 mL de água destilada e 2 mL da enzima.

A hidrólise enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL em *Shaker*, à 50°C e 150 rpm, por 72 horas. Após a hidrólise enzimática, o ART foi determinado conforme já descrito nos itens 3.6.1.2 e 3.6.1.3.

3.8 Fermentação do Hidrolisado Enzimático

O microrganismo utilizado para a fermentação etanólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial, fermento biológico fermix. Os ensaios ocorreram de acordo com Wolf, 2011, onde o líquido contendo glicose resultante da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos foi utilizado na etapa de fermentação.

Para o preparo do inóculo, foi utilizado o meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose). Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados: 30 mL do hidrolisado, 0,6 g de peptona bacteriológica e 0,3 g de extrato de levedura. O meio foi esterilizado à 121°C por 15 min. Após isso, foi adicionada 6,7 mL da solução de sulfato de magnésio e fosfato de amônio e por último, 0,3 g do fermento.

A fermentação ocorreu em *Shaker* à 30°C, 200 rpm por 24 horas, com acompanhamento do teor de sólidos solúveis (°brix), medido através de refratômetro digital. Após essa etapa, o ART, crescimento celular, teor alcoólico, rendimento e eficiência fermentativa foram determinados. O crescimento celular foi determinado através de técnicas de contagem em câmara de Neubauer. O teor alcoólico foi determinado por destilação, utilizando-se o método espectrofotométrico a partir do dicromato de potássio.

O rendimento da fermentação (R_f) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (g/L) e a quantidade de ART presente inicialmente (g/L), através da Equação 9. Já a eficiência da fermentação (E_f) foi determinada pela relação entre o rendimento real da fermentação (R_f) e o rendimento teórico de 0,51 (Equação 10) (NOGUEIRA; VENTURINI-FILHO, 2005).

$$R_f = \frac{\text{etanol produzido } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\text{ART inicial } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \quad (9)$$

$$E_f = \frac{\text{rendimento real}}{\text{rendimento teórico (0,51)}} \quad (10)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo são abordados todos os resultados obtidos nesse trabalho bem como as análises discursivas referentes a cada um deles, apresentando o quanto os resultados se mostraram promissores com o intuito de promover a otimização dos pré-tratamentos estudados para a obtenção do etanol de segunda geração.

4.1 Caracterização da Palha e Sabugo *In Natura* e Tratados por Pré-Tratamento Hidrotérmico

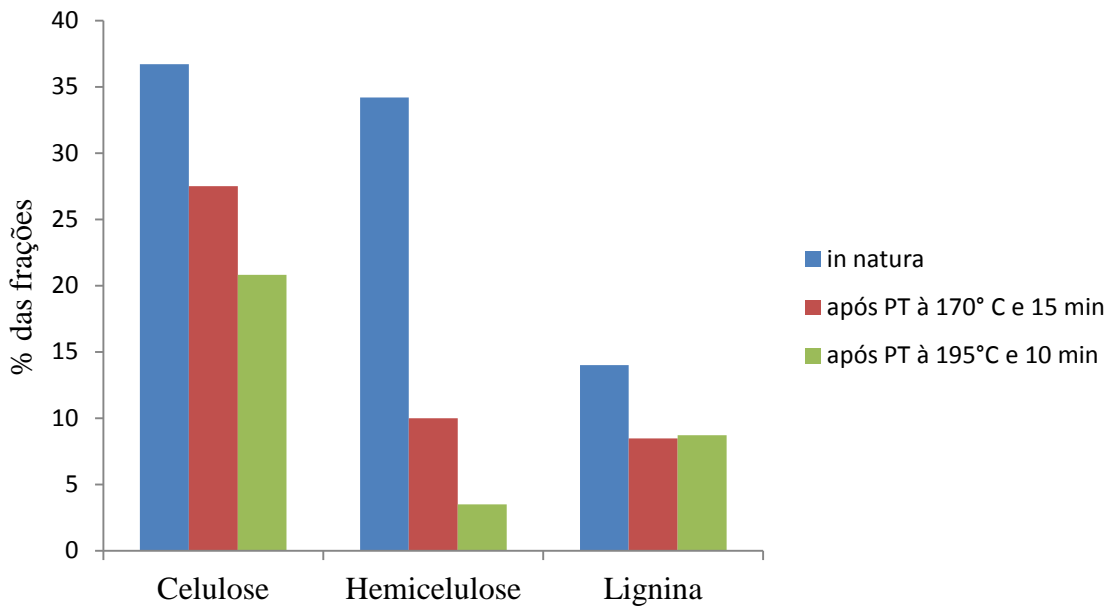
Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os constituintes da palha e sabugo, respectivamente. Os resultados são para as matérias-primas *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico, que foram caracterizadas quimicamente em duplicata.

Tabela 6 - Composição química das amostras de palha de milho *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.

Componentes (%)	Palha <i>In natura</i>	Palha tratada a 170°C e 15 min	Palha tratada a 195°C e 10 min
Celulose	36,7±0,2	57,6±0,3	49,4±0,1
Hemicelulose	34,2±0,1	21,0±0,3	8,4±0,2
Lignina total	14,0±0,1	17,8±0,1	20,6±0,2
Cinzas	2,34±0,3	0,9±0,6	0,7±0,3
Extrativos	11,6±0,5	-	-
Proteína	4,9±0,0	0,9±0,2	0,9±0,1
Total	103,5	98,2	80,1

Fazendo-se uma análise da Tabela 6, com os valores multiplicados pelos respectivos rendimentos apresentados na Tabela 17, verifica-se que houve, com o pré-tratamento da palha de milho, redução nos teores dos 3 componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, o que pode ser visualizado através do Gráfico 1.

Gráfico 1 - Frações de celulose, hemicelulose e lignina presentes na palha de milho *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.



Para a condição de 170°C e 15 min, houve uma redução de 25,1% no teor de celulose; 70,7% no teor de hemicelulose e de 39,3% no teor de lignina. Com esses resultados, observa-se que houve perda de celulose, mas não significativa, porém a redução na fração de hemicelulose, que é o objetivo principal do pré-tratamento hidrotérmico (BOUSSARSAR et al, 2009) foi bastante satisfatória.

Já para a condição de 195°C e 10 min, houve uma redução de 43,3% no teor de celulose; 89,7% no teor de hemicelulose e de 37,8% no teor de lignina. Nesse caso, a perda de celulose foi mais evidente, o que pode ser justificado pela degradação de açúcares em condições mais severas de pré-tratamento (KIM, 2004), fazendo com que o balanço mássico total apresente divergência considerável dos 100%. O ideal é que esse balanço seja de 100%, admitindo-se erro de 5%. A redução na fração de hemicelulose foi maior e para o teor de lignina, não houve diferença significativa entre as duas condições testadas.

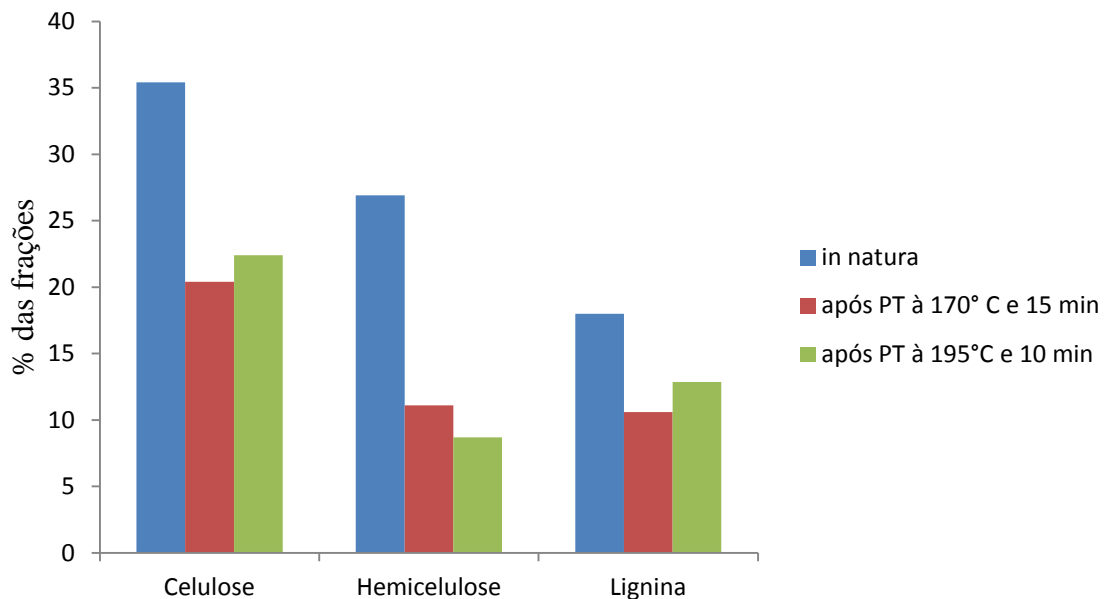
A palha de milho apresentou-se mais atrativa na condição de 170°C e 15 minutos, visto que houve menor degradação da cadeia celulósica sendo, portanto a condição escolhida para seguir às etapas de hidrólise e fermentação. O ideal é que não haja degradação da celulose, porém, como a lignina está ligada às hemiceluloses, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre durante o processo de pré-tratamento, e dependendo das condições empregadas, a celulose pode também ser degradada (SILVA, 2011).

Tabela 7 - Composição química das amostras de sabugo de milho *in natura* e após pré-tratamento.

Componentes (%)	Sabugo <i>in natura</i>	Sabugo tratado à 170°C e	Sabugo tratado à 195°C e
		15 min	10 min
Celulose	35,4±0,2	40,5±0,1	54,0±0,4
Hemicelulose	26,9±0,3	22,1±0,2	20,9±0,1
Lignina total	18,0±0,2	21,0±0,2	30,9±0,1
Cinzas	2,4±0,1	0,5±0,3	0,7±0,3
Extrativos	18,3±0,3	-	-
Proteína	6,5±0,3	1,8±0,2	1,8±0,1
Total	107,4	85,9	108,3

Pela análise da Tabela 7, tem-se que o pré-tratamento do sabugo de milho, nas duas condições testadas, também promoveu redução no teor dos três componentes principais, como apresentado no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Frações de celulose, hemicelulose e lignina presentes no sabugo de milho *in natura* e após pré-tratamento hidrotérmico.



Na condição mais branda de temperatura, 170°C por 15 min, a redução no teor de celulose foi de 42,2%, 58,7% no teor de hemicelulose e de 41,0% no teor de lignina. Observa-se que houve uma redução severa no teor de celulose, frente à remoção da hemicelulose, que não foi significativa.

Já para a condição de maior temperatura, 195°C por 10 min, a redução no teor de celulose foi de 36,6%, de 67,8% no teor de hemicelulose e de 28,6% no teor de lignina. Aqui,

observa-se que a remoção da hemicelulose foi satisfatória frente à de celulose. Para o caso da lignina, a maior remoção foi na condição mais branda de temperatura.

O sabugo de milho mostrou melhores resultados na condição de 195°C por 10 min, pois houve menor perda de material celulósico e maior remoção de hemicelulose, sendo essa a condição escolhida para a realização da hidrólise enzimática e fermentação.

4.2 Matriz de Planejamento do Pré-Tratamento Ácido

As Tabelas 8 e 9 apresentam, respectivamente, as matrizes de planejamento da palha e do sabugo de milho, com todas as condições do pré-tratamento ácido, de acordo com o planejamento em estrela com triplicata no ponto central e as respostas obtidas. O teor de ART das biomassas *in natura* foi de: 17,88% para a palha e 25,92% para o sabugo de milho.

Tabela 8 - Matriz de planejamento: Resultados para a palha de milho.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	ART (%)	Acidez (%)
1	-	-	-	18,8	0,6
2	+	-	-	45,4	0,7
3	-	+	-	50,9	0,6
4	+	+	-	42,7	0,7
5	-	-	+	33,6	3,0
6	+	-	+	25,5	2,0
7	-	+	+	33,4	3,1
8	+	+	+	32,4	1,6
9	0	0	0	37,5±0,3	1,0±0,1
10	0	0	0	38,6±0,3	1,1±0,1
11	0	0	0	37,7±0,3	0,9±0,1
12	-√2	0	0	59,4	1,6
13	+√2	0	0	31,7	1,4
14	0	-√2	0	14,8	1,2
15	0	+√2	0	7,3	1,5
16	0	0	-√2	17,1	0,2
17	0	0	+√2	32,5	3,6

Onde: Fator 1 = tempo (min); Fator 2 = temperatura (°C); Fator 3 = concentração de H₂SO₄ (%).

Pela Tabela 8, verifica-se que as duas melhores condições, com maiores percentuais de ART para a palha de milho foram a condição 3, com 50,9% de ART e a 12, com 59,4%. Essas foram as duas condições escolhidas para a realização das etapas de hidrólise e fermentação.

Tabela 9 - Matriz de planejamento: Resultados para o sabugo de milho.

Ensaio	Fator 1	Fator 2	Fator 3	ART (%)	Acidez (%)
1	-	-	-	24,1	0,5
2	+	-	-	40,6	0,6
3	-	+	-	42,6	0,5
4	+	+	-	38,9	0,6
5	-	-	+	36,4	2,6
6	+	-	+	23,3	1,8
7	-	+	+	26,5	3,0
8	+	+	+	24,5	1,6
9	0	0	0	24,3±0,7	0,8±0,1
10	0	0	0	26,5±0,7	0,7±0,1
11	0	0	0	24,9±0,7	0,6±0,1
12	-√2	0	0	61,5	1,6
13	+√2	0	0	15,3	1,2
14	0	-√2	0	17,5	1,1
15	0	+√2	0	5,6	1,2
16	0	0	-√2	11,5	0,2
17	0	0	+√2	32,2	3,8

Onde: Fator 1 = tempo (min); Fator 2 = temperatura (°C); Fator 3 = concentração de H₂SO₄ (%).

Analisando-se a Tabela 9, tem-se que as condições que apresentaram maiores teores de ART para o sabugo de milho, como no caso da palha, foram as condições 3, com 42,6% de ART e a condição 12, com 61,5%. Desse modo, essas foram as duas condições escolhidas para seguir às etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

4.2.1 Análise de Variância - Modelo Estatístico

Para verificar se o modelo estatístico obtido é adequado ao sistema que se quer descrever, é necessário adequá-lo a um modelo empírico que possa reproduzir com confiança os dados experimentais. Para isso, obtêm-se os parâmetros necessários para a construção da tabela ANOVA – análise de variância, que é apresentada para cada resposta do planejamento experimental.

Nesse trabalho, o ajuste mais adequado aos dados se deu por um modelo cúbico, conforme Equação 11. Esse tipo de modelo explica uma percentagem de variância maior, pois apresenta mais parâmetros, e necessariamente, um modelo com mais parâmetros explicará uma soma quadrática maior (Bruns, et al., 2001).

$$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{33} \cdot x_3^2 + b_{111} \cdot x_1^3 + b_{222} \cdot x_2^3 + b_{333} \cdot x_3^3 \quad (11)$$

As Tabelas 10 a 13 apresentam os resultados de análise de variância para cada resposta obtida no planejamento experimental de cada biomassa. Observa-se que para todos os casos, o modelo cúbico se adequou satisfatoriamente, visto que o percentual de variação explicada esteve sempre bem próximo ao percentual de variação explicável pelo modelo.

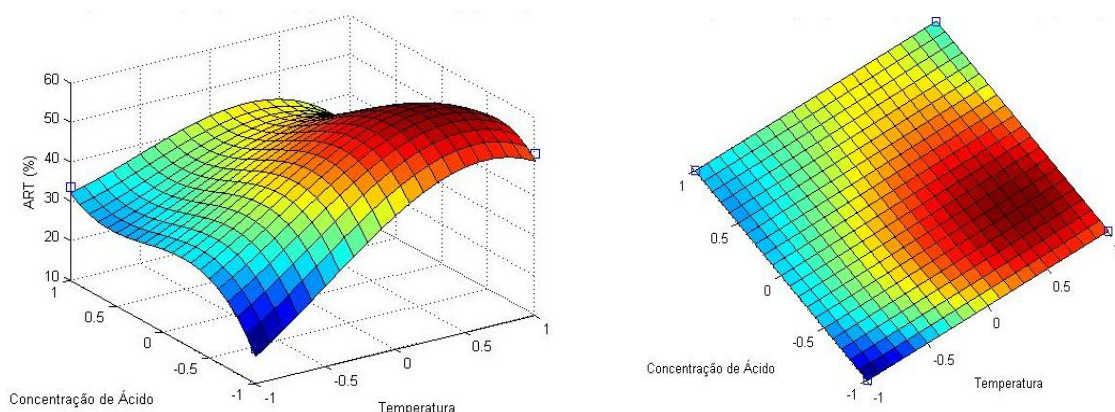
As superfícies de resposta dos modelos cúbicos também são apresentadas nas Figuras 19 a 22 a seguir, considerando o nível inferior do tempo, visto que o mesmo não se apresentou como fator significativo na faixa estudada.

Tabela 10 - ANOVA para o modelo cúbico – ART palha.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	2748,30	13	211,41
Resíduo	92,35	3	30,78
Falta de Ajuste	91,60	1	91,60
Erro Puro	0,75	2	0,37
Total	2840,65	16	

% de variação explicada: 96,75
% de variação explicável: 99,97

Figura 19 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões, respectivamente, para o ART da palha no nível inferior de tempo.



Observando-se a Figura 19 em 3D, é possível perceber que maiores percentuais de ART, que é o desejado com o pré-tratamento, são obtidos para a palha de milho ao se trabalhar nos níveis de baixa concentração de H_2SO_4 e temperaturas elevadas.

A análise de significância estatística dos fatores mostra que neste caso, a concentração de ácido reduz em média 4,11% do teor de ART quando se passa do nível inferior para o nível superior desse fator. Indicando que para trabalhar com maiores valores de ART (%) deve-se utilizar concentrações de H₂SO₄ na faixa de 0,5% . Já o efeito da temperatura, que se mostrou o mais significativo dos três, indicou que um aumento médio de 4,50% no ART é obtido quando eleva-se a temperatura de 100°C para 120°C. O tempo foi o que apresentou menor valor do seu efeito no sistema. No entanto, o seu efeito combinado com a temperatura e/ou com a concentração de H₂SO₄ indica que se deve trabalhar com menores valores de tempo para se obter maiores percentuais de ART.

Por uma análise química e estrutural da biomassa em questão, em relação ao ácido, esse fato é facilmente entendido, visto que sua presença, em concentrações elevadas, pode acarretar na formação de produtos inibidores, que são responsáveis pela degradação do material lignocelulósico, e conseqüentemente dos açúcares presentes na estrutura (ALMEIDA et al., 2007). Já para o caso da temperatura, a faixa investigada não foi ampla, apenas de 100 a 124°C, por conta de restrições do equipamento utilizado, logo é muito provável que não se tenha atingido uma temperatura de degradação, onde há perdas de massa. Portanto, não houve problemas ao se trabalhar no nível superior de temperatura, onde ocorrerá uma maior desorganização na estrutura lignocelulósica da matéria-prima, o que tornará os açúcares fermentescíveis mais acessíveis, acarretando em maiores concentrações de ART obtido após o pré-tratamento (DAGNINO et al., 2012).

Com a Figura em 2D, percebe-se mais facilmente o que já foi avaliado com a análise da superfície em 3D: que a região de máximo ART, região vermelha mais intensa, é dada em níveis de temperatura elevada e baixa concentração de ácido sulfúrico.

A Equação 12 fornece os parâmetros de ajuste para o ART da palha ao modelo cúbico.

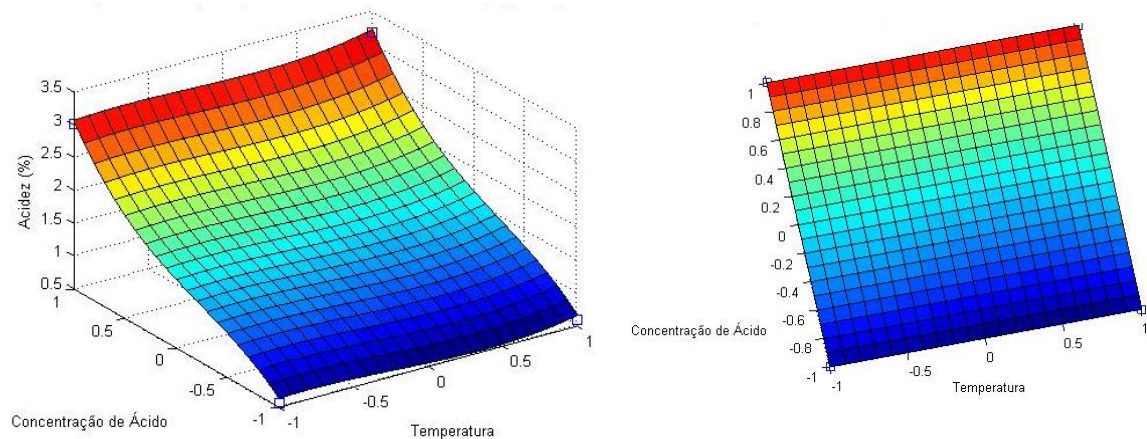
$$\hat{y} = 35,5 + 27,6.x_1 + 11,7.x_2 - 16,1.x_3 - 3,5.x_1.x_2 - 3,5x_1.x_3 - 2,8x_2.x_3 + 5,2.x_1.x_2.x_3 + 16,0x_1^2 - 11,0x_2^2 - 6,4.x_3^2 - 26,0.x_1^3 - 7,2x_2^3 + 12,2.x_3^3 \quad (12)$$

Tabela 11 - ANOVA para o modelo cúbico – Acidez palha.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	15,12	13	1,16
Resíduo	0,15	3	0,05
Falta de Ajuste	0,13	1	0,13
Erro Puro	0,02	2	0,01
Total	15,26	16	

% de variação explicada: 99,04
% de variação explicável: 99,88

Figura 20 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões para a Acidez da palha no nível inferior de tempo.



Através da Figura 20, percebe-se que os menores índices de acidez, que é o ideal para um bom andamento do pré-tratamento, são identificados em baixas concentrações de ácido, porém mostra-se independente da temperatura. É fato indiscutível que quanto maior a concentração de ácido utilizado no pré-tratamento, maior será o teor de acidez encontrado ao final do mesmo.

Através da análise estatística nota-se que, na faixa investigada, a temperatura não mostrou ser um fator significativo na resposta da acidez, nem mesmo a interação da mesma com os outros fatores. A concentração de ácido foi o mais significativo dos três fatores nas condições experimentais estudadas. A interação da concentração do ácido com o tempo foi a que se mostrou mais significativa, e o efeito de interação mostra que o menor tempo aliado as menores concentrações de ácido fornecem os menores percentuais de acidez. Em relação à análise conjunta, para maiores valores de ART e menores de Acidez, deve-se utilizar

temperatura em torno de 120°C, tempo de 15 minutos e concentração de H₂SO₄ em torno de 0,5%.

A Figura vista em 2D mostra mais claramente a superfície de resposta para a acidez da palha de milho. Percebe-se que a região de baixos teores de acidez, dada pela cor azul mais intensa, ocorre ao se utilizar o nível inferior de concentração de ácido, a qualquer temperatura.

A Equação 13 fornece os parâmetros de ajuste para a acidez da palha ao modelo cúbico.

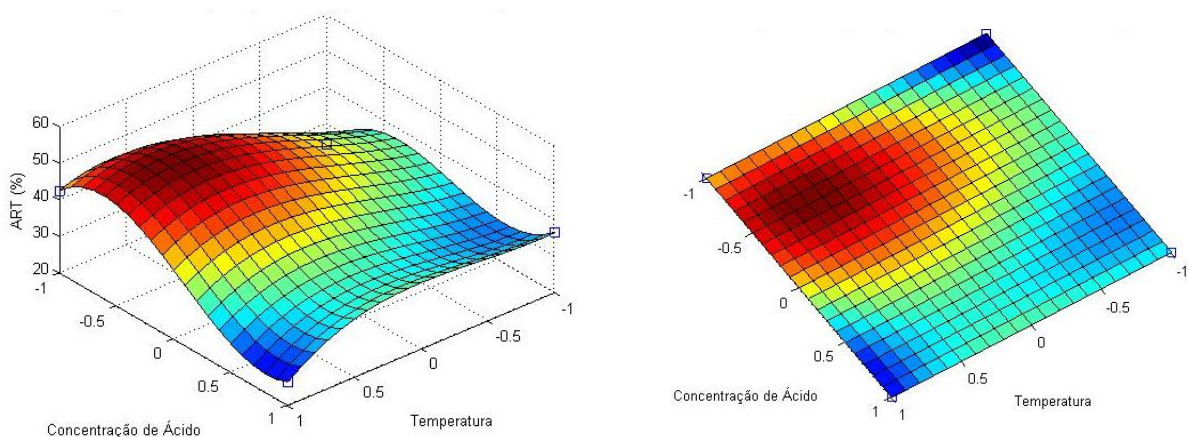
$$\hat{y} = 1,08 - 0,61x_1 - 0,16x_2 + 0,47x_3 - 0,07x_1x_2 - 0,35x_1x_3 - 0,03x_2x_3 - 0,06x_1x_2x_3 + 0,11x_1^2 + 0,09x_2^2 + 0,31x_3^2 + 0,32x_1^3 + 0,14x_2^3 + 0,42x_3^3 \quad (13)$$

Tabela 12 - ANOVA para o modelo cúbico – ART sabugo.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	2822,60	13	217,12
Resíduo	2,59	3	0,86
Falta de Ajuste	0,08	1	0,08
Erro Puro	2,51	2	1,26
Total	2825,19	16	

% de variação explicada: 99,908
% de variação explicável: 99,911

Figura 21 - Superfícies de resposta em 3 e 2 dimensões para o ART do sabugo no nível inferior de tempo.



A Figura 21 apresenta a superfície de resposta obtida em três e duas dimensões para o ART do sabugo de milho. É possível perceber que o caso é muito semelhante à palha de milho, pois também obtém-se maiores teores de ART em condições de baixa concentração de ácido e elevadas temperaturas, dada pela região em vermelho intenso.

Com a análise estatística dos fatores nota-se que quando a concentração de ácido sai do nível inferior para o nível superior há uma redução, em média, de 4,4% do teor de ART. Logo, para trabalhar com maiores valores de ART (%) deve-se utilizar concentrações de H₂SO₄ em torno de 0,5%, nível inferior. O efeito da concentração de ácido com a temperatura e/ou com o tempo, apresentou que haverá redução no ART ao sair de seus níveis inferiores para superiores. Redução de 3,48% para o caso da interação da concentração de ácido com o tempo e de 3,20% para o efeito da concentração de ácido com a temperatura. Esse é mais um indicativo de que deve-se trabalhar no nível inferior de concentração de ácido. Em relação à temperatura, nota-se que há aumento de 1,02% no teor de ART quando se utiliza o nível superior. O tempo foi o que se mostrou menos significativo, porém a análise mostra indicativos de que deve-se trabalhar com 15 minutos, nível inferior, para se obter maiores teores de ART.

A Equação 14 fornece os parâmetros de ajuste para o ART do sabugo ao modelo cúbico.

$$\hat{y} = 25,2 + 32,0.x_1 + 6,2.x_2 - 20,2.x_3 - 1,1.x_1.x_2 - 3,5.x_1.x_3 - 3,2.x_2.x_3 + 3,9.x_1.x_2.x_3 + 18,1.x_1^2 - 6,7.x_2^2 - 4,4.x_3^2 - 32,2.x_1^3 - 5,2.x_2^3 + 15,7.x_3^3 \quad (14)$$

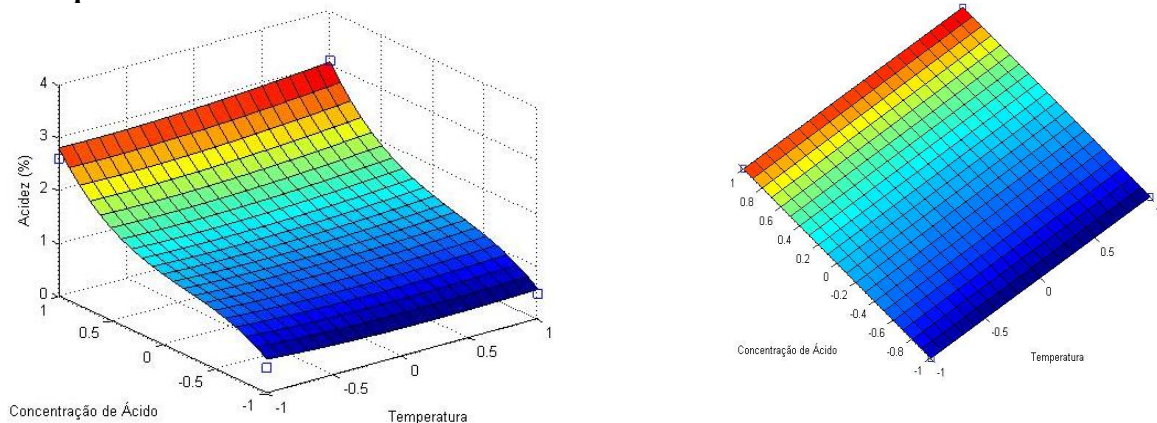
Tabela 13 - ANOVA para o modelo cúbico – Acidez sabugo.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	15,63	13	1,20
Resíduo	0,39	3	0,13
Falta de Ajuste	0,36	1	0,36
Erro Puro	0,03	2	0,01
Total	16,01877	16	

% de variação explicada: 97,59

% de variação explicável: 99,82

Figura 22 - Superfícies de resposta em 3 e 2 D para a Acidez do sabugo no nível inferior de tempo.



A Figura 22 apresenta a superfície de resposta em três e duas dimensões gerada para a acidez do sabugo de milho. Também é bastante similar ao caso da acidez da palha: baixos níveis de acidez são dados em baixas concentrações de ácido sulfúrico a qualquer temperatura. Melhor visualização é dada na Figura em duas dimensões. A região em azul intenso indica onde se tem mais baixa acidez.

A análise estatística fornece que, na faixa investigada, a temperatura não mostrou ser um fator significativo na resposta da acidez, nem mesmo a interação da mesma com os outros fatores, caso muito semelhante ao encontrado para a palha. A concentração de ácido foi o mais significativo dos três fatores nas condições estudadas. Em relação às interações, a da concentração do ácido com o tempo foi a que se mostrou mais significativa, e o efeito de interação mostra que o menor tempo aliado as menores concentrações de ácido fornecem os menores percentuais de acidez. Em relação à análise conjunta das duas respostas estudadas, para maiores valores de ART e menores de Acidez, que é o desejado, deve-se utilizar temperatura em seu nível superior, 120°C, tempo de 15 minutos e concentração de H₂SO₄ em torno de 0,5%, ambos nos níveis inferiores.

A Equação 15 fornece os parâmetros de ajuste para a acidez do sabugo ao modelo cúbico.

$$\hat{y} = 0,87 - 0,55.x_1 + 0,05.x_2 + 0,27.x_3 - 0,08.x_1.x_2 - 0,31.x_1.x_3 + 0,03.x_2.x_3 - 0,08.x_1.x_2.x_3 + (15) \\ 0,14.x_1^2 + 0,07.x_2^2 + 0,39.x_3^2 + 0,27.x_1^3 - 0,01.x_2^3 + 0,58.x_3^3$$

4.3 Poder Calorífico Superior (PCS)

Os resultados obtidos para o poder calorífico superior das matérias-primas estão dispostos na Tabela 14.

Tabela 14 - Poder calorífico superior das biomassas em estudo.

Matéria-Prima	PCS (J/g)
Palha de milho <i>in natura</i>	17.276,5
Sabugo de milho <i>in natura</i>	17.872,0

Verifica-se que as matérias-primas em estudo nesse trabalho apresentam um PCS dentro dos valores verificados na literatura para os materiais lignocelulósicos. Gomes (2010)

& Quirino et al. (2005), referem-se a valores de PCS para a palha do milho de 14.923 J/g e para o sabugo, 18.770 J/g.

Todos os resultados apresentados a seguir foram para as amostras que apresentaram os maiores teores de açúcares após a etapa de pré-tratamento e que seguiram para as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. As condições escolhidas estão dispostas na Tabela 15.

Tabela 15 - Condições escolhidas para a realização da hidrólise enzimática e fermentação.

Pré-tratamento	Palha	Sabugo
Ácido	3: 120°C; 15min; H ₂ SO ₄ à 0,5% (P3)	3: 120°C; 15min; H ₂ SO ₄ à 0,5% (S3)
	12: 110°C; 7 min; H ₂ SO ₄ à 2% (P12)	12: 110°C; 7 min; H ₂ SO ₄ à 2% (S12)
Hidrotérmico	170°C; 15 min (P HDT)	195°C; 10 min (S HDT)

4.4 Teor de Umidade das amostras de Palha e Sabugo de milho

Para cada matéria-prima, *in natura* e após pré-tratamento, o teor de umidade foi medido em duplicata conforme metodologia descrita no item 3.3 e seus valores médios estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Teor de umidade dos materiais.

Condições	Umidade (%)
Palha <i>in natura</i>	5,7±0,2
Sabugo <i>in natura</i>	5,0±0,1
P3	5,5±0,3
P12	8,2±0,2
P HDT	8,2±0,3
S3	6,1±0,3
S12	4,8±0,5
S HDT	8,5±0,2

Onde: P3/S3 = palha/sabugo na condição 3 do planejamento experimental; P12/S12 = palha/sabugo na condição 12 do planejamento experimental; P HDT = palha na condição de 170°C e 15 min do tratamento hidrotérmico; S HDT = sabugo na condição de 195°C e 10 min do tratamento hidrotérmico.

O teor de umidade dos materiais foi considerado aceitável, uma vez que os valores foram baixos comparando-se com resultados da literatura que apresentam valores sempre inferiores a 10% de umidade para a realização da metodologia de caracterização de materiais lignocelulósicos (ROJAS, 2012). Isso é uma característica muito importante, pois o poder

calorífico de matérias-primas lignocelulósicas normalmente segue comportamentos inversamente proporcionais ao teor de água presente nos mesmos (SOUZA et al., 2012).

4.5 Rendimentos Mássicos após Pré-Tratamentos

Para cada um dos pré-tratamentos realizados, conforme metodologia descrita nos itens 3.5 e 3.6, o rendimento é apresentado na Tabela 17, dado pela Equação 8.

Tabela 17 - Rendimento mássico obtido após pré-tratamentos.

Pré-tratamento	Rendimento (%)
P3	46,7
P12	53,4
P HDT	47,7
S3	46,5
S12	51,8
S HDT	41,5

Onde: P3/S3 = palha/sabugo na condição 3 do planejamento experimental; P12/S12 = palha/sabugo na condição 12 do planejamento experimental; P HDT = palha na condição de 170°C e 15 min do tratamento hidrotérmico; S HDT = sabugo na condição de 195°C e 10 min do tratamento hidrotérmico.

Em seus estudos, Carli (2011) reporta rendimentos que variam entre 35 e 59%, após a etapa de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar. Esses tratamentos usaram diversos agentes, tais como: água, H₂SO₄, NaOH, NH₄OH e a combinação destes.

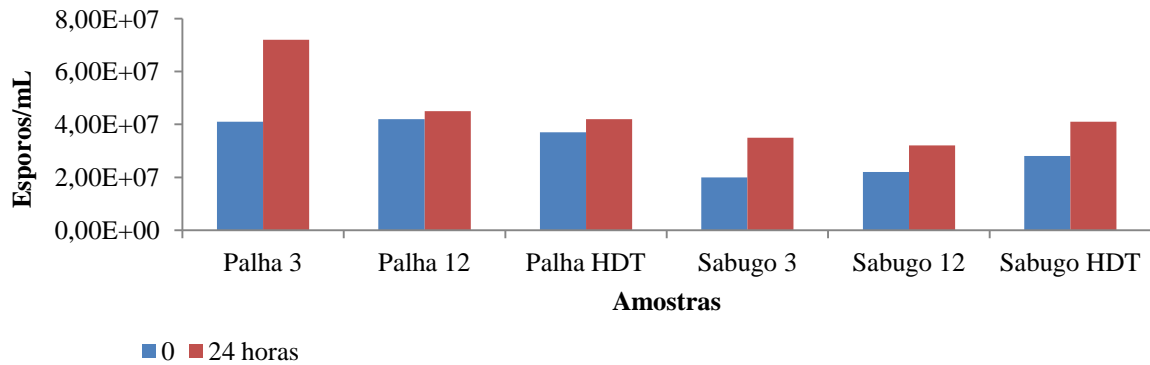
Freitas (2013) realizou pré-tratamentos com sabugo de milho e obteve 47,1% de rendimento após tratamento por extração alcalina e 63,5% após pré-tratamento por auto-hidrólise.

4.6 Etapas de Hidrólise Enzimática e Fermentação

As seis amostras já definidas anteriormente seguiram às etapas de hidrólise enzimática e fermentação. Os fatores avaliados para acompanhamento da fermentação foram: Crescimento celular, °Brix, teor alcoólico, rendimento e eficiência de fermentação.

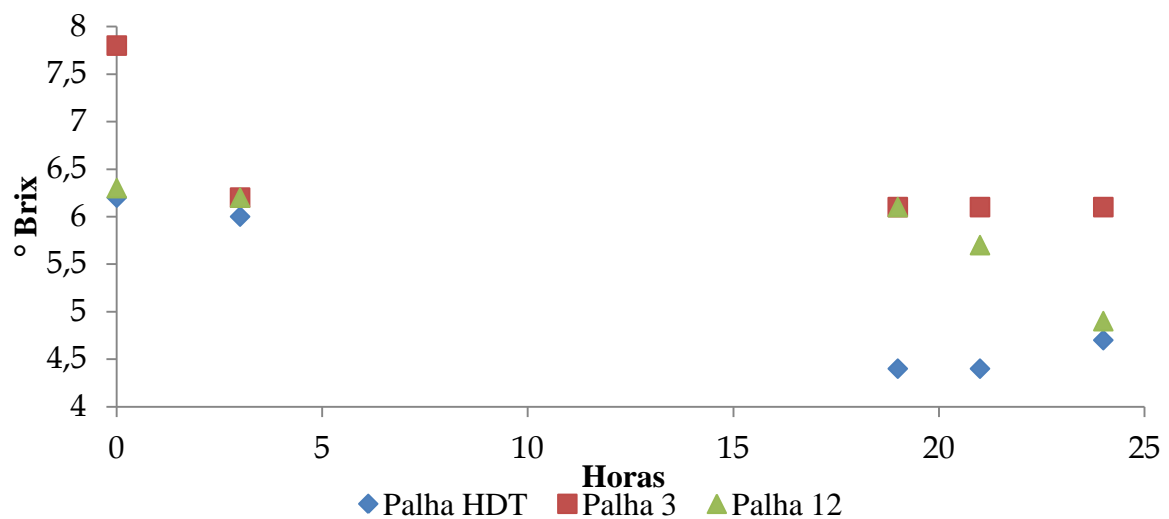
Os resultados para o crescimento celular estão dispostos no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Crescimento celular após 24 horas de fermentação.



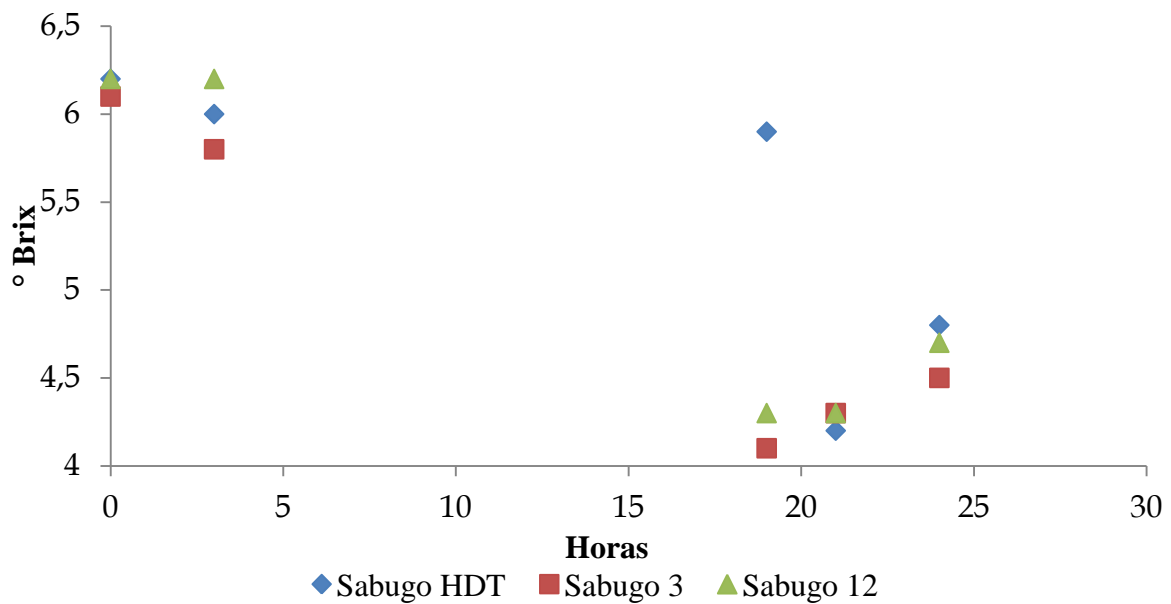
Pelo Gráfico 3, observa-se que todas as amostras apresentaram crescimento após as 24 horas de fermentação, sendo as amostras P3 e S3 as de maiores crescimentos celulares. É possível notar que todas as amostras de palha, saíram de uma concentração celular inicial bem parecida, em torno de 4×10^7 esporos/ mL, e que a condição P3 foi a que mostrou maior crescimento, o que pode ser explicado pela análise do °brix, visto que a condição que apresentou maior consumo dos açúcares presentes no meio foi justamente essa mesma amostra P3, indicando maior crescimento da levedura. Mesma idéia segue-se para o caso das 3 amostras de sabugo de milho, visto que todas iniciaram a fermentação com uma média de 2×10^7 esporos/ mL e que a de maior crescimento foi a S3, a mesma que apresentou maior consumo do °brix. Os Gráficos 4 e 5 apresentam a cinética de consumo do °brix (teor de sólidos solúveis) para a palha e sabugo, respectivamente, durante as 24 horas de fermentação.

Gráfico 4 - Cinética de consumo dos sólidos solúveis – Palha.



Analisando-se o Gráfico 4, observa-se que durante as 24 horas de fermentação o °brix foi reduzido, indicando o consumo, por parte da levedura, dos açúcares presentes no meio. Apenas o último ponto da amostra Palha HDT apresentou pequena elevação no °brix, o que pode ser justificado pelo fato de que o etanol que vai sendo produzido atue na leitura do brix por refratômetro digital, como foi o caso, promovendo a subestimação dos valores reais (TONOLI, et al., 2011). O maior consumo em °brix foi o apresentado pela amostra P3.

Gráfico 5 - Cinética de consumo dos sólidos solúveis – Sabugo.



O Gráfico 5 mostra que nas últimas horas de fermentação todas as amostras apresentaram aumento no °brix, indicação da presença de etanol no meio. A amostra de maior consumo foi a S3.

A Tabela 18 apresenta os resultados após as etapas de hidrólise enzimática e fermentação. As análises foram em relação ao ART presente nas amostras.

Tabela 18 – Resultados obtidos após as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

Condições	Concentração de ART no hidrolisado (g/L)	Conversão Enzimática (%)	Etanol Produzido (g/L)	Rendimento da Fermentação (%)	Eficiência da Fermentação (%)
P3	19,6	83,3	9,3	47,4	92,9
P12	10,4	59,0	4,4	42,3	82,9
S3	6,1	34,3	2,2	36,1	70,8
S12	8,7	51,4	2,5	28,7	56,3
P HDT	7,4	42,1	3,3	44,6	87,5
S HDT	12,4	47,7	5,5	44,3	86,9

Onde: P3/S3 = palha/sabugo na condição 3 do planejamento experimental; P12/S12 = palha/sabugo na condição 12 do planejamento experimental; P HDT = palha na condição de 170°C e 15 min do tratamento hidrotérmico; S HDT = sabugo na condição de 195°C e 10 min do tratamento hidrotérmico.

Pode-se perceber que as maiores eficiências fermentativas se deram com as amostras P3 e S HDT, onde se obteve a maior quantidade de etanol. O teor de etanol produzido foi de 9,3 g/L para a palha na condição 3 do pré-tratamento ácido (15 min; 120°C e 0,5% H₂SO₄), e de 5,5 g/L para o sabugo que passou por pré-tratamento hidrotérmico (195°C por 10 min).

Em seus estudos, Silva (2011) reporta concentrações que variam de 3,8 a 5,7 g/L de etanol ao se utilizar NH₄OH (de 4 a 15%) para tratar bagaço de cana-de-açúcar.

Wolf (2011) realizou pré-tratamento organossolve para tratar bagaço de cana e conseguiu concentrações de 4,3 a 5,2 g/L de etanol ao trabalhar com as condições de 150°C, 30 min e como solvente, o etanol de 30 a 70%.

Apesar do enfoque do estudo ter sido a otimização de condições de pré-tratamentos, os resultados obtidos para hidrólise enzimática e fermentação foram consideráveis, porém esse estudo ainda pode ser melhorado, utilizando-se, por exemplo, uma faixa de condições experimentais para essas duas etapas, podendo-se assim avaliar a mais promissora.

5 CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado com as duas biomassas, palha e sabugo de milho, em diferentes condições de pré-tratamento ácido e hidrotérmico, bem como dos materiais *in natura*, conclui-se que:

- As duas biomassas possuem alto poder calorífico, apresentado valores muito próximos: 17.276,5 J/g para a palha e 17.872,0 J/g para o sabugo, sendo que o último se mostra com ligeira vantagem;
- Em relação ao pré-tratamento ácido, o planejamento experimental foi uma ferramenta que permitiu avaliar as melhores condições estudadas e assim otimizar as etapas subsequentes. Os maiores índices de ART e baixos teores de acidez foram dados ao se utilizar altas temperaturas e baixas concentrações de ácido, na faixa investigada. Também na faixa estudada, o fator tempo não se apresentou como fator significativo;
- Ambas as biomassas apresentaram melhores rendimentos em ART nas mesmas condições: 15 min de reação, 120 °C e 0,5% de H₂SO₄, onde com a palha obteve-se 50,9 % de ART e com o sabugo, 42,6%. A acidez, nessa condição apresentou valores baixos; outra condição de bons resultados foi com 7 min de reação, 110 °C e 2% de H₂SO₄. Nessa condição, o ART da palha foi de 59,4% e do sabugo, 61,5%, porém o teor de acidez já foi mais acentuado: 1,65% para a palha e 1,60% para o sabugo;
- Quando se trata do pré-tratamento hidrotérmico, verifica-se que as duas condições testadas para cada biomassa promoveu redução nos três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. As condições que apresentaram menor remoção de celulose, que é o componente de maior interesse, divergiram em relação às duas biomassas;
- Para o caso da palha, a melhor condição foi com 170°C por 15 minutos. Nessa condição, houve remoção de 25,1% no teor de celulose, resultado melhor do que na outra condição testada, que apresentou remoção de 43,3% da celulose. Houve também remoção de 70,66% no teor de hemicelulose e 39,34% no teor de lignina. Já para o sabugo, a melhor condição foi com 195°C por 10 minutos de reação, que apresentou remoção de 36,6% no teor de celulose, frente à 42,2% na outra condição testada. Apresentou também remoção de 67,8% no teor de hemicelulose e 28,6% no teor de lignina. O ideal é que a celulose não sofra degradação, porém pode ser que para a

biomassa estudada, as condições de pré-tratamento tenham sido muito severas e desta forma, tenha degradado a celulose;

- Nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação a eficiência fermentativa foi decisiva para a escolha das melhores condições. Para a palha de milho, obteve-se maior eficiência com a condição 3 do pré-tratamento ácido: 15 min de reação, 120 °C e 0,5% de H₂SO₄. A eficiência de fermentação foi de 92,9%. Para o sabugo, obteve-se maior eficiência com a condição de 195°C por 10 minutos de reação, realizada por tratamento hidrotérmico. Nesse caso, a eficiência fermentativa foi de 86,9%. As etapas de hidrólise enzimática e fermentação ainda precisam ser melhoradas, visto que o objetivo principal desse trabalho foi o estudo dos pré-tratamentos. Mas, ainda assim, as condições utilizadas tanto para hidrólise como para fermentação ainda apresentaram-se adequadas e satisfatórias, dentro da faixa estudada.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. PPG-EQ/Unioeste. Dissertação de Mestrado, 2010;
- AGUIAR, C. M.; RODRIGUES, D. C.; LUCENA, S. L. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos: produção de celulasas por *aspergillus niger* e efeitos do pré-tratamento**, 11 p. Toledo – PR, 2008;
- ALLEN, S. G.; VAN WALSUM, G. P.; ALLEN, S. G. SPENCER, M. J.; LASER, M. S.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R. Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol* 57–58:157–169,1996;
- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007;
- ALVES, M. Estudo de sistema de cogeração em usina de açúcar e álcool, com utilização **do bagaço e palha de cana**. 114 f. Dissertação de mestrado, UNICAMP – Campinas, 2011;
- ANNUNCIADO, T. R. **Estudo da *Chorisia speciosa* e outras fibras vegetais como sorventes para o setor de petróleo**. 120p. Dissertação de Mestrado – Engenharia e Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005;
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 8633/84. **Carvão vegetal - Determinação do poder calorífico**. São Paulo,1984;
- BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. **Progress in energy and combustion science**, v.34, p.551- 573, 2008;
- BANERJEE, G.; CAR, S.; LIU, T.; WILLIAMS, D. L.; MEZA, S. L.; WALTON, J. D.; HODGE, D. B. Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. **Biotechnology Bioengineering.**, 109: 922-931, 2012;
- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. **Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol**, São Paulo, dez. 2006;
- BIANCHI, M. L. **Polpação de palha de milho utilizando-se diferentes processos organosolv**. 1995. 87 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995;

BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR: ENERGIA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. 316 p. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008. Disponível em: <<http://www.bioetanoldecana.org>>. Acesso em: 08 jan. 2013;

BOUSSARSAR, H.; ROGÉ, B.; MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose, **Bioresource Technology**, Elsevier, 100 (2009) 6537–6542;

BOX, G. E. P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report 9**, 1973;

BRIANE, D.; DOAT, J. Guide technique de la carbonisation: la fabrication du charbon de bois. **Aix-en-Provence, Édisud**. 180p. 1985;

BRUNS, R. E.; NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ª edição, Editora Unicamp, 2001;

CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. N° 44: 48-54, **Revista Analytica**, Dezembro 2009/Janeiro2010;

CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo, 2011;

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRE, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, Vol. 32, No. 8, 2191-2195, 2009;

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, oitavo levantamento**. Brasília, 2012;

COTTA, J. A. O.; SALAMI, F. H.; MARQUES, A. R.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista analítica**, n°. 26, 2007;

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, Elsevier. p.363-368, 2012;

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Balanco Energético Nacional 2012 – Ano base 2011: Resultados Preliminares**. 51p. EPE, Rio de Janeiro, 2012;

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin, Walter de Gruyter, 613 p. 1989;

FREITAS, S. S. **Avaliação de pré-tratamentos em resíduo oriundo do cultivo do milho.** Dissertação de mestrado - Universidade Tiradentes, Programa de pós-graduação em engenharia de processos, 72 p. 2013;

GOLDEMBERG, J. Empresa de Pesquisa Energética: **A matriz energética brasileira.** 3 p. São Paulo, 2010;

GOLDESTSTEIN, I.S. **Organic Chemicals from Biomass.** Boca Raton, FL: CRC Press, 1981. 320 p;

GOMES, M. S. **Produção de bioóleo através do processo termoquímico de pirólise.** Trabalho de graduação. Faculdade de tecnologia de Araçatuba, Curso de tecnologia em biocombustíveis, Araçatuba, 2010;

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, vol.32, N° .6, 1500-1503, 2009;

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras.** Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 117 p, 2010;

INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). **Métodos Químicos para Análise de Alimentos.** 3 ed. São Paulo, 1985;

JARA, E.R.P. **O poder calorífico de algumas madeiras que ocorrem no Brasil.** São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas – IPT, 1989;

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocelulosic biomass processing: a perspective. **International sugar journal**, 106(1263):147-150, 2004;

KIM, T. H. **Bioconversion of Lignocellulosic Material into Ethanol:** pretreatment, enzyme hydrolysis, and ethanol fermentation. Ph.D. Dissertation, Department of Chemical Engineering, Auburn University, Auburn, AL. Adviser: Y.Y. Lee, 2004,173 p.;

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151–172, 1993;

LEE, J. Biological conversion of lignocelulosic biomass to ethanol. **Journal of biotechnology**, 56:1-24, 1997;

LYND, L. R.; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Biochemistry and Biotechnology**, 57/58:741–761, 1996;

MACDONALD, D. G.; BAKHSHI, N. N.; MATHEWS, J. F.; ROYCHOWDHURY, A.; BAJPAI, P.; MOO-YOUNG, M. A. Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Bioengineering**, v. 25, p. 2067- 2076, 1983;

MARTÍN, C.; ALMÁZAN, O.; MARCET, M.; JONSON, L. J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 109, n. 1267, 2007;

MARTINS, C. A. P. **Avaliação do Efeito do Inóculo e do Perfil de Alimentação do Mosto na Produção em Escala Piloto e Industrial de Etanol**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 80 p, 2009;

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E; BAKER, J. O; Overend, R. P. (Eds), **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292-324, 1994;

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

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA: **Matriz energética nacional 2030**. 254 p. EPE, Brasília, 2007;

MOSIER, N. W. C.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDE, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96:673-686, 2005;

MUSSATO, S I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biociência**, n. 28, p. 34-39, 2002;

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. Dissertação de mestrado, UFSCar, São Carlos – São Paulo, 2011;

LEHNINGER, N. D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Savier Editora, 2002;

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI-FILHO, W. G. **Aguardente de cana**. Botucatu: UNESP/Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2005. Disponível em: <<http://dgta.fca.unesp.br/docentes/waldemar/aguardente/Aguardente.pdf>>. Acesso em: 27 de janeiro de 2014;

NOJIRI, N. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP2009159904-A **2009**. (CA 151:175883);

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

OLIVEIRA, F. M. V. **Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010;

OLIVEIRA, V. S.; NETO, A. A. M.; WANDERLEY, M. C. A.; ROCHA, G. J. M.; GOUVEIA, E. R. Effect of Time and Temperature in the Alkaline Delignification on the Cellulose Hydrolysis. **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM 2011**;

OPERATING INSTRUCTIONS IKA C 200. **Calorimeter system C 200**. Disponível em: <http://www.ika.net/ika/product_art/manual/ika_c_200_en.pdf> . Acesso em: 03 set. 2012;

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000;

PETERSEN, M. O.; LARSEN, J.; THOMSEN, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw or production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p.834-840, 2009;

PIENKOS, P. T.; ZHANG, M. **Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates**. *Celulose*, 2009. 16:743-762;

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**. 142 p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007;

QUIRINO, W. F.; VALE, A. T.; ANDRADE, A. P. A.; ABREU, V. L. S.; AZEVEDO, A. C. S. Poder calorífico da madeira e de materiais ligno-celulósicos. **Revista da madeira**, Nº 89, p. 100-106, abril de 2005;

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas – SP, 2007;

RABELO, S. C.; FONSECA, N. A. A.; ANDRADE, R. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, 35: 2600-2607, 2011;

RAMOS E PAULA, L. E.; TRUGILHO, P. F.; NAPOLI, A.; BIANCHI, M. L. Caracterização de resíduos de biomassa vegetal para utilização energética. **Cerne, Lavras**, v. 17, n. 2, p. 237-246, abr./jun. 2011;

RIVERA, E.C.; RABELO, S. C.; GARCIA, D. R.; FILHO, R. M.; COSTA, A. C. Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 85: 983–992, 2010;

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAÚJO, G. T. Resumos do **5th Brazilian symposium on the chemistry of lignins and other wood components**, Paraná, Brasil, 1997;

ROGALINSKI, T.; INGRAM, T.; BRUNNER, G. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *The Journal of Supercritical Fluids*, Elsevier, p. 54-63, 2008;

ROJAS, M. J. **Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja**. Dissertação de mestrado – UFSCar, São Carlos – SP, 2012;

RUEDA, S. M. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas – SP, 2010;

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Jureia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004;

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, vol.XY, N°.00, 1-7, 2012;

SILVA, A. P.; RAVAGNANI, M. A. S. S.; BISCAIA Jr., E. C.; CABALLERO, J. A. Optimal heat exchanger network synthesis using particle swarm optimization. **Optimization and Engineering** (Print), v. 11, p. 459-470, 2010;

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol**. Dissertação de mestrado, UFSCar, São Carlos – São Paulo, 2011;

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. Dissertação de mestrado – Escola de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010;

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009;

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009;

SIVAKUMAN, G.; VAILUM, D.; XUM, J.; BURNEZ, D.; LAY, J.; GEM, X.; WEATHERS, P. Bioethanol and Biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. 2, 100-120.2008;

- SOUZA, M. M.; SILVA, D. A.; ROCHADELLI, R.; SANTOS, R. C. Estimativa de poder calorífico e caracterização para uso energético de resíduos da colheita e do processamento de *Pinus taeda*. **Floresta**, Curitiba-PR, v. 42, n. 2, p. 325 - 334, abr./jun. 2012;
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, 83:1–11, 2002;
- SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, 10(5/6):367-375, 1996;
- TÍMÁR-BALÁZSY, A. & EASTOP, D. Chemical Principles of Textile Conservation Butterworth Heinemann, Oxford, UK: Butterworth- Heinemann. **Trends in biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-56, 1998;
- TONOLI, F.; NETO, R. P.; SOUZA, T; BAPTISTA, A, S.; AGUIAR, C. L. Influência do teor alcoólico na leitura dos sólidos solúveis (brix) usando leitura refratométrica. **19º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2011. Disponível em: <uspdigital.usp.br/siicusp>, acesso em: 27 jan. 2014;
- WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-deaçúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 148 p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011;
- WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, 1999.