



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO REGIONAL
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA SUCROALCOOLEIRA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PRODUÇÃO SUCROALCOOLEIRA



CYBELLE CRYSTINNE DO PRADO MARINHO

**ESTUDO DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

JOÃO PESSOA

2019

CYBELLE CRYSTINNE DO PRADO MARINHO

**ESTUDO DAS ETAPAS DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE
PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO A PRODUÇÃO DE ETANOL DE
SEGUNDA GERAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada ao Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Tecnóloga em Tecnologia em Produção Sucroalcooleira.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Solange Maria de Vasconcelos

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M338e Marinho, Cybelle Crystinne do Prado.

Estudo das etapas de pré-tratamento e hidrólise
enzimática de palha de cana-de-açúcar visando a
produção de etanol de segunda geração / Cybelle
Crystinne do Prado Marinho. - João Pessoa, 2019.
70 f. : il.

Monografia (Graduação) - UFPB/CTDR.

1. Palha de cana-de-açúcar. 2. Pré-tratamento ácido. 3.
Hidrólise enzimática. 4. Etanol de segunda geração. I.
Título

UFPB/BC

TCC aprovado em 26/09/19 como requisito para a conclusão do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:

Solange Maria de Vasconcelos

PROF^a. Dr^a. SOLANGE MARIA DE VASCONCELOS - (UFPB – Orientadora)

Erika Gomes

PROF^a. Dr^a. ERIKA ADRIANA DE SANTANA GOMES - (UFPB – Membro interno)

Joelma Moraes Ferreira

PROF^a. Dr^a. JOELMA MORAIS FERREIRA - (UFPB – Membro interno)

Dedico este trabalho ao meu esposo e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

GRATIDÃO, Deus! Obrigada por ter me sustentado quando eu mais precisava e quando eu menos merecia.

Agradeço ao meu esposo Maxwell Marinho pela paciência, apoio, incentivo e companheirismo. Te amo!

Agradeço a toda a minha família. Em especial à minha mãe Rosangela, meu pai Rosalvo e minha avó Jovita. Em especial às minhas primas e irmãs de coração Taty e Manu por toda a ajuda e incentivo. E minha tia Pipa por todo auxílio ao longo da caminhada.

Agradeço à minha orientadora e professora Solange Maria de Vasconcelos pelo tempo, encorajamento e paciência dedicados a mim.

Aos meus amigos, que contribuíram de forma direta ou indireta me dando apoio e um ombro amigo quando precisava. Em especial à Rosa Helena, Raquel, Géssica, Isabelle, Paulo, Wellison, Jonnatas, Leonardo e Felipe.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira, que me proporcionaram aprendizados não apenas acadêmicos. Assim como todos os funcionários e colaboradores do CTDR. Entre eles os técnicos administrativos Leonardo, João e ao colaborador Marcos, por sempre estarem dispostos a me ajudar. Obrigada!

Agradeço imensamente aos técnicos dos Laboratórios do CTDR por todo o auxílio que me prestaram durante os experimentos. Cada um de vocês fizeram meus dias de trabalho mais agradáveis e divertidos. Em especial à Diego, Zé Carlos e Claudinha, serei eternamente grata!

Agradeço a todos os professores que passaram pela minha jornada acadêmica. Cada um de vocês contribuiu para a minha formação. E principalmente às professoras Laís, Joelma e Erika pelas oportunidades que me proporcionam e ao carinho que me deram ao longo do curso.

Amo vocês!

**Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu.**

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

As preocupações ambientais têm estimulado a busca pela redução de gases de efeito estufa e o interesse pelo desenvolvimento de biocombustíveis que possam substituir os combustíveis fósseis. Com isso, a produção do etanol derivado de biomassas renováveis, como a palha de cana-de-açúcar, tem se tornando uma matéria-prima potencial por ser abundante, disponível e sua utilização não compromete a segurança alimentar. Neste trabalho, o objetivo foi realizar um estudo de pré-tratamento e de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração. Em uma primeira etapa do trabalho foi realizada o pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído, utilizando um planejamento fatorial, no qual foram analisados os fatores: concentração de H_2SO_4 (0,1 M, 0,2 M e 0,3 M), temperatura (60, 80 e 100 °C) e tempo (20, 40 e 60 min). Na segunda etapa realizou-se a hidrólise enzimática, empregando a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®, nas seguintes condições: 50 °C, agitação constante de 150 rpm em shaker agitador, pH 4,8 em tampão citrato de sódio. Na hidrólise enzimática avaliou-se a influência das concentrações de substrato (palha pré-tratada) e de enzima, seguindo um planejamento fatorial 2^2 , com três pontos centrais, totalizando 7 experimentos. Para o estudo da hidrólise, utilizou-se como substrato a fração sólida obtida na condição de pré-tratamento com H_2SO_4 0,3 M; 60 min e 100 °C (condição que liberou a maior concentração de açúcar redutor e apresentou maiores modificações, quando analisada pelo método FTIR). Quanto ao estudo de pré-tratamento, observou-se que a concentração de açúcar redutor (AR) variou de 2,90 a 15,90 g/L. A análise estatística dos resultados através do software Statistica (Statsoft 7.0) mostrou que o modelo codificado que representa a liberação de AR foi estatisticamente significativo a 95% de confiança. A solubilização dos componentes da palha aumentou à medida que se elevou a severidade do processo, ou seja, com a maior concentração de ácido e maiores temperatura e tempo. No caso da hidrólise enzimática, observou-se que as concentrações de açúcares redutores liberados foram praticamente constantes entre 48 e 72 horas, assim, decidiu-se avaliar a sua eficiência em função de açúcares redutores liberados, no tempo de 48 horas. Os resultados obtidos mostraram que as maiores concentrações de açúcares redutores foram de 12,84 e 15,51 g/L, que corresponde às condições nas quais se utilizou maior carga de fração sólida (substrato), sendo de 10% (m/v). Através da análise estatística verificou-se que a concentração de substrato e a interação entre a concentração de substrato e concentração de enzima foram os fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança, sendo o modelo de primeira ordem que representa a concentração de AR, preditivo e significativo.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar; Pré-tratamento ácido; Hidrólise enzimática; Etanol de segunda geração.

ABSTRACT

Environmental concerns have encouraged the search for greenhouse gas reduction and interest in the development of biofuels that can replace fossil fuels. As a result, ethanol production from renewable biomass such as sugarcane straw has become a potential raw material because it is abundant, available and its use does not compromise food security. The present work had as objective the study of the pretreatment and enzymatic hydrolysis of sugarcane straw in order the production of second generation ethanol. In the first stage of the work, the sugarcane straw was pretreated with dilute sulfuric acid, carried out according to factorial design, in which the following variables were analyzed: H_2SO_4 concentration (0.1 M, 0.2 M and 0.3 M), temperature (60, 80 and 100 °C) and time (20, 40 and 60 minutes). In the second stage, enzymatic hydrolysis was performed using the commercial enzyme Cellulase Blend (SAE 0020) from Sigma-Aldrich® under the following conditions: 50 °C, with 150 rpm in a rotatory shaker, pH 4.8 in sodium citrate buffer. In the study of enzymatic hydrolysis were evaluated the influences of substrate (pretreated straw) and enzyme concentrations. The hydrolysis was performed according a factorial design 2^2 , with three central points, totaling 7 experiments. In the hydrolysis study, the solid fraction obtained from the pretreatment in the condition of 0.3 M H_2SO_4 , 60 minutes and 100 °C was used as substrate (condition that released the highest concentration of reducing sugar and presented greater modifications when analyzed by the FTIR method). In relation to the pretreatment, it was observed that the concentration reducing sugar (RA) ranged from 2.90 to 15.90 g/L. Statistical analysis of the results using the Statistica software (Statsoft 7.0) showed that the coded model representing RA release was statistically significant at 95 % confidence. Solubilization of the straw components increased with the process severity, that is, with the highest acid concentration and higher temperature and time. In the case of enzymatic hydrolysis, it was observed that the concentrations of released reducing sugars were practically constant between 48 and 72 hours, so it was decided to evaluate their efficiency as a function of released reducing sugars in 48 hours. The results showed that the highest concentrations of reducing sugars were 12.84 and 15.51 g/L, corresponding to the conditions in which a higher solid fraction load (substrate) was used, being 10 % (w/v). Statistical analysis showed that substrate concentration and interaction between substrate concentration and enzyme concentration were the statistically significant factors at 95% confidence. The first-order model represents the RA concentration, was predictive and significant.

Keywords: Sugarcane straw; Acid pretreatment; Enzymatic hydrolysis; Second generation ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial de cana-de-açúcar.....	18
Figura 2 – Estrutura da cana-de-açúcar.....	19
Figura 3 – Cadeia de produção da cana-de-açúcar.....	20
Figura 4 – Rendimento teórico de etanol por hectare de palha.....	22
Figura 5 – Emissões evitadas com uso de biocombustíveis.....	23
Figura 6 – Etapas de produção do E2G.....	25
Figura 7 – Biomassa lignocelulósica.....	26
Figura 8 – Estrutura molecular da celulose.....	27
Figura 9 – Molécula da hemicelulose.....	28
Figura 10 – Representação da estrutura da lignina.....	29
Figura 11 – Frações dos componentes da biomassa após o pré-tratamento.....	31
Figura 12 – Resultado do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica.....	35
Figura 13 – Diagrama da hidrólise ácida da celulose e arabinosilano (hemicelulose).....	36
Figura 14 – Hidrólise enzimática degradando a biomassa lignocelulósica.....	37
Figura 15 – Representação da atuação da celulose na biomassa lignocelulósica.....	39
Figura 16 – Secagem da palha.....	41
Figura 17 – Ensaios no banho termostático.....	43
Figura 18 – Diagrama de Pareto para os açúcares redutores liberados na etapa de pré-tratamento.....	50
Figura 19 – Superfícies de resposta para os AR liberados após o pré-tratamento com H_2SO_4	53
Figura 20 – Rendimento mássico após o pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H_2SO_4	54
Figura 21 – Espectros das amostras de palha de cana-de-açúcar in natura e pré-tratada com H_2SO_4	55
Figura 22 – Perfis de concentrações de açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática da fração sólida obtida no ensaio 8 (H_2SO_4 0,3 M, 60 min, 100 °C), utilizando-se a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma Aldrich®	56
Figura 23 – Diagrama de Pareto para os açúcares redutores liberados no processo de hidrólise enzimática.....	58
Figura 24 – Superfície de resposta para os AR liberados após em 48 h de hidrólise enzimática (palha pré-tratada nas condições: H_2SO_4 0,3 M; 60 min; 100 °C).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química da biomassa lignocelulósica de diferentes materiais.....	26
Tabela 2 – Efeito de diferentes pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica.....	34
Tabela 3 – Comparação das condições do processo para a hidrólise de celulose.....	39
Tabela 4 – Níveis de fatores utilizados na otimização do pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H ₂ SO ₄	42
Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2 ³ para o pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H ₂ SO ₄	42
Tabela 6 – Níveis das variáveis independentes para o estudo da hidrólise enzimática.....	46
Tabela 7 – Matriz do planejamento fatorial 2 ² para o estudo da hidrólise enzimática.....	46
Tabela 8 – Matriz do planejamento fatorial 2 ³ do pré-tratamento ácido.....	49
Tabela 9 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados no hidrolisado, após o pré-tratamento com H ₂ SO ₄	51
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para AR liberados no hidrolisado após o pré-tratamento com H ₂ SO ₄	52
Tabela 11 – Avaliação da fração sólida da palha da cana-de-açúcar.....	54
Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial 2 ² para a hidrólise enzimática.....	57
Tabela 13 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados no hidrolisado enzimático, em 48 horas (palha pré-tratada nas condições: H ₂ SO ₄ 0,3 M, 60 min, 100 °C).....	59
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para AR liberados no hidrolisado enzimático em 48 horas.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GEE	Gases de efeito estufa
E1G	Etanol de primeira geração
E2G	Etanol de segunda geração
a.C.	Antes de Cristo
d.C.	Depois de Cristo
MME	Ministério de Minas e Energias
MMA	Ministério do Meio Ambiente
ANP	Agencia Nacional do Petróleo
UE	União Europeia
U	Unidade Internacional
FPU	Unidade de papel filtro
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico

%	Porcentagem
kg	Quilogramas
tc	Tonelada de cana
ha	Hectare
L	Litros
CO ₂	Dióxido de carbono
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
MPa	Megapascal
min	Minutos
°C	Grau Celsius
M	Molaridade
g	Gramas
pH	Potencial Hidrogeniônico
atm	Pressão atmosférica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Cana-de-açúcar	17
2.2 Palha da cana-de-açúcar	20
2.3 Biocombustíveis.....	22
2.4 Etanol de segunda geração.....	24
2.5 Biomassa lignocelulósica	25
2.5.1 Celulose.....	27
2.5.2 Hemicelulose.....	28
2.5.3 Lignina	28
2.5.4 Extrativos e outros.....	29
2.6 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	30
2.6.1 Pré-tratamento físicos.....	31
2.6.2 Pré-tratamento químicos	31
2.6.3 Pré-tratamento físico-químicos	32
2.6.4 Pré-tratamento biológicos	33
2.7 Hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	35
2.7.1 Hidrólise ácida.....	35
2.7.2 Hidrólise enzimática.....	36
2.8 Planejamento Experimental.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Obtenção e preparação da palha	41
3.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar	42
3.3 Análises aplicadas à palha de cana-de-açúcar	43
3.3.1 Determinação dos açúcares redutores (AR).....	43
3.3.2 Avaliação do rendimento e da solubilização da fração sólida da palha da cana-de-açúcar	44
3.3.2.1 Rendimento da fração sólida da palha de cana-de-açúcar.....	44
3.3.2.2 Solubilização da fração sólida da palha de cana-de-açúcar.....	44
3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR)	45
3.4 Hidrólise enzimática	45
3.4.1 Determinação da atividade enzimática	47

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Planejamento experimental e otimização do pré-tratamento ácido.....	49
4.2 Avaliação do rendimento e da solubilização da fração sólida da palha da cana-de-açúcar	53
4.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR)	55
4.4 Hidrólise Enzimática	56
5 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem se observado uma crescente preocupação com relação à redução de fontes de combustíveis fósseis, assim como com as mudanças climáticas transcorridas pelas emissões de gases de efeito estufa (GEE). Esses dois fatores associados têm promovido a busca por fontes alternativas de energia e de sua eficiência nos mais diferenciados setores produtivos. Com isso, a aplicação de energias renováveis, dentre elas os biocombustíveis, se torna um importante caminho na tentativa de solucionar esses problemas (ROITMAN, 2018; MILANEZ *et al.*, 2015).

Os biocombustíveis são derivados de matérias-primas renováveis que causam um menor impacto na natureza, e surgem como alternativas de maior potencial para a substituição dos combustíveis fósseis, visto que são realizados a partir de produtos agrícolas, como a cana-de-açúcar, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Sua utilização é através da queima de biomassa ou de seus derivados. O Brasil vem apresentando condições fundamentais e essenciais para se tornar um líder no campo de produção de energias renováveis, e essa questão energética é uma influência para o país se tornar autônomo (AZEVEDO; LIMA, 2016).

Os problemas acarretados pelo uso de combustíveis fósseis podem ser minimizados, total ou parcialmente, por biocombustíveis produzidos a partir de fontes renováveis os quais são menos poluentes, sendo que o etanol se apresenta como um dos mais favoráveis na matriz energética de muitos países como forma de reduzir a dependência pelos combustíveis fósseis. O etanol, por sua vez, pode ser produzido a partir de diferentes matérias-primas, por exemplo, cana-de-açúcar, arroz, milho, entre outras fontes (RESENDE, 2016). Esse etanol é chamado de etanol de primeira geração (E1G) pois seu processo é originário da sacarose dessas matérias-primas. O etanol de segunda geração (E2G) é aquele produzido a partir da lignocelulose que se encontram em resíduos de origem vegetal (NOVACANA, 2017).

O interesse pelo etanol de segunda geração vem crescendo e está estimulando pesquisadores para desenvolverem pesquisas voltadas para ampliação da produtividade de etanol de cana-de-açúcar no Brasil. O propósito é utilizar a palha e o bagaço que são fontes de lignocelulose, como matéria-prima para a produção de biocombustíveis (ANDRADE, 2014).

A palha da cana-de-açúcar se evidencia como fonte energética entre os diferentes tipos de biomassa, e apresenta um grande potencial de geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico (SANTOS, 2013). Com relação ao potencial da palha disponível, é possível recuperar um teor de biomassa seca correspondente a 14% da massa de cana, dependendo da

forma de colheita. E sua recuperação, que considera uma quantidade adicional de biomassa lignocelulósica, é de 140 kg por tonelada de cana (NOVACANA, 2017).

O material lignocelulósico é uma estrutura cristalina vegetal altamente firme e fibrosa, constituída dos polissacarídeos de celulose, hemicelulose, lignina, além de pequenas quantidades de extrativos e minerais, e que para suas estruturas serem rompidas necessitam de alguns processos. Inicialmente é necessário um pré-tratamento, onde ocorrerá a separação das frações de celulose, hemicelulose e lignina que é dependente do tipo de pré-tratamento, em seguida, é feita a hidrólise enzimática ou ácida, para que possa chegar aos açúcares a partir das separações das frações do pré-tratamento e, então assim ocorra a fermentação da glicose para a produção do bioetanol (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Um dos maiores desafios para a preparação de biocombustíveis (E2G) é a etapa de pré-tratamento da biomassa, que será primordial para o processo de bioconversão, uma vez que, é nesta etapa que será realizada a modificação da estrutura lignocelulósica com a finalidade de liberar maiores quantidades de açúcares possíveis das pentoses e hexoses, deixando a separação entre os componentes mais eficientes, evitando a formação de compostos inibidores que impossibilitem a hidrólise. Existem alguns pré-tratamentos (físicos, químicos, físico-químicos e microbiológicos) que são utilizados nesses materiais, não existindo um em especial para sua aplicação, pois cada um apresenta suas vantagens e desvantagens, dependendo da matéria-prima empregada (FERREIRA, 2016).

A hidrólise enzimática é uma reação química em meio aquoso em que uma enzima quebra uma molécula em partículas menores. Em relação a produção de etanol E2G, a hidrólise enzimática acontece após o pré-tratamento da biomassa. É nesta etapa que a parede celular vegetal é digerida pelas as enzimas liberando os açúcares (C6 e C5) que serão convertidas sucessivamente em etanol pelas leveduras no processo de fermentação (GRANBIO, 2018). Devido a característica resistente das matérias-primas utilizadas, a hidrólise enzimática é muito lenta e difícil de atingir rendimentos elevados em açúcares se não for realizado preliminarmente na biomassa um pré-tratamento eficiente (SANTOS *et al.*, 2014).

O Brasil apresenta grandes vantagens em relação a outros países quando se fala em etanol de segunda geração, pois oferece fácil disponibilidade com grandes quantidades de matéria-prima, diante das possibilidades do uso do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, e integrando a estrutura já existentes nas unidades produtoras tornando o processo com menores custos de instalação e operação (PACHECO, 2011).

Neste trabalho foram realizados estudos para determinar as melhores condições de pré-tratamento e de hidrólise enzimática da palha de cana-de açúcar, com vistas à produção de

etanol de segunda geração. Em ambos os casos se aplicou um planejamento fatorial, sendo as eficiências dos processos verificadas através da análise de açúcares redutores liberados.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Realizar um estudo de pré-tratamento ácido e de hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol de segunda geração.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar um pré-tratamento físico (moagem) e a uniformização da palha quanto à granulometria;
- Realizar a otimização do pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com diferentes concentrações de ácido sulfúrico e em distintas condições de tempo e temperatura;
- Quantificar os açúcares redutores liberados e a solubilização das frações sólidas da palha de cana-de-açúcar na etapa de pré-tratamento;
- Avaliar as variações na estrutura química dos componentes da palha de cana-de-açúcar por espectroscopia na região do infravermelho nos ensaios de maiores concentrações de açúcares redutores;
- Realizar a hidrólise enzimática do ensaio que apresentou a melhor eficiência, na etapa de pré-tratamento e verificar a sua eficiência através da quantificação de açúcares redutores liberados no processo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma importante fonte de energia para os seres humanos e um grande substituto para o combustível fóssil de veículos automotores. A cana teve os primeiros cultivos no Sul da Ásia Leste e Índia Ocidental (327 a.C.) e em seguida foi introduzida ao Egito (647 d.C.) e após um século, na Espanha (755 d.C.). Desde essa época, esse cultivo foi estendido a quase todas as regiões tropicais e subtropicais (SUGARCANE, 2012).

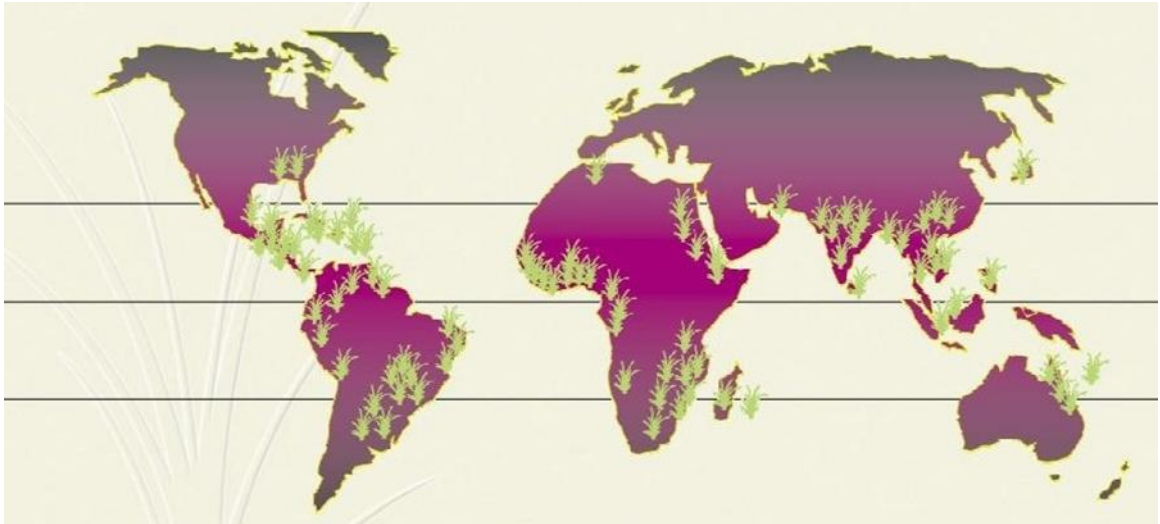
Na América a cana foi difundida em 1943 por Cristóvão Colombo, em sua segunda viagem ao continente, de onde era genro de um grande produtor de açúcar na Ilha da Madeira, e o seu plantio foi estabelecido. No Brasil, foi Martim Affonso de Souza em 1532 que trouxe a primeira muda de cana-de-açúcar e iniciou o seu cultivo na Capitania de São Vicente, onde ele construiu o engenho de açúcar. Mas foi nas Capitanias de Pernambuco e Bahia, no Nordeste, que os engenhos de açúcar começaram a se multiplicar (SANTIAGO *et al.*, 2006).

Em geral, as plantas convertem menos de 1% da luz em energia química, já a cana converte cerca de 2% da radiação solar incidente em açúcares, entre os quais dois terços estão na conformação de celulose e lignina, que são insolúveis, e um terço correspondendo a sacarose que se encontra presente no caldo. Com isso, o Brasil, que se localiza predominantemente na faixa tropical e subtropical do planeta, recebe intensa radiação solar ao longo de todo o ano, sendo isso um pilar para a produção de energia (RODRIGUES, 2010).

A expansão significativa da cana-de-açúcar com finalidade energética ocorre devido a sua competitividade no mercado. Nessas circunstâncias houve um aumento de seus derivados, especialmente da biomassa destinada a energia elétrica, destacando que parte dessa produção de biomassa produzida pode ser direcionada a produção de etanol pelo processo da hidrólise (MME, 2007).

Segundo Bessa (2013) a vasta área de produção da cana-de-açúcar no mundo nos dá uma visão que mais de 100 países poderiam produzir biocombustíveis e que o Brasil possui uma maior disponibilidade de terra para se tornar competitivo com o mercado (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição mundial de cana-de-açúcar

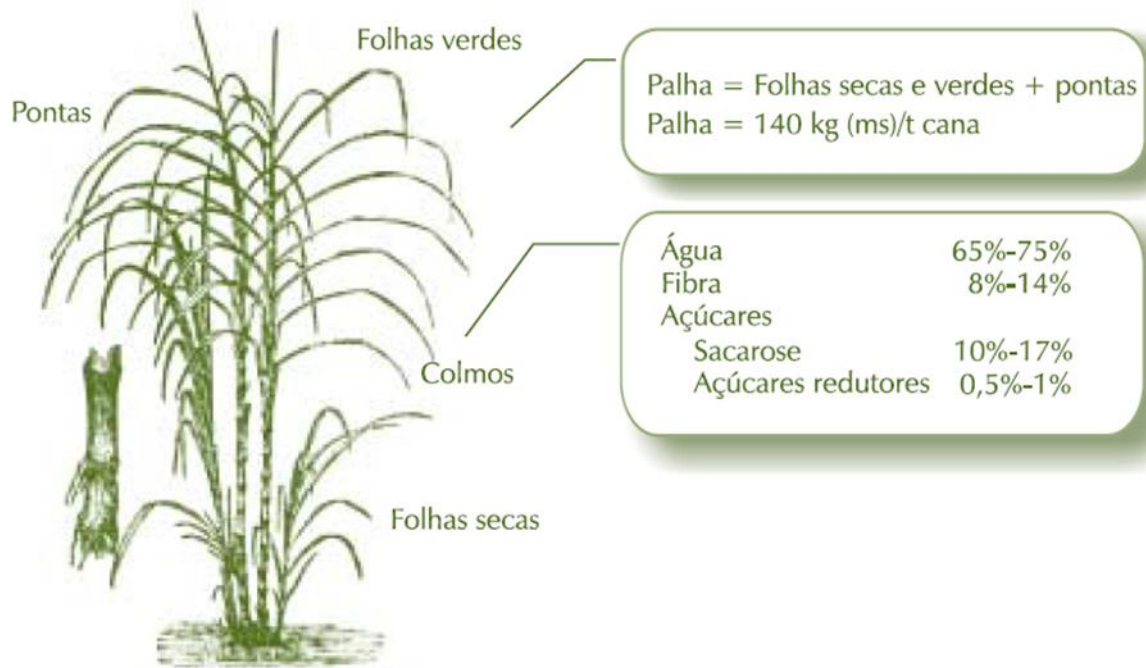


Fonte: Bessa, 2013.

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence ao gênero *Saccharum* e existe pelo menos mais seis espécies deste gênero, é da família Poaceae, representada pelo milho, arroz, sorgo e outras gramíneas. E as principais características desta família é o crescimento do caule em colmos, seus ramos, as folhas com lâminas em suas bordas e a bainha aberta (SANTOS, 2013).

A estrutura da cana-de-açúcar é formada pelos colmos que é a parte alta da planta, onde encontramos a sacarose, e a palha onde se encontra as pontas e folhas, como é demonstrado na Figura 2 (BNDES; CGEE, 2008).

Figura 2 – Estrutura da cana-de-açúcar

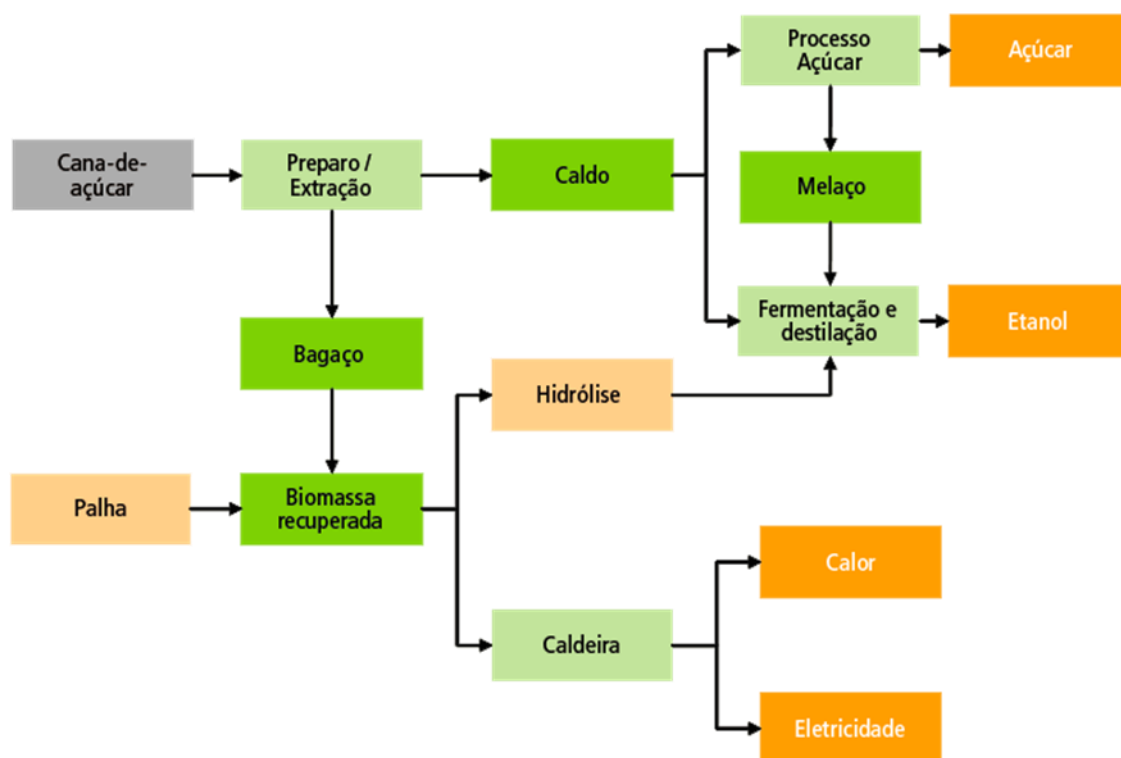


Fonte: BNDES e CGEE, 2008.

O privilégio da cana-de-açúcar de armazenar altos índices de sacarose e biomassa no colmo ao longo de seu crescimento, tornou a planta a mais usada para a obtenção de açúcar e a segunda maior matéria-prima para a obtenção de etanol no mundo (UNICA, 2018).

Na cadeia produtiva da cana-de-açúcar é gerado outros subprodutos durante o processo. O bagaço, que pode ser aproveitado para geração de calor e eletricidade em caldeiras, e ainda tem a opção de seu excedente de energia elétrica ser comercializado e outro subproduto é a palha que chega a representar cerca de um terço do conteúdo energético da cana, e que além de ser utilizada como adubo orgânico no campo, existe um novo cenário para a sua recuperação, que é a biomassa com destinação para a produção de etanol de segunda geração por meio da hidrólise, como mostra a Figura 3 (MME, 2007).

Figura 3 – Cadeia de produção da cana-de-açúcar



Fonte: MME, 2007.

O setor sucroenergético brasileiro, na safra 2018/19, teve uma área total colhida de aproximadamente 8,6 milhões de hectares, tendo ocorrido uma queda de 1,6% comparado ao ano anterior, e em relação a produtividade média, foi de 72,2 tc/ha, onde também obteve uma ligeira queda de 0,4% com relação à safra anterior (MME, 2019).

2.2 Palha da cana-de-açúcar

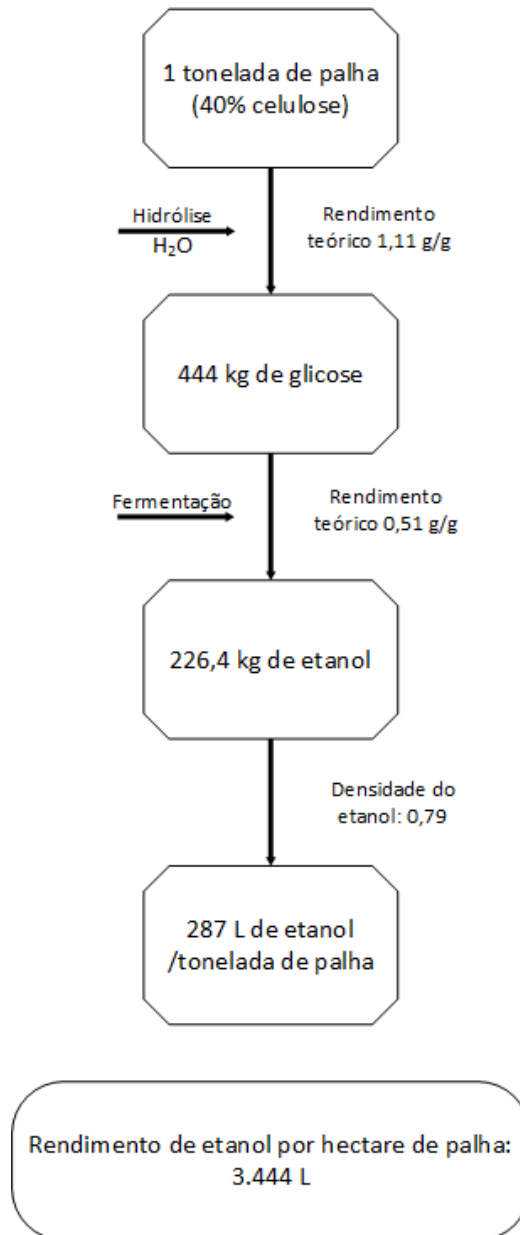
A palha da cana-de-açúcar como um elemento energético foi percebido aproximadamente nos anos de 1990, tendo se mostrado como uma excelente fonte geradora de energia, sendo uma matéria-prima (biomassa) utilizada na produção de etanol de E2G (NOVACANA, 2016). Para cada tonelada de cana-de-açúcar, a produção considerada é de 140 kg de palha (SILVA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2012).

Para que a palha seja utilizada em diversos processos produtivos é necessário que seus componentes sejam separados, transformando-os em matéria-prima (SANTOS, 2018). Um dos desafios para que essa palha seja utilizada é o sistema de colheita adotado para a sua retirada no campo. Esse sistema adotado é a colheita mecanizada que vem a ser o processo da retirada

dos produtos agrícolas do campo usando máquinas colhedoras (BASTOS, 2017). E seu aproveitamento nos próximos anos vai ocupar um lugar de destaque como matéria-prima para a produção de etanol celulósico e isso vem se desenvolvendo devido a um Decreto Federal nº 2.661/98 que estabelece o fim da queima da cana-de-açúcar gradativamente nos próximos 20 anos seguintes a sua promulgação (SANTOS *et al.*, 2012). E esse decreto tem levado a necessidade de encerrar o sistema tradicional de colheita manual com a queima prévia do canavial, com isso, trazendo benefícios socioambientais, como a diminuição da poluição do ar e a geração de matéria-prima para fins energéticos.

De acordo com Santos *et al.* (2012) a produtividade média da cana-de-açúcar é 85 toneladas por hectare e para cada tonelada de cana produzida são gerados cerca de 140 kg de bagaço e 140 kg de palha em base seca. Se considerarmos que toda a palha vá para a produção de etanol, ou seja, as 12 toneladas, e que, toda a glicose será convertida em etanol, ocorrerá um aumento na produção por hectare de palha de 3444 L, sem a necessidade da expansão da área cultivada, e preservando o meio ambiente (Figura 4).

Figura 4 – Rendimento teórico de etanol por hectare de palha



Fonte: Adaptado de Santos, *et al.*, 2012.

2.3 Biocombustíveis

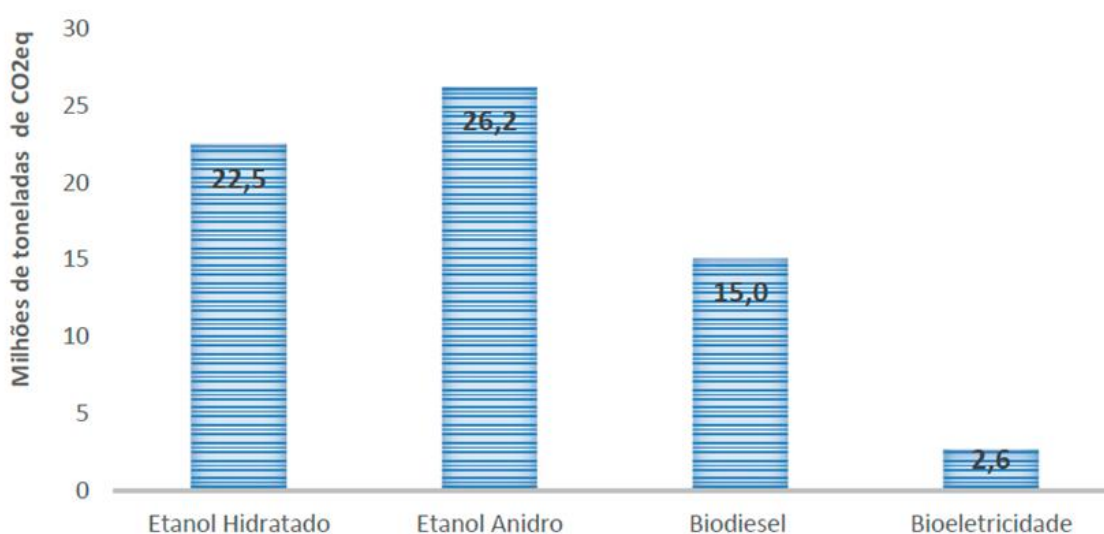
Os biocombustíveis são fontes alternativas de energias derivadas de biomassas renováveis, e assim apresentam baixos índices de emissões de poluentes para a atmosfera. Essas fontes alternativas vêm da produção agrícola ou de vegetais, como a cana-de-açúcar, o milho, a soja, entre outras matérias-primas para sua fabricação (ANP, 2019).

Os principais tipos de biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são o etanol e o biodiesel, sendo o etanol oriundo da cana-de-açúcar que apresenta produção crescente, e o

biodiesel a partir de óleos vegetais ou gorduras animais. O Brasil já usa cerca de 45% da energia e 18% dos combustíveis consumidos renováveis, e com isso, o torna pioneiro mundial no uso de biocombustíveis, alcançando uma posição desejada por muitos países que buscam a substituição dos combustíveis derivados do petróleo por fontes renováveis de energias alternativas (ANP, 2019).

A Figura 5 descreve as emissões evitadas decorrentes do uso de biocombustíveis (etanol hidratado, etanol anidro e biodiesel) e da bioeletricidade da cana.

Figura 5 - Emissões evitadas com uso de biocombustíveis



Fonte: MME, 2019.

As principais vantagens do uso de biocombustíveis são as produções a partir de plantas que absorvem CO₂, assim permitindo a produção de combustíveis que não emitam gases de efeito estufa, que poluem as cidades, que são os principais responsáveis pelo aquecimento global. Outra vantagem é a redução da dependência energética com relação aos combustíveis fósseis. Em março de 2007, os Estados-Membros da UE reunidos em Conselho, definiu como um objetivo de vínculo a utilização de pelo menos, 10% de biocombustíveis, nos combustíveis utilizados nos setores de transportes até 2020, devido as suas ótimas características (REIS, 2019).

A Matriz Energética Brasileira é considerada limpa e está entre as mais limpas do mundo, com aproximadamente 47,5% vindo de fontes renováveis, enquanto que no resto do mundo esta participação é em média de 13% (MMA, 2019).

2.4 Etanol de segunda geração

A produção do etanol por materiais lignocelulósicos está sendo executadas por tecnologias em fase de desenvolvimento. O etanol de segunda geração tem como matéria-prima a lignocelulose, esse material é proveniente da biomassa, e este componente encontra-se presente em resíduos de origem vegetal. É dessa matéria-prima que são extraídos os açúcares da celulose. As fontes lignocelulósicas para a produção do E2G, são os resíduos da cana-de-açúcar (palha e bagaço), palha do trigo, palha do milho, palha do arroz, bagaço do sorgo sacarino, gramíneas entre outros. (MILANEZ *et al.*, 2015). Essas matérias-primas são abundantes e disponíveis ao redor do planeta gerando emissões de GEE muito baixas, assim reduzindo o impacto ambiental (CORTEZ, 2010).

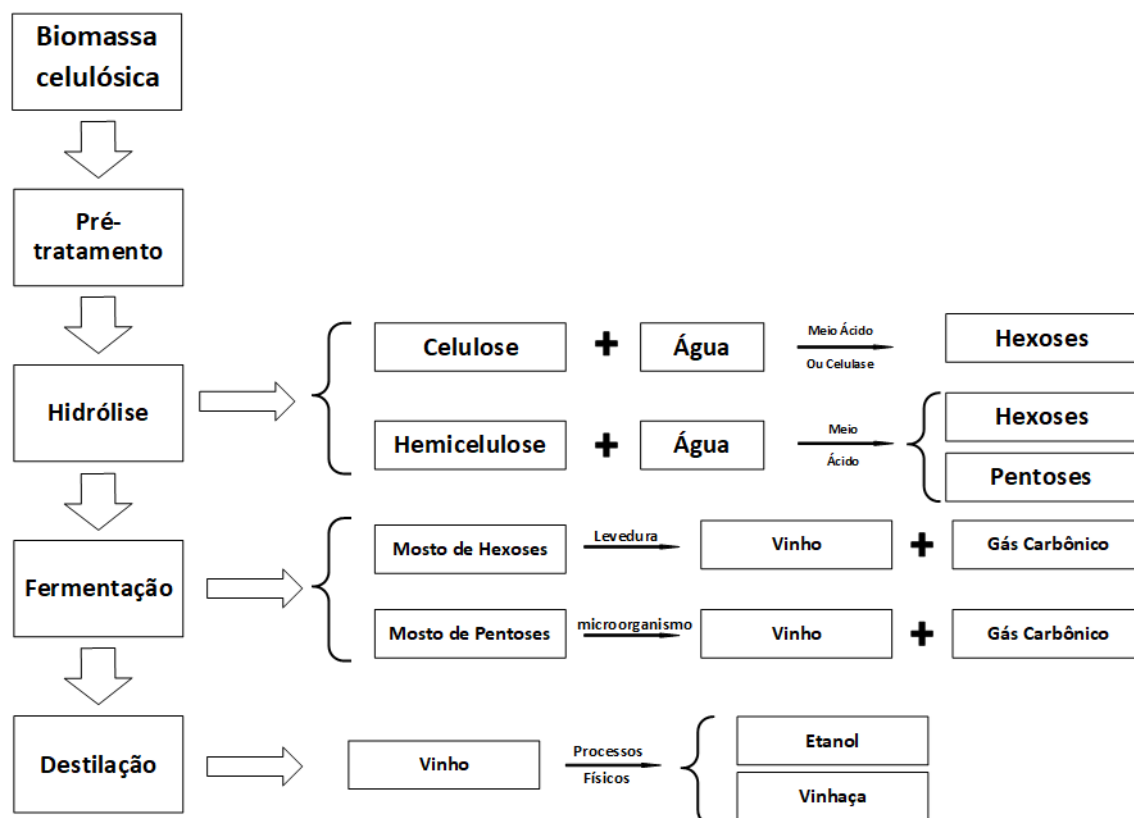
O objetivo no processo de alcance do etanol celulósico é separar a parede celular para usar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentáveis. Como esta estrutura é complexa o processo deve ser feito com cautela para preservar os monossacarídeos intactos, pois serão usados na fermentação (CORTEZ, 2010).

O potencial energético da cana-de-açúcar é alto, pois são constituídos de dois terços de material lignocelulósico, e a estimativa é de que o aproveitamento das palhas, pontas e bagaço eleve a produção de etanol em torno de 30% a 40% para uma mesma área plantada (PACHECO, 2011).

A produção do etanol de segunda geração para ser realizada e chegar ao seu produto final, são necessárias quatro etapas primordiais (Figura 6), de forma que esses materiais lignocelulósicos possam realizar essas conversões. Essas etapas são: o pré-tratamento, a hidrólise enzimática, a fermentação e a destilação (AGUIAR, 2017).

O Brasil começou a produzir o E2G em escala comercial a partir do bagaço e da palha da cana-de-açúcar em 2014 pela empresa GranBio, a biorrefinaria batizada de Bioflex 1 e teve sua planta instalada no estado de Alagoas, sendo a primeira do Hemisfério Sul. Na época só dois países produziam o etanol celulósico, a Itália e os Estados Unidos. Hoje o Brasil possui mais uma empresa que produz etanol celulósico, a Raízen, em Piracicaba no estado de São Paulo. (GRANBIO, 2018; MARQUES, 2018).

Figura 6 – Etapas de produção do E2G

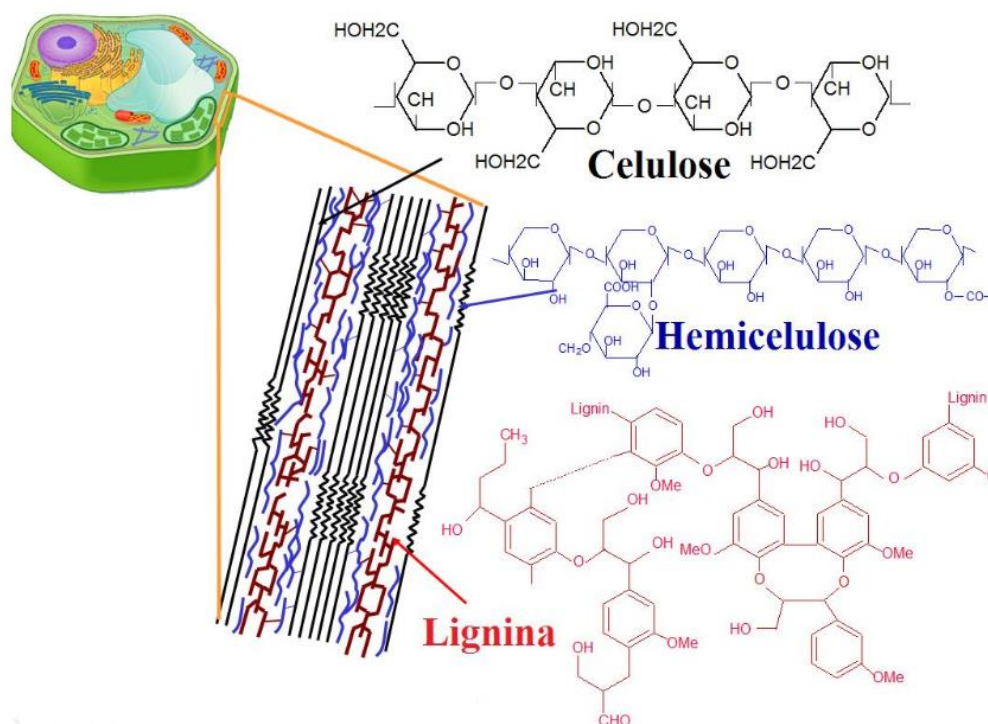


Fonte: Adaptado de DEDINI, 2008.

2.5 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica, em geral, é constituída por lignina (10-25%), celulose (35-50%) e hemicelulose (20-35 %), extrativos e minerais (SANTOS *et al.*, 2014). São materiais com alto teor de celulose, um polissacarídeo formado por longas cadeias de glicose, que são passíveis de serem usados como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração, entre os quais, resíduos em processos produtivos dos setores agrícola, florestal e industrial, nesse último caso a palha e o bagaço (LORA; VENTURINI, 2012).

Essa biomassa lignocelulósica (Figura 7), possui uma estrutura cristalina vegetal altamente resistente que deve ser rompida por meio de pré-tratamentos para disponibilizar as frações de celulose e hemicelulose na forma de açúcares fermentescíveis (RESENDE, 2016).

Figura 7 – Biomassa lignocelulósica

Fonte: Zampieri, 2015.

Na Tabela 1, são apresentadas a composição química aproximada de algumas biomassas que podem ser usadas para a produção de etanol de segunda geração.

Tabela 1 – Composição química da biomassa lignocelulósica de diferentes materiais

Biomassa lignocelulósica	% Celulose	% Hemicelulose	% Lignina
Palha de cana	40 – 44	30 – 32	22 – 25
Bagaço de cana	32 – 48	19 – 24	23 – 32
Madeira dura	43 – 47	25 – 35	16 – 24
Madeira mole	40 – 44	25 – 29	25 – 31
Talo de milho	35	25	35
Espiga de milho	45	35	15
Algodão	95	2	0,3
Palha de trigo	30	50	15
Sisal	73,1	14,2	11
Palha de arroz	43,3	26,4	11
Forragem de milho	38 – 40	28	7 – 21
Fibra de coco	36 – 43	0,15 – 0,25	41 – 45
Fibra de bananeira	60 – 65	6 – 8	5 -10
Palha de cevada	31 – 45	27 – 38	14 – 19

Fonte: Santos, 2013.

A palha da cana-de-açúcar, como sendo uma biomassa lignocelulósica, é composta principalmente de celulose (40% – 44%), hemicelulose (30% – 32%) e lignina (22% – 25%), como apresentado na Tabela 1. E além desses, estão presentes também, em frações menores, cinzas e extrativos (SANTOS *et al.*, 2012).

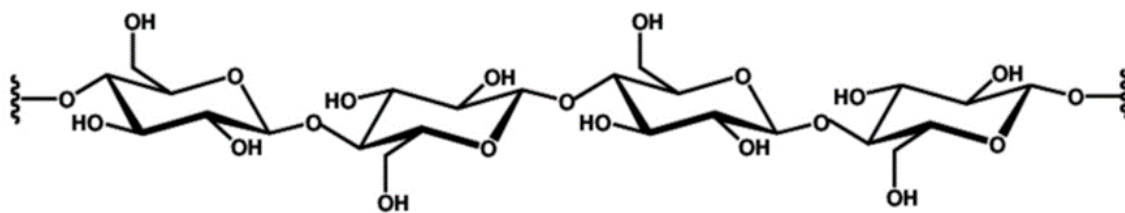
2.5.1 Celulose

A celulose é um dos principais componentes das fibras vegetais, é um polímero linear de glicoses unidas por ligações β -1,4 glicosídicas através da eliminação de uma molécula de água (LORA; VENTURINI, 2012). Celobiose resulta da hidrólise parcial da celulose, onde cada ligação glicosídica forma um polímero de glicose, e estas duas unidades de glicose estão conectadas por uma ligação β -glicosídica, e nos limites de cada cadeia são encontrados dois grupos, um redutor e outro não redutor (SOUZA, 2016).

As ligações intermoleculares entre as moléculas de glicoses próximas são responsáveis pela rigidez da parede e da difícil quebra, já as intramoleculares são responsáveis pelas constituições das fibrilas, que formam as fibras de celulose (OGATA, 2013).

Sua fórmula química é $(C_6H_{10}O_5)_n$ onde sua estrutura é uma cadeia de polímero apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Estrutura molecular da celulose



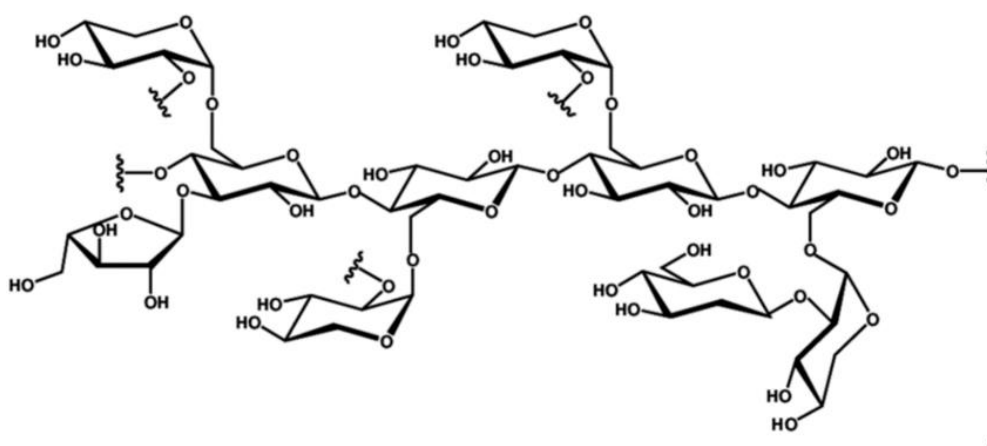
Fonte: Santos, 2013.

A celulose possui duas propriedades importantes para a sua classificação, que é o índice de cristalinidade que está relacionado a reatividade do substrato, e o grau de polimerização, relacionado a frequência de ligações glicosídicas disponíveis para o funcionamento das celulasas (OGATA, 2013). O tamanho da molécula de celulose é feito em termos do seu grau de polimerização, de quanto maior seu grau, menor é a solubilidade, devido as ligações de hidrogênio intermoleculares (SOUZA, 2016).

2.5.2 Hemicelulose

A hemicelulose, segundo componente da biomassa, é uma matriz ramificada que constitui de pentoses (xiloses e arabinose) e hexoses (manose, glicose e galactose), além de ácidos urônicos (Figura 9). A fração de hemicelulose de resíduos agroindustriais é a xilana, que é um polissacarídeo amorfo, que forma a xilose e que pode ser transformada em açúcares monoméricos (RODRIGUES, 2017).

Figura 9 – Molécula da hemicelulose



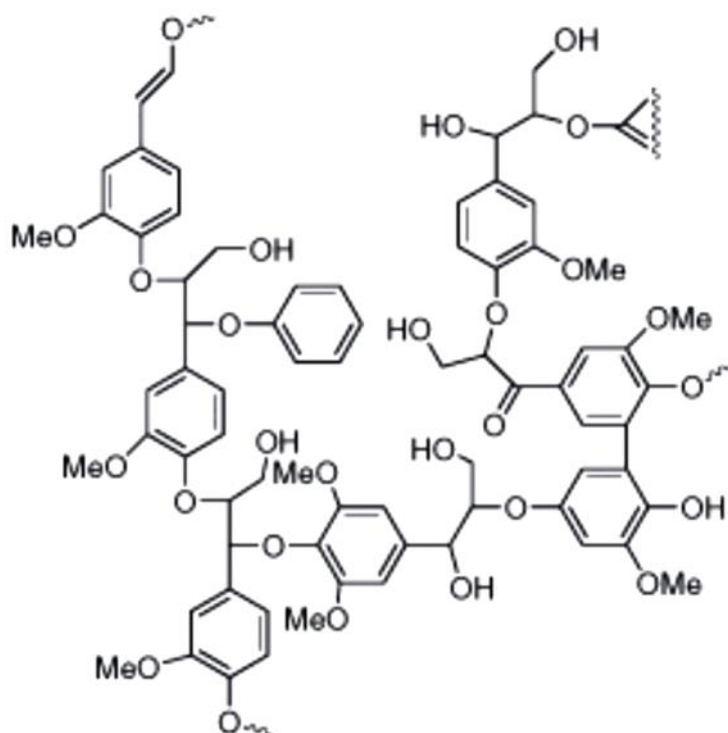
Fonte: Donate, 2014.

Algumas hemiceluloses apresentam a função de fixar a parede celular por meio de ligações covalentes com a lignina e de pontes de hidrogênio com a celulose, e algumas, utilizadas como energia extracelular e como mecanismos que retêm a água nas sementes (OGATA, 2013). Sua estrutura não é cristalina, sendo este um dado relevante em sua composição por ser bastante ramificada, com a presença de grupos acetil ligados à cadeia polimérica (FERREIRA, 2016). Sua hidrólise é relativamente fácil de ocorrer devido à natureza amorfa e ramificada, onde ela é hidrolisada em temperaturas mais baixas tornando-a solúvel em temperaturas mais elevadas (LORA; VENTURINI, 2012).

2.5.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula aromática muito complexa de unidades de fenilpropano e grupos metoxílicos (Figura 10). Sua organização e composição variam de uma biomassa para a outra (SANTOS, 2018)

Figura 10 – Representação da estrutura da lignina



Fonte: Zampieri, 2015.

A lignina apresenta-se como uma rede tridimensional insolúvel, com resistência e desenvolvimento, que afeta o transporte de nutrientes, água e metabólitos na célula vegetal, atuando como ligante entre as células possuindo um material composto com resistência ao impacto, flexão e compressão (FERREIRA, 2016).

Segundo Lora; Venturini (2012), a lignina se apresenta em toda biomassa lignocelulósica, e não é possível a sua conversão em açúcares, por isso, em todo processo de E2G ela vai se apresentar como resíduo. E é degradável só por alguns microrganismos e por meio de processos químicos pode produzir aditivos para os combustíveis.

2.5.4 Extrativos e outros

Os extrativos são responsáveis pelas características das plantas que dão origem a cor, sabor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento e as propriedades abrasivas (SANTOS, 2013). A soma desses componentes varia dependendo da biomassa lignocelulósica e representam cerca de 5% a 20% desse material (CAVALHO, 2011). São concentrados em sua maioria na raiz, no caule e folhas (PRATTO, 2015).

As características das cinzas da palha da cana-de-açúcar se apresentam em partes como uma matéria amorfa que apresenta altos níveis de porosidade interna e que a totalidade dos principais componentes químicos se apresentam acima de 75% podendo ser considerado um material pozalônico (RODRIGUES *et al.*, 2013).

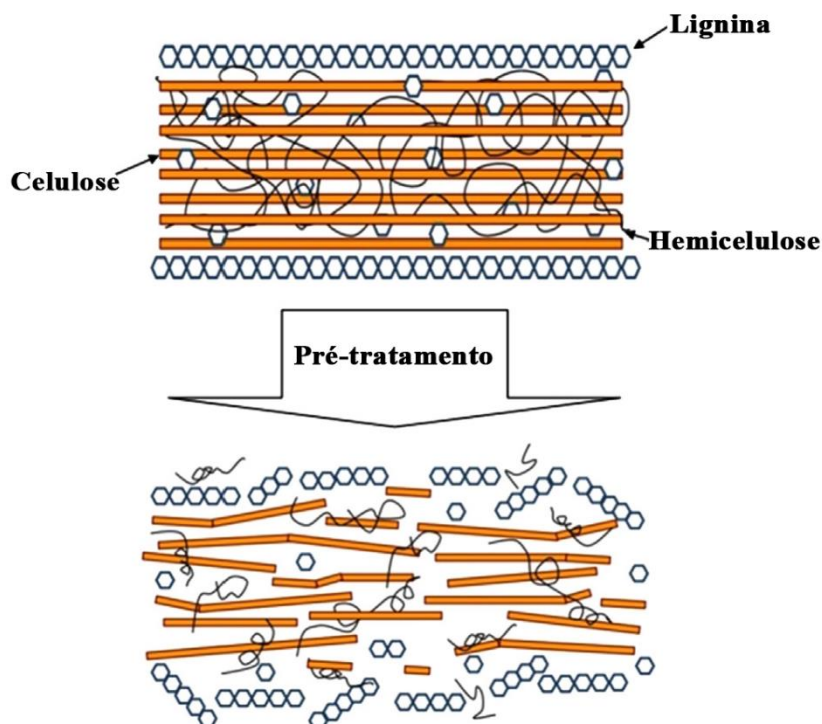
2.6 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Com as necessidades de se alcançar altos níveis de eficiência energética no processo de produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica, o pré-tratamento se faz necessário, pois visa a ruptura da estrutura, com a finalidade de expor a fibra de celulose na etapa seguinte, que é a hidrólise enzimática. Essa etapa vai facilitar a conversão em açúcares fermentáveis das frações da celulose e hemicelulose da biomassa, enquanto diminui a degradação das mesmas, em componentes que não podem ser fermentados, em seguida, em E2G (LORA; VENTURINI, 2012).

Há diferentes métodos de pré-tratamento e cada tipo de biomassa necessita de um método particular, visto que, diversos mecanismos estão envolvidos para romper a estrutura do material e aumentar o rendimento de açúcares fermentáveis (CORTEZ, 2010). Várias abordagens estão sendo estudadas para fornecer melhores resultados neste novo segmento (ALVIRA *et al.*, 2010).

Na Figura 11, se encontram as frações dos componentes da biomassa após o pré-tratamento ácido de uma forma mais simplificada.

Figura 11 – Frações dos componentes da biomassa após o pré-tratamento



Fonte: Mood *et al.*, 2013.

2.6.1 Pré-tratamento físicos

Os pré-tratamentos físicos aumentam a eficiência do processo por meio do acesso a enzimas, ocorrendo as mudanças na biomassa por esses agentes, aumentando a sua cristalinidade, e a área superficial sem alterar seus componentes químicos (ALVIRA *et al.*, 2010).

A moagem, modifica a biomassa em pós finos promovendo a superfície específica da celulose até a quebra da sua estrutura cristalina, ocorrendo a hidrólise enzimática com facilidade (CORTEZ, 2010).

2.6.2 Pré-tratamento químicos

São os que utilizam agentes químicos como bases, ácidos e solventes orgânicos e possui o objetivo de aumentar a superfície do substrato por inchamento das fibras para que a celulose se torne mais acessível às enzimas (SANTOS, 2013).

O processo do pré-tratamento ácido é realizado com ele diluído ou concentrado, para que a hemicelulose seja removida seletivamente se solubilizando e produzindo açúcares

monoméricos e reduzindo o teor de lignina (LORA; VENTURINI, 2012). Dependendo das condições pode existir a formação de furfural e hidroximetilfurfural pela degradação de pentoses e hexoses, podendo influenciar negativamente na etapa da fermentação (SANTOS, 2013).

O pré-tratamento alcalino quebra a ligação entre a lignina para que a celulose tenha acesso a entrada enzimática, e essas bases reduzem o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (MORO, 2015). As bases mais utilizadas são hidróxido de sódio, que apresenta resultados mais eficientes em biomassas quando se objetiva a remoção maior de lignina, e o hidróxido de cálcio diluído, devido a fácil manipulação e custo baixo (PRATTO, 2015).

O pré-tratamento por solventes orgânicos é usado para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose com uma mistura de solventes como metanol, etanol, acetona, entre outros, com um catalisador ácido (H_2SO_4 , HCl) que leva em torno de 40 min a 60 min (BNDES; CGEE, 2008). Comparados com outros pré-tratamentos, este possui uma vantagem que é a recuperação da lignina parcialmente pura que pode ser utilizada como subproduto (ALVIRA *et al.*, 2010).

2.6.3 Pré-tratamento físico-químicos

São os pré-tratamentos que compreendem métodos combinados, que juntam os efeitos físicos com os efeitos químicos para se chegar a uma melhor eficiência na etapa seguinte do processo (CORTEZ 2010).

O pré-tratamento por explosão a vapor onde a matéria-prima é tratada com vapor saturado que penetra e condensa formando dentro das fibras água líquida, que após a descompressão esta água evapora, pois se encontra em equilíbrio gerando uma explosão no interior das fibras promovendo a hidrólise da hemicelulose e a decomposição parcial da lignina (OLIVEIRA, 2010). Esse pré-tratamento chega a diminuir a formação de compostos inibidores e aumenta a eficiência da hidrólise enzimática (SEABRA, 2008).

Pré-tratamento hidrotérmico é aquele submetido a temperaturas e pressões elevadas usando água para fragmentar a biomassa vegetal através do afastamento da celulose e lignina rompendo as ligações glicosídicas, com a formação de ácido acético a partir da fração de hemicelulose, o qual atua como um catalisador da reação que promove a despolimerização do complexo lignocelulósico (OLIVEIRA, 2010). Esse tipo de pré-tratamento é chamado também de auto-hidrólise, fracionamento aquoso ou fracionamento a vapor (SANTOS, 2013).

O pré-tratamento com explosão de fibras com amônia (Afex – ammonia fiber explosion) é um método alcalino onde a amônia líquida é exposta a uma moderada temperatura (abaixo de 100 °C) e elevadas pressões (acima de 3 MPa), por um período de tempo (10 a 60 min) seguida de uma descompressão (CORTEZ, 2010). Apenas uma pequena quantidade de material sólido é solubilizada, e a hemicelulose, é degradada a açúcares tornando assim baixa a sua remoção, junto com a lignina, se tornado mais acessível a hidrólise (MORO, 2015).

2.6.4 Pré-tratamento biológicos

Esse pré-tratamento utilizam microrganismos como bactérias ou fungos para a deslignificação e a redução do grau de polimerização da celulose e hemicelulose (SANTOS, 2013). Usa-se principalmente fungos marrons, brancos e de podridão macia que atacam menos a celulose e deterioram a lignina e hemicelulose (ALVIRA, *et al.*, 2010). Possui como vantagens uma baixa demanda energética, não produz metabólitos indesejáveis e possuindo um processo limpo e efetivo. Suas desvantagens é que são processos lentos para se aplicar industrialmente; os microrganismos não são seletivos; e requerem longos tempos de reação (MORO, 2015).

A Tabela 2 apresenta as principais características dos pré-tratamentos dos componentes da biomassa lignocelulósica, bem como algumas vantagens e desvantagens.

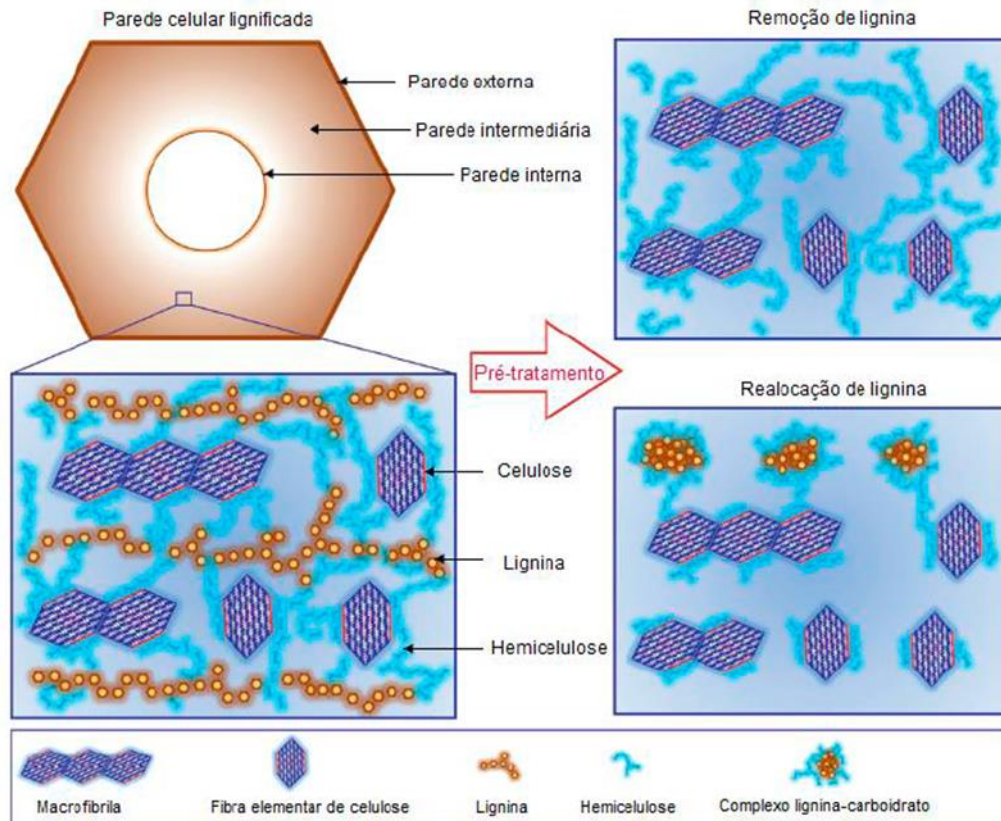
Tabela 2 - Efeito de diferentes pré-tratamentos na biomassa lignocelulósica

	Pré-tratamento	Características			Vantagens	Desvantagens
		Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Físico	Moinho de bolas	Intensiva diminuição da cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia
Químico	Hidrólise com ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção	Condições Médias; altas produção de xilose	Difícil recuperação do ácido; corrosivo
	Hidrólise com NaOH	Inchamento significativa	Considerável solubilidade	Considerável Solubilização > 50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro
	Hidrólise com Ca(OH) ₂	Pouca despolimerização	Significativa solubilização	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil; baixo custo	Menor efetividade devido à pouca solubilidade
	Solventes orgânicos	Considerável inchamento	Significativo, quase completa	Significativo; quase completa	Alta produção de xilose; efetiva deslignificação	Recuperação de solvente com alto custo
Biológico	Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~ 40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia; efetiva deslignificação	Perda de Celulose; baixa taxa de hidrólise
Físico-químicos	Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Energia eficiente; sem custo de reciclagem	Degradação da xilana como produto inibitório
	AFEX Ammonia fiber explosion	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilidade	10-20% de solubilização	Menor perda de Xilanas; não forma inibidores	Recuperação de Amônia; não efetivo para lignina

Fonte: Adaptado de Santos, 2013.

Segundo Pratto (2015), a aplicação de pré-tratamento tem mostrado uma boa alternativa para aumentar a efetividade na produção de açúcar, diminuindo a formação de inibidores e com isso, reduzindo o tempo do processo. É possível visualizar esse resultado na Figura 12.

Figura 12 – Resultado do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica



Fonte: Pratto, 2015.

2.7 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

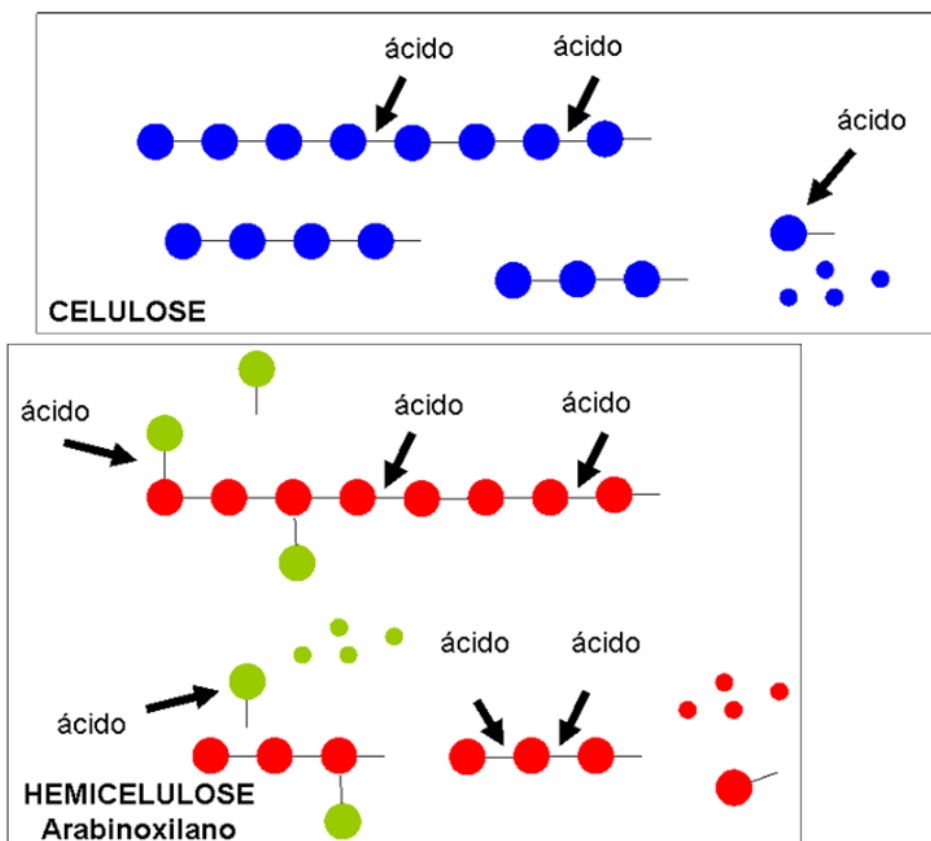
2.7.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida ocorre quando se usa um ácido mineral em uma solução aquosa, podendo ser utilizado de forma diluída ou concentrada. Esse processo contribui para o avanço de tecnologias limpas (HIJAZIN *et al.*, 2010). E os ácidos mais empregados são o ácido sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido clorídrico (HCl) (VASCONCELOS, 2017).

A hidrólise ácida, diluída (utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação baixos) ou concentrada (conduzidos em condições mais brandas, porém, com tempos de reação mais longos), ocorre em duas fases para utilizar as diferenças entre celulose e hemicelulose. O primeiro que envolve a hidrólise da hemicelulose, trazida conforme as condições do pré-tratamento abordados anteriormente. Na segunda fase, são aplicadas temperaturas mais altas desejando potencializar a hidrólise da fração celulósica (BNDES; CGEE, 2008).

De acordo com Cortez (2010), a parede celular da fibra vegetal quando utilizada a hidrólise ácida com ácido sulfúrico, indicam as ligações glicosídicas de diferentes tipos, atacando de formas similares a hemicelulose (arabinoxilano), que possuem ligações do tipo α (ramificações de ácido glucorônico e arabinose) que são as primeiras a serem quebradas, e subsequentemente, são quebradas as ligações β (como β -1,4 dos xilanos), e a celulose que é a última a ser hidrolisada por possuir forte interação (Figura 13). Onde a bolinha azul é a glicose, bolinha vermelha a xilose e a verde sendo arabinose, as bolinhas pequenas representam os açúcares sendo degenerado pelo ácido, que formam compostos como os fufurais, que não são açúcares, e os traços entre as esferas representam as ligações glicosídicas nos polissacarídeos.

Figura 13 – Diagrama da hidrólise ácida da celulose e arabinoxilano (hemicelulose)



Fonte: Cortez, 2010.

2.7.2 Hidrólise enzimática

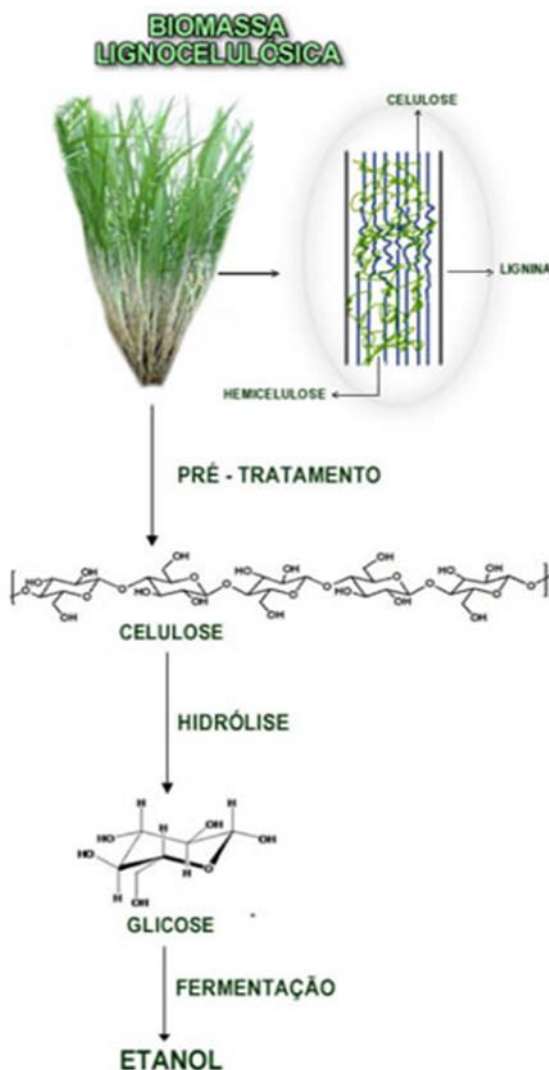
A hidrólise enzimática é uma reação química na qual uma enzima quebra uma molécula em outras menores utilizando água (GRANBIO, 2018). As enzimas que são proteínas bastantes

complexas que reduzem a energia de ativação solicitada na reação e funcionam como catalisadores sendo responsáveis pelas diferentes fases do metabolismo (HIJAZIN *et al.*, 2010).

De acordo com Andrade *et al.* (2019), a hidrólise enzimática é um processo demorado para se atingir altos rendimentos em açúcares, devido à resistência da biomassa, se faz necessário o pré-tratamento previamente, para que a hidrólise se torne mais eficiente.

Segundo Bussamra (2014), atualmente para que processos de hidrólise enzimática aconteçam, são ofertadas diversas classes existentes, onde as moléculas de celulose ou hemicelulose são transformadas em monômeros de glicose ou xilose e essas enzimas atuam de forma conectada mais diferenciam-se entre si quando se consideram as regiões em que atuam, ou seja, quais regiões do substrato que são hidrolisadas (Figura 14).

Figura 14 - Hidrólise enzimática degradando a biomassa lignocelulósica



Fonte: Santos *et al.*, 2012.

Neste caso, esta hidrólise é catalisada por celulasas, que é um complexo enzimático que se apresenta em ação combinada com dois ou mais fatores representados pelas endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades. Essas enzimas são responsáveis pela rápida solubilização da fibra de celulose (SANTOS, 2013).

Os três grupos associados a estas enzimas celulósicas utilizadas na hidrólise atuam de formas diferentes:

a) Endoglucanases (EG)

As endoglucanases são responsáveis por iniciar a hidrólise e pela redução do grau de polimerização, também afastam as ligações internas da fibra em diversos graus (RUBIC, 2013). Hidrolisam a estrutura amorfa da celulose internamente liberando oligossacarídeos menores. (SANTOS, 2013).

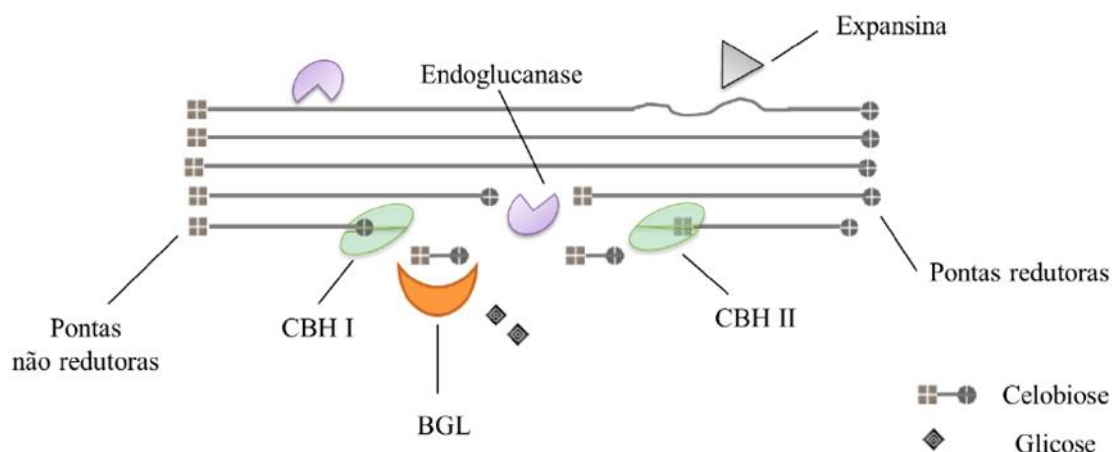
b) Exoglucanases (ExG)

Exoglucanases são constituídas pelas celobiohidrolases (CBHs) e glucanohidrolases (GHs). Suas características são de hidrolisar as principais fibras celulósicas liberando a glicose diretamente dos polímeros (VÁSQUEZ, 2007). São responsáveis por atuarem na região externa da celulose e de remover unidades de celobiose degradando os oligômeros (PRATTO, 2015).

c) β -glucosidases (BG)

No grupo da β -glucosidases são responsáveis de hidrolisar celobiose, que atua como um forte inibidor da atividade das exoglicanases, e da celodextrinas (trioses e tetraose) em glicose (SOUZA, 2016). Para que haja uma diminuição da concentração de celobiose, o indicado é adicionar este componente puro e em pequenas quantidades no meio, para que não haja aglomeração desse dissacarídeo (PRATTO, 2015).

A Figura 15 mostra a ação sinérgica das celulasas sobre a biomassa lignocelulósica.

Figura 15 - Representação da atuação da celulose na biomassa lignocelulósica

Fonte: Bussamra, 2014.

De acordo com Hamelinck *et al.*, (2004), a hidrólise enzimática é a melhor opção, comparados a os outros processos (Tabela 3) pois além de possuir altos rendimentos (75 – 85%), e com planejamentos de melhorias para que chegue até 95%, como também, se compararmos as temperaturas e tempos envolvidos em todos os processos.

Tabela 3 – Comparação das condições do processo para a hidrólise de celulose

Processo	Condição de catálise	Temperatura	Tempo	Rendimento de glicose
Ácido diluído	< 1 % H ₂ SO ₄	215 °C	3 min	50 % - 70%
Ácido concentrado	30 % - 70% H ₂ SO ₄	40 °C	2 – 6 h	90 %
Enzimático	Celulase	70 °C	1,5 dia	75% → 95%

Fonte: Adaptado de Hamelinck *et al.*, 2004.

Os fatores que mais influenciam na obtenção de rendimentos ótimos da hidrólise são o tipo de pré-tratamento efetuado no substrato, ocorrência do conteúdo de hemicelulose presente e de lignina; aparecimento de celobiose (produto intermediário) no meio reacional o qual inibe a ação da enzima; temperatura, concentração do substrato; a velocidade de agitação (ARAÚJO *et al.*, 2013; CARVALHO, 2011). A cristalinidade e o grau de polimerização da celulose; tamanho das partículas do material também são fatores importantes para uma hidrólise com melhores rendimentos (BUSSAMRA, 2014).

2.8 Planejamento Experimental

O planejamento experimental é uma técnica que vem sendo utilizada por pesquisadores com o objetivo de determinar quais as variáveis que exercem maior influência no desempenho de um determinado processo. Quando associada à análise de superfícies de respostas, é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, capaz de fornecer informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (CALADO; MONTGOMEY, 2003; BOX *et al.*, 1978 apud RODRIGUES; IEMMA, 2009).

As técnicas de planejamentos experimentais vêm crescendo devido a necessidade de aprimoramento da busca de minimizar custos, tempos, aumento de rendimento e a produtividade dos processos e produtos. Para que esse planejamento seja eficiente faz-se necessário a integração entre o processo e a estatística utilizando softwares que facilitem esses estudos (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

É importante, observar que antes de começar a realizar os experimentos, os objetivos e os critérios devem ser bem claros, de modo a dar subsídios para a escolha das variáveis envolvidas nos experimentos; da faixa de variação das variáveis selecionadas; dos níveis escolhidos para essas variáveis; da variável resposta (CALADO; MONTGOMEY, 2003).

O emprego dessa metodologia apresenta algumas vantagens tais como: redução do número de experimentos ou repetições e melhora da qualidade da informação obtida através dos resultados, ou seja, há uma redução do tempo de trabalho e custo final; os fatores são analisados de forma simultânea; há uma possibilidade de se otimizar mais de uma resposta simultaneamente (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Tecnologia Sucroalcooleira, Operações Unitárias, Análises físico-química e de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB.

3.1 Obtenção e preparação da palha

A palha da cana-de-açúcar (safra 2017/2018) utilizada no desenvolvimento do presente trabalho foi cedida pela Usina Japungu Agroindustrial S.A., localizada no município de Santa Rita – PB, e encaminhada ao Laboratório de Tecnologia Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba em sacos plásticos de 15 L. Inicialmente foi realizada a lavagem da palha em água corrente com o auxílio de uma peneira para remoção da areia remanescente e ao final do processo de lavagem foi colocada sobre uma lona para secagem ao ar livre, sob o sol (Figura 16). Após a secagem, a palha passou por um processo de moagem no moinho de facas (SOLAB/SL-31), em seguida foi peneirada em peneira elétrica (MATEST/R-813800) de 12 mesh para uniformização da sua granulometria.

Figura 16 - Secagem da palha



Fonte: Autor, 2018.

3.2 Pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar

Os experimentos de pré-tratamento foram realizados conforme um planejamento experimental fatorial linear 2^3 , com 3 (três) pontos centrais e 8 (oito) combinações únicas, totalizando 11 (onze) ensaios. Os fatores independentes avaliados foram: concentração de H_2SO_4 (0,1M; 0,2M; 0,3M), temperatura (60°C; 80°C; 100 °C) e tempo (20 min.; 40 min.; 60 min.), sendo os experimentos realizados em duplicata.

A concentração de açúcares redutores foi a variável dependente ou resposta. As Tabelas 4 e 5 apresentam os fatores independentes e níveis codificados e a matriz do planejamento experimental fatorial, respectivamente.

Tabela 4 - Níveis dos fatores utilizados na otimização do pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H_2SO_4

Fatores	Níveis experimentais		
	-1	0	+1
Concentração H_2SO_4 (M)	0,1	0,2	0,3
Tempo (min.)	20	40	60
Temperatura (°C)	60	80	100

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 5 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 para o pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H_2SO_4

Ensaio	Concentração H_2SO_4 (Molaridade)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	0,1 (-1)	20 (-1)	60 (-1)
2	0,3 (+1)	20 (-1)	60 (-1)
3	0,1 (-1)	60 (+1)	60 (-1)
4	0,3 (+1)	60 (+1)	60 (-1)
5	0,1 (-1)	20 (-1)	100 (+1)
6	0,3 (+1)	20 (-1)	100 (+1)
7	0,1 (-1)	60 (+1)	100 (+1)
8	0,3 (+1)	60 (+1)	100 (+1)
9	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)
10	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)
11	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)

Fonte: Autor, 2019.

As análises do planejamento foram realizadas através do software Statistica (Statsoft 7.0, EUA).

Para cada experimento foi usado um béquer de 600 mL ao qual foram adicionados 40 g da palha bruta (*in natura*) mais 400 mL de solução de H_2SO_4 , preparado conforme definido no planejamento experimental (Tabela 5). A mistura foi homogeneizada com um bastão de vidro e o béquer fechado com um papel filme e em seguida, colocado em banho termostático (LOGEN/LSRE-52CS-BA) (Figura 17) nas temperaturas e tempos determinados para cada ensaio (Figura 18). Logo após o tempo de reação, a mistura foi filtrada em tecido de algodão para separação da palha (fração sólida) e do licor (fração líquida). O licor foi armazenado, em geladeira, a aproximadamente 8 °C para posterior análise de açúcar redutores. A fração sólida foi submetida a três lavagens com 200 mL de água destilada cada, para promover retirada do excesso de H_2SO_4 e a neutralização do pH. Em seguida, ela foi encaminhada para secagem em estufa (SOLAB/SL-100) a 50 °C durante 24 h. As amostras dos materiais resultantes foram armazenadas em sacos plásticos transparentes, em temperatura ambiente, para as análises posteriores.

Figura 17 – Ensaio no banho termostático



Fonte: Autor, 2018.

3.3 Análises aplicadas à palha de cana-de-açúcar

3.3.1 Determinação dos açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores, liberados em cada ensaio de pré-tratamento, foram quantificados de acordo com Miller (1959). Para tanto, foi retirada uma amostra de 0,5 mL de cada ensaio a qual foi adicionada a 0,5 mL de DNS (ácido 3,5 – dinitro-salicílico). A mistura foi homogeneizada e aquecida a 100 °C por 5 minutos e, em seguida foi resfriada em água gelada e adicionaram-se 4 mL de água destilada. Logo após, a solução foi centrifugada em uma centrífuga de bancada (NOVA/NI-1811) e o sobrenadante foi submetido à leitura no espectrofotômetro (EDUTECH/EEQ-9005) a 540 nm, sendo os valores de absorbância substituídos na Equação obtida da curva de calibração previamente preparada, para obter as concentrações de açúcares redutores (ARs).

3.3.2 Avaliação do rendimento e da solubilização da fração sólida da palha da cana-de-açúcar

3.3.2.1 Rendimento da fração sólida da palha de cana-de-açúcar

O rendimento mássico da fração sólida (em base seca), obtida após o pré-tratamento, foi determinada por gravimetria, de acordo com a Equação 1 (NASCIMENTO, 2011). Para tanto, realizou-se a pesagem da palha antes e após o pré-tratamento ácido.

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

R = rendimento da fração sólida da palha (%; m/m)

M_f = peso final da palha (g) (material pré-tratado)

M_i = peso inicial da palha (g)

3.3.2.2 Solubilização da fração sólida da palha de cana-de-açúcar

A solubilização da fração sólida foi determinada de acordo com Nascimento (2011), e calculada conforme a Equação 2:

$$S_{cm} = 100 - Y \quad (2)$$

Onde:

S_{cm} = solubilização dos componentes macromoleculares (%)

Y = rendimento da fração sólida da palha (%; m/m)

3.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR)

Para avaliar as variações na estrutura química (grupos funcionais) dos componentes da palha de cana-de-açúcar após o processo de pré-tratamento, foram realizadas análises de espectroscopia na região do infravermelho da palha *in natura* e pré-tratada com H_2SO_4 (Ensaio 7 – nas condições: 0,1 M, 60 min, 100 °C; ensaio 8 - nas condições 0,3 M, 60 min, 100 °C). Os espectros de absorção da região do infravermelho foram obtidos em Espectrofotômetro (Shimadzu, IR – Prestige), por transformadas de Fourier (FTIR) utilizando um pó de KBr para formar as pastilhas com o auxílio de uma prensa hidráulica, com ângulo de varredura de 4000-400 cm^{-1} .

3.4 Hidrólise enzimática

A fração sólida obtida após o pré-tratamento da palha sob as condições: H_2SO_4 0,3M; 60 min e 100 °C, foi submetida ao estudo de hidrólise enzimática. As reações enzimáticas foram realizadas seguindo um planejamento experimental linear 2^2 , com 3 (três) pontos centrais e 4 (quatro) combinações únicas, totalizando 7 (sete) ensaios. Os fatores independentes avaliados foram a concentração de sólido (substrato) e a concentração de enzima. As análises do planejamento foram realizadas através do software Statística (Statsoft 7.0, EUA).

As Tabelas 6 e 7 apresentam os níveis das variáveis independentes e níveis codificados e a matriz do planejamento experimental fatorial, respectivamente.

Tabela 6 – Níveis das variáveis independentes para o estudo da hidrólise enzimática

Variáveis Independentes	Símbolo	Limites		
		- 1	0	+1
Concentração de sólido (%, m/v)	CS	2	6	10
Concentração enzima (FPU/g _{sólido})	CE	5	15	25

Fonte: Autor, 2019.

Tabela 7 - Matriz do planejamento fatorial 2² para o estudo da hidrólise enzimática

Ensaio	Concentração de sólido (%m/v)	Concentração de enzima (FPU/g_{sólido})
1	2 (-1)	5 (-1)
2	10 (+1)	5 (-1)
3	2 (-1)	25 (+1)
4	10(+1)	25 (+1)
5	6 (0)	15 (0)
6	6 (0)	15 (0)
7	6 (0)	15 (0)

Fonte: Autor, 2019.

Os experimentos de hidrólise enzimática foram realizados utilizando-se a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®, em frascos Erlenmeyers de 250 mL. O volume reacional foi de 50 mL, sendo as massas da fração sólida ajustadas, de forma atender as concentrações definidas no planejamento fatorial (Tabela 7) e adicionadas aos Erlenmeyers. A enzima, cuja atividade enzimática total (167,66 FPU/mL), determinada segundo metodologia específica, foi diluída em tampão citrato de sódio 50 mM – pH 4,8 de forma a atender concentração definida no planejamento. Após adição da fração sólida e da solução de enzima, os Erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e papel filme, para que não ocorresse qualquer alteração considerável dos volumes reacionais e, posteriormente foram incubados em uma incubadora shaker (LUCA-223/LUCADEMA) com rotação constante de 150 rpm e temperatura ajustada para 50 °C. Antes da adição de sólido foi retirada uma amostra da solução de enzima, de cada concentração diferente definida no planejamento que serve, para posterior análise, servindo como branco (determinação de açúcar redutor presente na enzima). As reações de hidrólise foram conduzidas por um período total de 72 horas, sendo retiradas amostras no decorrer do processo (24, 48 e 72 horas). Tanto a amostra que serviu como branco, quanto as amostras retiradas durante o processo de hidrólise, foram submetidas a um banho em ebulição e banho de gelo para desativação da enzima. Posteriormente, foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à análise de açúcares redutores pelo método do DNS.

Para as análises dos açúcares redutores liberados foram usados tubos de ensaio com 0,5 mL de DNS e adicionados 0,5 do sobrenadante retirado, em seguida colocado em banho termostático (LOGEN/LSRE-52CS-BA) a 100 °C por 5 min, em seguida foi resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento foram adicionados 4 mL de água destilada e centrifugada na centrífuga (NOVA/NI-1811) e o sobrenadante foi submetido à leitura no espectrofotômetro (EDUTECH/EEQ-9005) a 540 nm.

3.4.1 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020 - Sigma-Aldrich®) foi determinada de acordo com a metodologia especificada por Ghose (1987), com pequenas adaptações. A atividade enzimática é expressa em Unidades Internacional (U), onde 1 U corresponde à quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.) especificadas para cada caso. Quando o substrato é o papel de filtro, a Unidade Internacional é expressa em Unidade de Papel de Filtro (FPU). O método está baseado em determinar a atividade celulósica completa da enzima, planejando saber a quantidade que será utilizada nas hidrólises.

Para a determinação da atividade enzimática foram adicionados em tubos de ensaio o substrato (Papel de filtro Whatman nº 1- 1x6 cm), com 1,0 mL de tampão citrato 50 mM pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho termostático (LOGEN/LSRE-52CS-BA) a 50 °C por 1 min e adicionado 0,5 mL do sobrenadante (solução da enzima) deixando reagir por mais 60 min a mesma temperatura 50 °C. Após este período os tubos foram retirados e resfriados em banho de gelo, em seguida foi retirado 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 de DNS, foi agitado e aquecido a temperatura de 100 °C por mais 5 min, após, foi resfriado em banho de gelo. Por fim, foram adicionados 6,5 mL de água destilada em cada tubo de ensaio, a solução foi centrifugada em uma centrífuga de bancada (NOVA/NI-1811) e o sobrenadante foi submetido à leitura no espectrofotômetro (EDUTECH/EEQ-9005) a 540 nm.

Paralelamente à determinação da atividade da enzima, foi realizado o ensaio para controle da enzima o qual teve como objetivo a determinação da concentração inicial de açúcares redutores presentes na amostra de enzima. Para isso, foram adicionados apenas 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e 0,5 mL da amostra (enzima) foram adicionados em tubos de ensaio, sem a adição do substrato (papel de filtro). Um branco foi utilizado para zerar o espectrofotômetro, utilizando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM.

Para construção da curva padrão, foi preparada uma solução mãe de glicose anidra, na concentração de 0,36% (m/v). Partindo dessa solução, foram produzidas outras 9 diluições por meio de novas diluições em DNS, abrangendo a faixa de concentração 0,18 – 2,88 mg/mL. As diluições foram feitas em duplicata. A curva de glicose foi obtida com valores de concentração de glicose versus a absorbância.

A determinação da concentração de glicose liberada em cada ensaio enzimático foi realizada através da utilização da curva padrão de glicose previamente preparada, utilizando a Equação 3.

$$\text{Atividade} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Dil.} \times (\text{Abs}_{\text{am}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times \text{Fator} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \times \text{Vol}_{\text{total}}(\text{mL})}{\text{tempo (min)} \times 0,18 \left(\frac{\text{mg}}{\mu\text{mol}} \right) \times \text{Vol}_{\text{amostra}}(\text{mL})} \quad (3)$$

Onde:

Dil = diluição da enzima (se necessário)

Abs_{am} = valor da absorbância da amostra (enzima)

Abs_{branco} = valor da absorbância do branco

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamento experimental e otimização do pré-tratamento ácido

Como exposto na Tabela 8, após a realização do planejamento experimental, observou-se que a maior liberação de açúcares redutores, 15,90 g/L, foi obtida nas seguintes condições: 0,3 M de H_2SO_4 , 60 min e 100 °C (ensaio 8).

Tabela 8 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 do pré-tratamento ácido

Ensaios	[H_2SO_4] (M)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	AR*(g/L)
1	0,1 (-1)	20 (-1)	60 (-1)	3,16
2	0,3 (+1)	20 (-1)	60 (-1)	2,90
3	0,1 (-1)	60 (+1)	60 (-1)	2,94
4	0,3 (+1)	60 (+1)	60 (-1)	3,33
5	0,1 (-1)	20 (-1)	100 (+1)	4,49
6	0,3 (+1)	20 (-1)	100 (+1)	7,04
7	0,1 (-1)	60 (+1)	100 (+1)	13,44
8	0,3 (+1)	60 (+1)	100 (+1)	15,90
9	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)	4,64
10	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)	4,82
11	0,2 (0)	40 (0)	80 (0)	4,99

* AR = açúcares redutores

Fonte: Autor, 2019.

Um estudo sobre o pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar com H_2SO_4 , realizado por Gomes (2018), apresentou uma maior liberação de AR (8,36 g/L) quando o pré-tratamento foi realizado nas seguintes condições: H_2SO_4 2,9 % por 35 min em autoclave (121 °C, 1 atm). Lorencini (2013), ao realizar a otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar com HCl, nas seguintes condições: 90 °C; 360 min; 6,0 % de HCl, obteve o máximo de AR de 13,88 g/L.

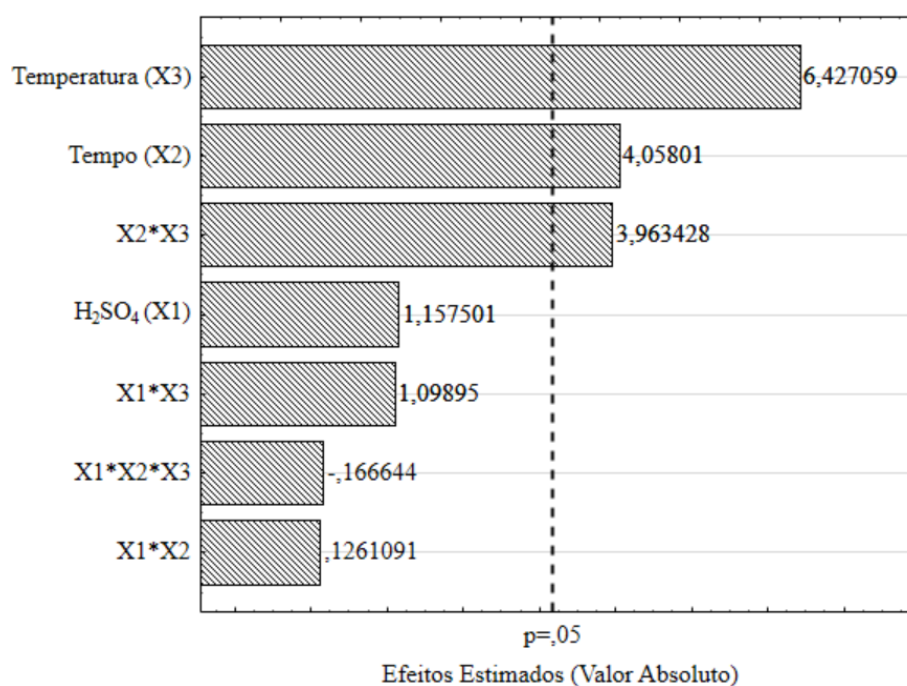
Pré-tratamentos ácidos tendem a aumentar a remoção de hemiceluloses. Seus açúcares liberados em solução podem se encontrar na forma de oligômeros ou monômeros, com razões que variam de acordo com temperatura, tempo e concentração de ácido (TRAJANO *et al.*, 2013).

A ferramenta do planejamento experimental e a análise da superfície de resposta permitem a análise da influência das variáveis em determinado processo, a forma da interação entre estas variáveis e a obtenção do valor das variáveis que otimizem os resultados.

Os resultados referentes à concentração de açúcares redutores liberados no hidrolisado, após a etapa de pré-tratamento, foram submetidos à análise estatística através da utilização do software Statistica (Statsoft 7.0, EUA).

Usando o diagrama de Pareto (Figura 18) é possível identificar que os efeitos do tempo (X_2), temperatura (X_3) e da interação destas duas variáveis foram significativos, ao nível de 95% de confiança. As maiores concentrações de açúcares redutores foram obtidas quando o tempo e temperatura estão nos seus níveis máximos.

Figura 18 – Diagrama de Pareto para os açúcares redutores liberados na etapa de pré-tratamento



Fonte: Autor, 2019.

Após a verificação dos efeitos significativos, foi realizada a análise dos coeficientes de regressão com o objetivo de se obter o modelo codificado de primeira ordem que representa a concentração de açúcares redutores liberados no hidrolisado, ao final do pré-tratamento (Tabela 9).

Tabela 9 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados no hidrolisado após o pré-tratamento com H₂SO₄

	Coeficientes de regressão	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	6,15	0,47	0,000985*	4,64	7,66
H₂SO₄ (X₁)	0,64	0,56	0,330856	-1,12	2,41
Tempo (X₂)	2,25	0,56	0,026971*	0,49	4,02
Temperatura (X₃)	3,57	0,56	0,007635*	1,80	5,33
X₁X₂	0,07	0,56	0,907623	-1,70	1,84
X₁X₃	0,61	0,56	0,352075	-1,16	2,38
X₂X₃	2,20	0,56	0,028689*	0,43	3,97
X₁X₂ X₃	-0,09	0,56	0,878249	-1,86	1,67

p: probabilidade de significância – $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

*Fatores significativos ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2019.

O modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores liberados no hidrolisado é dado pela Equação 4:

$$AR \left(\frac{g}{L} \right) = 6,5 + 0,64X_1 + 2,25X_2 + 3,57X_3 + 0,07X_1X_2 + 0,61X_1X_3 + 2,20X_2X_3 - 0,09X_1X_2X_3 \quad (4)$$

Os dados de análise de variância (ANOVA) para os AR estão apresentados na Tabela 10. O modelo de primeira ordem obtido pelo planejamento experimental 2³ apresentou coeficiente de correlação, R², de 96,21%, indicando uma correlação adequada do modelo. De acordo com Barros Neto *et al.* (2001), na análise de variância de um modelo uma parte da variação total das observações em torno da média é descrita pela equação de regressão, enquanto o restante faz parte dos resíduos; assim, quanto maior for a fração descrita pela regressão, ou melhor, quanto mais próximo de 100% for o valor de R², melhor será o ajuste do modelo aos dados observados.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para AR liberados no hidrolisado após o pré-tratamento com H₂SO₄

	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F_{calc}	R² (%)
Regressão	187,51	7	26,79	10,87	96,21
Resíduo	7,39	3	2,46		
Falta de ajuste	7,33	1			
Erro puro	0,06	2			
Total	194,91	10			

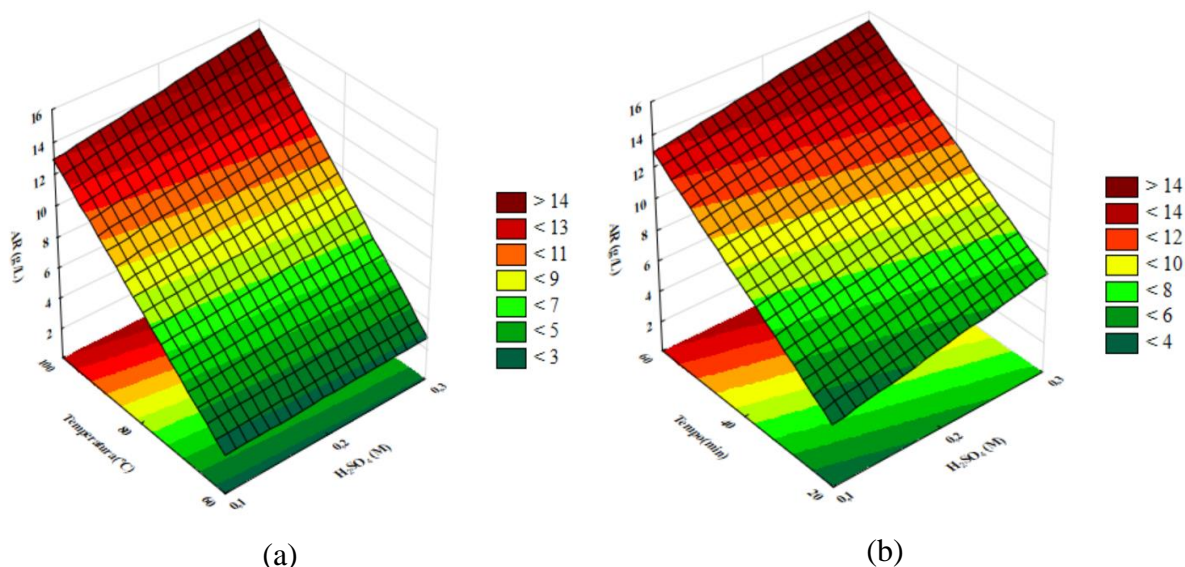
$F_{0,05;7;3} = 8,89$ (Teste $F = F_{calc}/F_{tab} = 1,22$)

Fonte: Autor, 2019.

A análise de variância (ANOVA) mostra importantes dados do experimento como os valores de Probabilidade de Fisher (F), cujo valor indica a significância dos fatores avaliados, suas interações, erros e a falta de ajuste do experimento. O valor de F calculado foi maior que o F tabelado, ou seja, o teste F apresentou um valor acima de 1. Dessa forma, o modelo de regressão que representa os açúcares redutores após a etapa de pré-tratamento é significativo (Tabela10).

As superfícies de resposta foram construídas para todas as possíveis combinações de variação de duas variáveis, mantendo-se a outra fixa. Nas Figuras 19a e 19b pode-se verificar que com o aumento da temperatura e tempo de pré-tratamento aumenta-se a quantidade de açúcares redutores liberados no hidrolisado para qualquer concentração de ácido de sulfúrico, obtendo-se concentrações de açúcares próximas de 16 g/L, nas condições aplicadas neste estudo.

Figura 19 - Superfícies de resposta para os AR liberados após o pré-tratamento com H_2SO_4 .



Fonte: Autor, 2019.

4.2 Avaliação do rendimento e da solubilização da fração sólida da palha da cana-de-açúcar

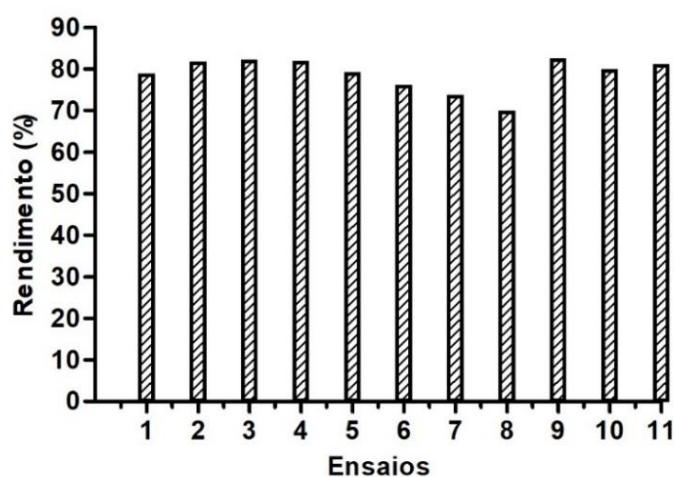
Após o pré-tratamento da palha com H_2SO_4 , podemos perceber, de acordo com a Figura 20, que o ensaio 8 foi o que proporcionou uma maior solubilização dos componentes macromoleculares da biomassa, cerca de 30%, levando a um rendimento mássico final de 69,71%. Esse dado corrobora com aqueles apresentados no item 4.1, no qual o ensaio 8 foi o que proporcionou uma maior liberação de AR.

Este mesmo ensaio também proporcionou uma maior solubilização dos componentes da biomassa, levando a uma perda de aproximadamente 30% da massa inicial, e um rendimento final da fração sólida de cerca de 70% (Tabela 11).

Tabela 11 - Avaliação da fração sólida da palha da cana-de-açúcar

Ensaio	M _i (g)	M _f (g)	R (%)	S _{cm} (%)
1	40	31,45	78,64	21,35
2	40	32,64	81,60	18,39
3	40	32,81	82,02	17,97
4	40	32,68	81,70	18,29
5	40	31,57	78,94	21,05
6	40	30,41	76,04	23,95
7	40	29,41	73,53	26,46
8	40	27,88	69,71	30,28
9	40	32,92	82,30	17,69
10	40	31,89	79,73	20,26
11	40	32,37	80,93	19,06

Fonte: Autor, 2019.

Figura 20 – Rendimento mássico após o pré-tratamento de palha de cana-de-açúcar com H₂SO₄.

Fonte: Autor, 2019.

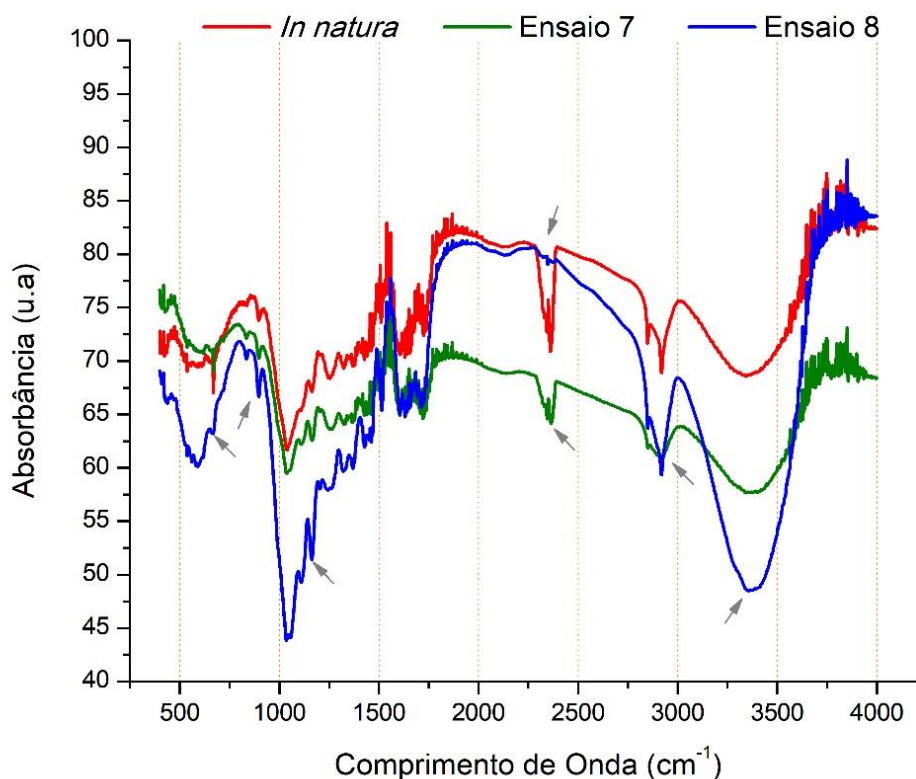
Santos (2018), ao realizar um pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar em autoclave (121 °C, 1 atm) por 30 min, observou que o rendimento mássico obtido foi de 93,05% e a liberação de AR foi de 0,15 g/L.

De acordo com Aguilar e colaboradores (2002), a hemicelulose tem estrutura ramificada e amorfa, sendo mais susceptível ao pré-tratamento ácido do que a celulose. Sendo assim, a hemicelulose pode ser completamente removida sem causar grandes danos na celulose por meio de pré-tratamentos ácidos.

4.3 Espectroscopia na região do infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR)

De acordo com a Figura 21, podemos observar alterações entre os espectros da palha *in natura* e da pré-tratada com H_2SO_4 0,1 M (ensaio 7) e com H_2SO_4 0,3 M (ensaio 8). Podemos perceber que ocorreram alterações estruturais no comprimento entre 500 cm^{-1} e 750 cm^{-1} , bem como nos intervalos entre 1000 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} e também 2250 cm^{-1} e 2500 cm^{-1} . Bandas abaixo de 898 cm^{-1} são características das deformações C-H de grupos aromáticos de lignina. As bandas em 1158 e 1044 cm^{-1} referem-se à vibração C-O na celulose e hemicelulose (MAZIERO *et al.*, 2012; MOTHÉ; AZEVEDO, 2009). Através dos espectros apresentados, pode-se perceber que a palha pré-tratada nas condições do ensaio 8 (H_2SO_4 0,3 M; 60 min e 100°C) foi a que sofreu mais alteração quando comparada à palha *in natura* e pré-tratada nas condições do ensaio 7 (H_2SO_4 0,1 M; 60 min e 100°C).

Figura 21 – Espectros das amostras de palha de cana-de-açúcar *in natura* e pré-tratada com H_2SO_4



Fonte: Autor, 2019.

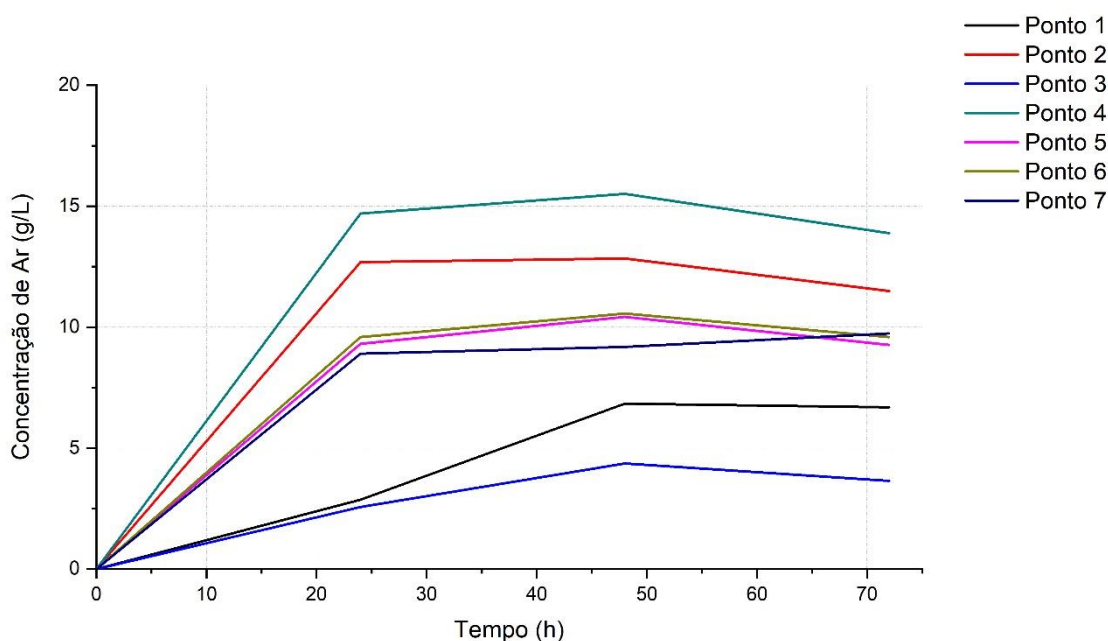
4.4 Hidrólise Enzimática

O estudo da hidrólise enzimática aplicado ao material sólido obtido após o pré-tratamento da palha conforme as condições de ensaio 8 do planejamento foi realizado segundo as condições descritas no item 3.4.

A Figura 22 mostra os perfis de concentrações de açúcares redutores liberados nos ensaios de hidrólise ao longo do tempo. É possível observar que, de forma geral, houve pouca variação nas concentrações entre 48 e 72 horas de hidrólise. Entre 24 e 48 horas, a maior variação nas concentrações ocorreu para as condições de hidrólise 1 e 3, condições em que se utilizou a menor concentração de sólido (2%, m/v). As maiores concentrações foram obtidas nas condições experimentais 2 (10% m/v de sólido e 5 FPU/g_{sólido}) e 4 (10% m/v de sólido e 25 FPU/g_{sólido}).

Percebe-se ainda que as hidrólises apresentaram um comportamento esperado de acordo com o reportado na literatura, podendo ser finalizada em 48 h de hidrólise, já que, a glicose se manteve quase estável após este período (OLIVEIRA, 2010; ROCHA, 2018; SANTOS 2018; SOUZA, 2016).

Figura 22 – Perfis de concentrações de açúcares redutores liberados na hidrólise enzimática da fração sólida obtida do ensaio 8 (H₂SO₄ 0,3 M, 60 min, 100 °C), utilizando a enzima comercial Cellulase Blend (SAE 0020) da Sigma-Aldrich®



Fonte: Autor, 2019.

Devido ao fato das concentrações de açúcares redutores liberados terem sido praticamente constantes entre 48 e 72 horas, decidiu-se avaliar a eficiência da hidrólise em função de açúcares redutores liberados, no tempo de 48 horas (Tabela 12).

Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial 2² para a hidrólise enzimática

Ensaio	Concentração de sólido (%m/v)	Concentração de enzima (FPU/g_{sólido})	AR*(g/L) Ensaio 8 – pré-tratamento
1	2 (-1)	5 (-1)	6,84
2	10 (+1)	5 (-1)	12,84
3	2 (-1)	25 (+1)	4,37
4	10 (+1)	25 (+1)	15,51
5	6 (0)	15 (0)	10,43
6	6 (0)	15 (0)	10,57
7	6 (0)	15 (0)	9,18

* AR = açúcares redutores

Ensaio 8 (H₂SO₄ 0,3 M; 60 min; 100 °C)

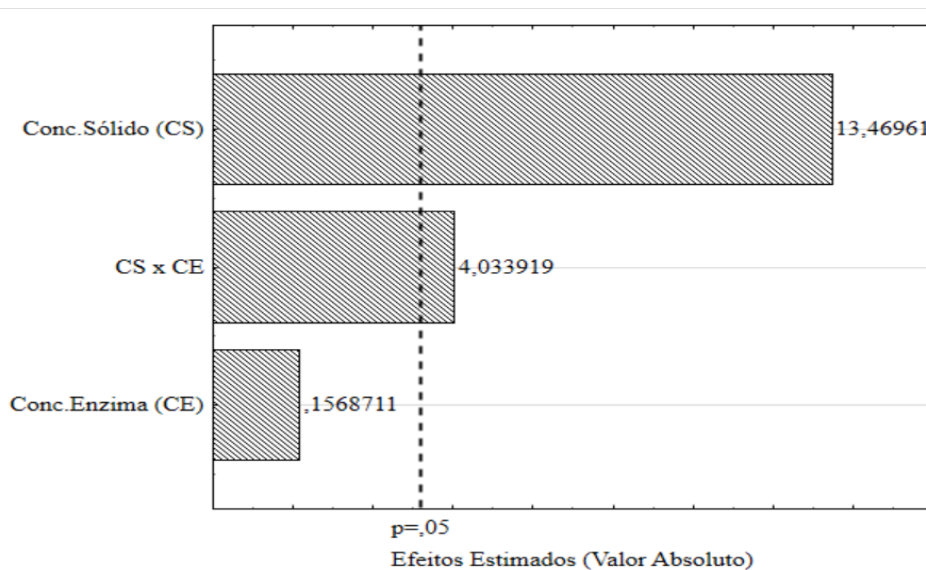
Fonte: Autor, 2019.

Através dos resultados apresentados na Tabela 12, observou-se que as maiores concentrações de açúcar redutor foram de 12,84 e 15,51 g/L (correspondentes aos experimentos 2 e 4, respectivamente), nos quais se empregaram maior carga de sólido, sendo de 10% (m/v). Martínez (2014) ao submeter a palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente (195 °C, 10 min) à hidrólise enzimática (com uma carga de sólidos de 10%, m/v e uma carga de 10 FPU/g_{celulose}), conseguiu obter uma concentração de glicose de aproximadamente 30 g/L. Porém, é importante observar que ele trabalhou com condições mais severas que as empregadas neste trabalho, que levou a uma boa remoção da fração de hemicelulose deixando a celulose mais acessível às enzimas.

É importante chamar a atenção também ao o fato das concentrações de açúcar redutor terem se mantido praticamente constantes entre 48 e 72 horas, isso pode ter ocorrido devido à inibição da enzima pelo produto intermediário (celobiose), a qual pode ser liberada durante o processo de hidrólise como já observados em diversos trabalhos reportados pela literatura (MARTÍNEZ, 2014; PRATTO, 2015). Outro fato importante, é que os pré-tratamentos com ácido diluído, como o empregado neste trabalho, promovem pouca remoção de lignina (SANTOS, 2013) e a lignina, por sua vez, pode dificultar o processo de hidrólise enzimática, no acesso da enzima ao substrato, no caso a celulose presente na fração sólida.

Realizou-se a análise estatística, através do software Statistica (Statsoft 7.0, EUA), sobre influência das variáveis concentração de sólido (CS) e da concentração de enzima (CE) sobre a liberação de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, no tempo de 48 de hidrólise, sendo os fatores concentração de sólido (CS) e a interação entre a concentração de sólido e concentração de enzima (CS x CE) apresentaram estatisticamente significativos, a 95% de confiança, conforme pode ser visto através do diagrama de Pareto (Figura 23).

Figura 23 – Diagrama de Pareto para os açúcares redutores liberados no processo de hidrólise enzimática



Fonte: Autor, 2019.

Em estudo cinético aplicado à hidrólise enzimática de palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente a 195 °C, Pratto (2015) concluiu que a velocidade inicial da reação aumentou com o aumento da concentração inicial de enzima, entretanto ao longo do tempo, para concentrações muito altas de enzima, o substrato se tornou limitante, por não presente em quantidade suficiente para ocupar os sítios ativos livres das enzimas. Os resultados obtidos no presente estudo, estão coerentes com os obtidos por Pratto (2015), visto que nas condições aplicadas, a concentração de enzima não apresentou significância estatística a 95% de confiança.

Objetivando a obtenção de um modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, foi realizada a análise de coeficientes de regressão (Tabela 13).

Tabela 13 – Coeficientes de regressão para os açúcares redutores liberados no hidrolisado enzimático, em 48 horas (palha pré-tratada nas condições: H₂SO₄ 0,3 M, 60 min, 100 °C)

	Coeficiente de regressão	Desvio padrão	p	Limite de Confiança (- 95%)	Limite de Confiança (95%)
Média	9,96	0,24	0,000031*	9,20	10,73
Concentração de palha (CS)	4,29	0,32	0,000885*	3,27	5,30
Concentração de enzima (CE)	0,05	0,32	0,885309	-0,96	1,06
CS x CE	1,28	0,32	0,027396*	0,27	2,30

p: probabilidade de significância – $p < 0,05$ (estatisticamente significativo a 95% de confiança).

*Fatores significativos ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2019.

O modelo codificado que representa a concentração de açúcares redutores liberado no hidrolisado enzimático, estão representados na Equação 5.

$$AR \left(\frac{g}{L} \right) = 9,96 + 4,29CS + 0,05 CE + 1,28 CS \times CE \quad (5)$$

Os dados da análise de variância (ANOVA) do modelo obtido, encontram-se apresentados na Tabela 14, onde é possível observar uma boa correlação ($R^2 = 98,51\%$) do modelo de primeira ordem obtido pelo planejamento experimental fatorial 2^2 aplicado ao processo de hidrólise enzimática. Além disso, observa-se que o valor F calculado ($F_{calc} = 65,91$) se apresentou muito superior ao F tabelado ($F_{0,05;3;3} = 9,28$), sendo o modelo de primeira ordem que representa a concentração de açúcar redutor no hidrolisado enzimático, significativo e preditivo, pois para que uma regressão seja preditiva, o valor do teste F ($F_{calc}/F_{tabelado}$) deve ser no mínimo maior que 4 (Barros Neto, 1996 apud Santos et al., 2008).

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para AR liberados no hidrolisado enzimático em 48 horas

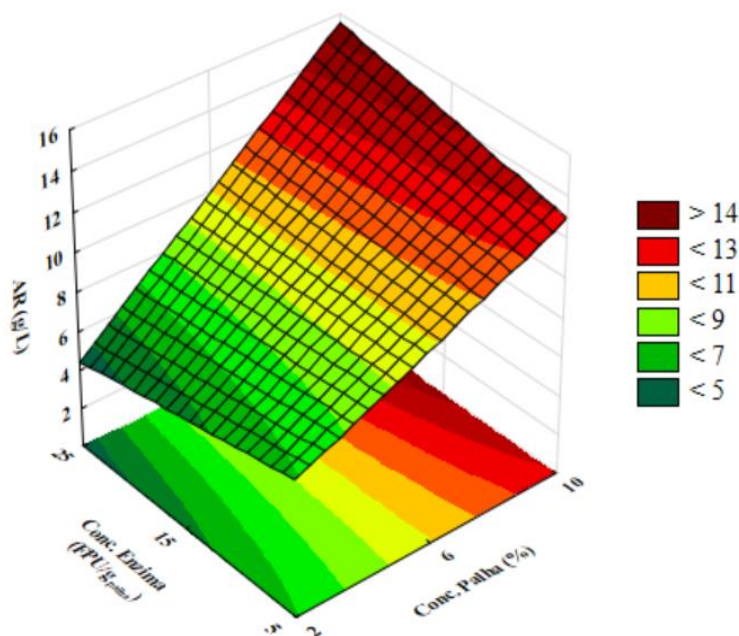
	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	R ² (%)
Regressão	80,09	3	26,70	65,91	98,51
Resíduo	1,22	3	0,41		
Falta de ajuste	0,05	1			
Erro puro	1,17	2			
Total	81,31	6			

$F_{0,05;3;3} = 9,28$ (Teste $F = F_{calc}/F_{tab} = 7,10$)

Fonte: Autor, 2019.

A Figura 24 ilustra o gráfico de superfície de resposta referente à concentração de açúcar redutor liberado, na hidrólise enzimática, construído com base no modelo apresentado representado pela Equação 5.

Figura 24 - Superfície de resposta para os AR liberados após em 48 h de hidrólise enzimática (palha pré-tratada nas condições: H₂SO₄ 0,3 M; 60 min; 100 °C)



Fonte: Autor, 2019.

Percebe-se a partir da Figura 24 que as maiores concentrações de açúcares redutores foram obtidas quando se aumentou a concentração de palha (concentração de substrato – CS), sendo a concentração máxima alcançada de aproximadamente 16 g/L, nas condições aplicadas

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar demonstraram que a maior solubilização dos componentes macromoleculares da biomassa foi 30,28%, para a condição de H_2SO_4 0,3 M; 60 minutos e 100 °C, que correspondeu a maior liberação de açúcar redutor no hidrolisado ácido, sendo de 15,90 g/L, indicando a eficiência do pré-tratamento. O modelo codificado obtido para a concentração de açúcares redutores apresentou significância estatística a 95% de confiança, segunda a Análise de Variância (ANOVA).

Desta forma, o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído demonstrou ser uma forma viável no aumento da solubilização dos componentes macromoleculares da biomassa, o que permitiu uma hidrólise enzimática mais eficiente e que apresentando condições para a obtenção de etanol 2G.

A hidrólise enzimática da fração sólida obtida após o pré-tratamento (H_2SO_4 0,3 M; 60 minutos e 100 °C) apresentou concentrações de açúcares redutores de 12,84 e 15,51 g/L, sendo os fatores concentração de sólido e interação concentração de sólido e concentração de enzima, estatisticamente significativos a 95% de confiança, nas condições aplicadas no presente trabalho. A através dos dados da análise de variância (ANOVA) do modelo obtido pode se dizer que o modelo que representa a concentração de açúcares redutores no hidrolisado enzimático, foi significativo e preditivo.

REFERÊNCIAS

- ANP. Agencia Nacional do Petróleo. 2019. Disponível em: anp.gov.br. Acesso em: 24 ago. 2019.
- AGUIAR, H. R. R. Produção de etanol de segunda geração. Uberlândia, 85 p., 2017. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Uberlândia.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J.A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*. v. 55. p. 309-318, 2002.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. v. 101, pp. 4851-4861, 2010.
- ANDRADE, L.F. Produção de etanol de segunda geração. Belo Horizonte, 38 p., 2014. Monografia (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais.
- ANDRADE, T. C. C. BITENCOURT, W. C. BOMTEMPO, F. V. S. ALVES, F. S. BARBOSA, R. S. GUARDA, E. A. Hidrólise enzimática de celulose para obtenção de glicose utilizando líquido iônico como meio solvente. *Revista Virtual de Química*. v.11, n.1, p. 310-325, 2019.
- ARAÚJO, C. E.; GARRIDO, C. V. S.; SANTOS, J. M. G. M.; LEAL, S. C. S.; CAMPOS, L. M. A. Estudo das rotas de hidrólise química e biológica para a produção de etanol de segunda geração a partir de resíduos lignocelulósicos. In: XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica. Salvador: UNIFACS, 2013.
- AZEVEDO, A. N. G. LIMA, B. G. A. Biocombustíveis: desenvolvimento e inserção internacional. *Revista Direito Ambiental e Sociedade*. v.6, n.1, p. 77-100, 2016.
- BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisas e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: UNICAMP. 2001. 401p

BASTOS, C. Tecnologia no Campo. 2017. Disponível em: <http://www.tecnologianocampo.com.br>. Acesso em: 10 jul. 2019.

BESSA, D. J. P. O mercado internacional do etanol. Revista Geonorte. v.7, n.1, p.520-536, 2013.

BNDES e CGEE. Bioetanol de Cana-de-Açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008, 316p.

BUSSAMRA, B. C. Melhoramento de coquetéis enzimáticos para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Campinas: 124p., 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.

CALADO, V.; MONTGOMEY, D. C. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260 p.

CARVALHO, M. L. Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. São Carlos, 103 p., 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.

CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar. São Paulo: Blucher, 2010.

DEDINI. Indústria de base. Workshop de Etanol, 2008. Disponível em: <https://www.dedini.com.br>. Acesso em: 26 ago. 2019.

DONATE, P. M. Síntese ambientalmente correta a partir de biomassa. Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 6, n. 2, 2014.

EVORA, M. C.; GONÇALEZ, O. L.; DUTRA, R. C. L. DINIZ, M. F.; WIEBECK, H.; SILVA, L. G. A. Comparação de técnicas FTIR de transmissão, reflexão e fotoacústica na análise de poliamida-6, reciclada e irradiada. Polímeros: Ciência e Tecnologia, vol. 12, n. 1, p. 60-68, 2002.

FERREIRA, A. D. Produção eficiente de etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico do bagaço da cana de açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais. Lorena, 153 p. 2016. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

FERREIRA, R. A. R. Contribuição ao estudo cinético e balanço energético da pirólise autotérmica da palha de cana-de-açúcar através de análises termogravimétricas e calorimetria. Uberlândia, 81 p., 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.

GRANBIO. 2018. Disponível em: <http://www.granbio.com.br/biotecpedia/hidrolise-enzimatica/>. Acesso em: 28 nov. 2018.

GOMES, V.M. Otimização do pré-tratamento da palha da cana-de-açúcar com ácido sulfúrico e hidrólise enzimática para obtenção de açúcares fermentescíveis. Poços de Caldas, 76 p., 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alfenas.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. Pure & Appl. Chem. v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HAMELINCK, C. N. HOOIJDONK, G. V.; FAALIJ, A. “Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term”. Biomass and Bioenergy, v. 28, n. 4, 2004.

HIJAZIN. C. A. H. SIMÕES, A. T. SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. Revista Atitude, ano IV, n. 7, p. 89-93, 2010.

LORA, E. E. S. VENTURINI, O. J. Biocombustíveis. Rio de Janeiro: Interciência, 2012. v. 1, 588 p.

MARTÍNEZ, J. D. A. Modelagem cinética da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada hidrotermicamente. Rio de Janeiro, 107 p., 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MAZIERO, P.; OLIVEIRA NETO, M.; MACHADO, D.; BATISTA, T.; SCHMITT CAVALHEIRO, C. C.; NEUMANN, M. G.; CRAIEVICH, A. F.; MORAES ROCHA, G.

J.; POLIKARPOV, I.; GONÇALVES, A. R. Structural features of lignin obtained at different alkaline oxidation conditions from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, n. 35, p. 61-69, 2012.

MILANEZ, A. Y.; NYKO, D.; VALENTE, M. S.; SOUSA, L. C.; BONOMI, A.; JESUS, C. D. F.; WATANABE, M. D. B.; CHAGAS, M. F.; REZENDE, M. C. A. F.; CAVALETT, O. JUNQUEIRA, T. L.; GOUVEIA, V. L. R. De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. *BNDES Setorial*, n. 41, 2015.

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

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Clima – Biocombustíveis. 2019. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/perguntasfrequentes.html?catid=13>. Acesso em: 18 jul. 2019.

MME. Ministério de Minas e Energia. Matriz Energética Nacional 2030. 2007. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/web/guest/publicacoes-e-indicadores/matriz-energetica-nacional-2030>. Acesso em: 18 jul. 2019.

MME. Ministério de Minas e Energia. Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis 2018. 2019. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/pt/imprensa/noticias/epe-divulga-analise-de-conjuntura-de-biocombustiveis-ano-base-2018>. Acesso em: 18 jul. 2019.

MARQUES, F. Obstáculos no caminho. *Revista Pesquisa*, ed. 268, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/2018/06/18/obstaculos-no-caminho/>. Acesso em: 18 jul. 2019.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *RenewableandSustainableEnergyReviews*, n. 27, p. 77-93, 2013.

MORO, M. K. Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-roscas. Rio de Janeiro: UFRJ, 119 p., 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal do Rio de Janeiro.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. Characterization of sugarcane and coconut fibers by thermal analysis and FTIR. J. Therm. Anal. Calorim., n. 97, p. 661-665, 2009.

NASCIMENTO, V. M. Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. São Carlos, 136 p., 2011. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos.

NOVACANA. 2017. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/materias-primas>. Acesso em: 30 mai. 2019.

NOVACANA. 2016. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/materias-primas>. Acesso em: 30 mai. 2019.

OGATA, B. H. Caracterização das frações celulose, hemicelulose e lignina de diferentes genótipos de cana-de-açúcar e potencial de uso em biorrefinarias. Piracicaba, 109 p., 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, F. M. V. Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana. Lorena, 101 p., 2010. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

PACHECO, T.F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? Circular técnica, n.04. ed. 1. EMBRAPA, 2011.

PRATTO, B. Hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar: Estudo cinético e modelagem matemática semi-mecanística. São Carlos: UFSCar, 130 p., 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos.

REIS, P. Biocombustíveis vantagens e desvantagens. Portal Energia, 31 jan. 2019. Disponível em: <https://www.portal-energia.com/biocombustiveis-vantagens-e-desvantagens/>. Acesso em: 15 jul. 2019.

RESENDE, R. R. Biotecnologia aplicada à agro&indústria: fundamentos e aplicações. v. 4. São Paulo: Blucher, 2016.

RODRIGUES, C. WOICIECHOWSKI, A. L.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; GOELZER, F. D.; SOBRAL, K. C. A.; CORAL, J. D.; CAMPIONI, T. S.; MACENO, M. A. C.; SOCCOL, C. R. "Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial", p. 283 -314. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

RODRIGUES, L. D. A cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de biocombustíveis: impactos ambientais e o zoneamento agroecológico como ferramenta para mitigação. Juiz de Fora, 64 p., 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Análise Ambiental) – Universidade Federal de Juiz de Fora.

RODRIGUES, M. S.; BELRADO, A. L.; JÚNIOR, H. S.; SANTOS, S. F. Cinza de palha de cana-de-açúcar como adição mineral em fibrocimento. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. v.17, n.12, p.1347–1354, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamentos de experimentos e otimização de processos. 2a ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e amor, 2009. 358 p.

ROITMAN, T. Perspectivas e propostas de inserção de bioquerosene de aviação no transporte aéreo de passageiros no Brasil. Rio de Janeiro, 158 p., 2018. Dissertação (Mestrado) – Universidade federal do Rio de Janeiro.

SANTIAGO, A. D.; IVO, W. M. P. M.; BARBOSA, G. V. S.; ROSSETO, R. Impulsionando a Produtividade e a Produção Agrícola da Cana-de-Açúcar no Brasil. Workshop Internacional sobre Desenvolvimento da Agricultura Tropical, 2006.

SANTOS, A. M. Caracterização química da biomassa: Potencial da palha da cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Rio Largo: UFAL, 65 p., 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Alagoas.

SANTOS, F. A. Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Viçosa: UFV, 112 p., 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa.

SANTOS, F.A., QUEIRÓZ, J.H. DE 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 35, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C.S.; SOARES, F.E.F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. Química Nova, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SANTOS, S. F. M.; SILVA, F. L. H.; SOUZA, R. L. A.; PINTO, G. A. S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração de poligalacturonase. Quim. Nova, v. 31, n. 8, p. 1973-1978, 2008.

SEABRA, J. E. A. Avaliação tecno-econômico de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana de açúcar. Campinas: UNICAMP, 298 p., 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, A.P.; MEERT, D.; FINAMORE, W.L. Aproveitamento da palha da cana-de-açúcar pós-colheita mecanizada. Revista Eletrônica da Faculdade de Ciências Exatas e da Terra v. 5, n. 8, 2016.

SOUZA, R. B. A. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da Palha de cana-de-açúcar. São Carlos, 124 p., 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos.

SUGARCANE. Departamento Agrônômico da Netafim. 2018. Disponível em: http://www.sugarcane crops.com/p/about_us/. Acesso em: 25 out. 2018.

TRAJANO, H. L.; WYMAN, C. E. Fundamentals of biomass pretreatment at low pH. Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals. p. 103-128, 2013.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. 2018. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 10 jul. 2019.

VASCONCELOS, M. H. Desenvolvimento e análise econômica de modelos de biorrefinaria integrada 1G2G empregando pré-tratamento ácido diluído. Lorena, 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

VÁSQUEZ, M. P. Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Rio de Janeiro: UFRJ, 2007. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Rio de Janeiro.

ZAMPIERI, D. Expressão gênica e atividades de celulasas, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29. Caxias do Sul: UCS, 2015. Tese (Pós-Graduação) Universidade de Caxias do Sul.