

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

AVALIAÇÃO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO  
MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL  
ASSOCIADO A PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E  
RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS

Autor: Nayara Bessa Martins da Silva  
Orientador: Prof. Dsc. Carlos Frederico de Souza Castro

Rio Verde - GO  
fevereiro - 2015

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

AVALIAÇÃO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR COMO  
MATÉRIA-PRIMA PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL  
ASSOCIADO A PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E  
RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS

Autor: Nayara Bessa Martins da Silva  
Orientador: Prof. Dsc. Carlos Frederico de Souza Castro

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde.

Rio Verde – GO  
fevereiro - 2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Vera Lúcia Bessa, pelo exemplo, amor, força e paciência e por me conceder a oportunidade de realizar esse curso de Pós-Graduação.

A minha irmã, Thays Fernanda, por me apoiar e estar sempre presente, acreditando em meu potencial e me incentivando. A Lélica Elis, pela compreensão dos momentos de ausência, pelo exemplo de perseverança, pela parceria e pelo carinho por todo esse tempo.

A Deus, por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, transmitindo-me segurança e força para chegar até aqui.

Ao meu orientador, Carlos Frederico de Souza Castro, agradeço imensamente pela contribuição, pois sem ele esta pesquisa não seria concretizada.

Aos meus queridos amigos e todos familiares, pelos momentos de descontração e por se manterem sempre ao meu lado!

## BIOGRAFIA DO AUTOR

Nayara Bessa Martins da Silva, filha de Alaor Martins da Silva e Vera Lúcia Bessa Machado, nasceu em Rio Verde, Estado de Goiás, em 29 de abril de 1989. Em 2010, graduou em Farmácia, pela UNIFEV na cidade de Votuporanga – SP. Em agosto de 2013, iniciou no Curso de Pós-Graduação em Agroquímica pelo Instituto Federal Goiano-Campus Rio Verde – GO.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Cana-de-açúcar.....	14
2.2. Bagaço da cana-de-açúcar.....	15
2.2.1. Celulose.....	16
2.2.2. Hemicelulose.....	17
2.2.3. Lignina.....	17
2.3. Produção de etanol a partir de biomassa.....	18
2.4. Pré-tratamento.....	20
2.4.1. Pré-tratamento alcalino.....	21
2.4.2. Pré-tratamento ácido.....	23
2.4.3. Pré-tratamento em duas etapas.....	23
2.4.4. Pré-tratamento com micro-ondas.....	24
2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	25
2.6. FERMENTAÇÃO.....	27
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivo geral.....	36
4.2. Objetivos específicos.....	36

ASSOCIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	37
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
2.1. Pré-tratamento alcalino.....	41
2.2. Pré-tratamento ácido.....	41
2.3. Pré-tratamento duplo (alcalino seguido de ácido).....	41
2.4. Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e extraíveis....	42
2.5. Hidrólise enzimática.....	42
2.6. Fermentação.....	42
2.7. Análise Estatística.....	43
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1. Efeito dos pré-tratamentos químicos associados à radiação de micro-ondas sobre o bagaço da cana-de-açúcar.....	43
3.2. Hidrólise enzimática e rendimento de etanol.....	51
4. CONCLUSÕES.....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (BIDLACK et al., 1992).....	16
<b>Figura 2:</b> Estrutura da celulose (FENGEL e WEGENER, 1989).....	17
<b>Figura 3:</b> Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).....	17
<b>Figura 4:</b> Precursores na formação da lignina derivados do (a) álcool cinâmico: (b) álcool trans-p-cumárico, (c) álcool trans-coniferílico e (d) álcool trans-sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).....	18
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (SANTOS et al., 2012).....	19
<b>Figura 6:</b> Transformação do cristal de celulose em glicose através do processo enzimático. (ASWATHY et al., 2010).....	26
<b>Figura 1:</b> Teores de glicose ( $\text{g/ L}^{-1}$ ) produzidos pela hidrólise enzimática do bagaço da cana.....	51
<b>Figura 2:</b> Comparação entre os valores obtidos e o máximo estimado de etanol ( $\text{L ton}^{-1}$ bagaço da cana-de-açúcar).....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b> Planejamento fatorial do pré-tratamento químico alcalino e ácido associado à radiação de micro-ondas.....	41
<b>Tabela 2:</b> Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos após caracterização do material.....	43
<b>Tabela 3:</b> Médias gerais e efeitos primários sobre os constituintes do bagaço da cana-de-açúcar submetidos ao pré-tratamento alcalino e radiação de micro-ondas.....	44
<b>Tabela 4:</b> Médias gerais e efeitos primários sobre os constituintes do bagaço da cana-de-açúcar submetidos ao pré-tratamento ácido e radiação de micro-ondas.....	47
<b>Tabela 5:</b> Concentração de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) após fermentação e avaliação em relação ao teor máximo esperado.....	53



## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

CO <sub>2</sub> .....	Dióxido de Carbono
GO .....	Goiás
COALBRA .....	Coque e Álcool da Madeira S.A.
g .....	Gramas
cm .....	Centímetro
% .....	Porcentagem
°C .....	Graus Celsius
pH .....	Potencial de hidrogênio
min .....	Minutos
h .....	Horas
mL .....	Mililitros
mL <sup>-1</sup> .....	Mililitros a menos um
Kg .....	Quilograma
Kg/ ton .....	Quilograma por tonelada
m/v .....	Massa por volume
g L <sup>-1</sup> .....	Gramas por litro a menos um
g/ g .....	Gramas por grama
v/ v .....	Volume por volume
< .....	Menor
> .....	Maior
DP .....	Grau de polimerização
Mpa .....	Megapascal(is)
MHz .....	Megahertz
DNS .....	Ácido dinitrosalicílico
FPU .....	Unidade de Papel Filtro
CBU .....	Unidade de Celobiose
Rpm .....	Rotações por minuto
W .....	Watts
M.O .....	Micro-ondas
H <sub>2</sub> O .....	Água
HCl .....	Ácido clorídrico
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	Ácido fosfórico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	Ácido sulfúrico
NH <sub>4</sub> OH .....	Hidróxido de amônio
NaOH .....	Hidróxido de sódio

## RESUMO

A presente proposta de pesquisa tem por objetivo investigar a associação da radiação de micro-ondas e ataques ácidos e alcalinos sobre o material lignocelulósico (bagaço da cana-de-açúcar), promovendo o aumento da celulose disponível e potencializando a liberação de açúcares fermentáveis, visando à produção de etanol combustível de segunda geração. Essa biomassa foi escolhida pela grande produção de cana-de-açúcar presente na região e a alguns aspectos interessantes, tais como o seu alto potencial energético e baixo teor de lignina, além de não competir com a produção de alimentos. A composição do substrato foi determinada, conforme descrito, obtendo-se os teores de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose. Em virtude da complexidade na formação de sua estrutura o pré-tratamento é um passo fundamental no processo de bioconversão, porque ele deve desorganizar a estrutura da biomassa, remover barreiras estruturais e composicionais tornando-a mais acessível, facilitando o acesso das enzimas celulolíticas, portanto, novas tecnologias têm sido desenvolvidas a fim de superar estes entraves. Entre elas destacam-se vários pré-tratamentos, tais como explosão a vapor, explosão com amônia, micro-ondas e ácidos diluídos. Atualmente há uma grande busca de processos para a hidrólise do bagaço a açúcares fermentescíveis, que sejam de baixo custo e ao mesmo tempo evitem formação de compostos tóxicos para a fermentação alcoólica subsequente.

**Palavras-chaves:** biocombustíveis, biomassa lignocelulósica, açúcares.

## ABSTRACT

These research aims to investigate the association of radiation microwave and acid and alkali attacks on the lignocellulosic material (cane sugar bagasse), promoting the increase in available cellulose and enhancing the release of fermentable sugars, aiming the production of second generation ethanol fuel. This biomass was chosen due to the large cane sugar production in the region and to some interesting aspects, such as its high energy potential and low lignin content, and the fact that do not compete with food production. The composition of the substrate was determined, as described, affording the levels of extractables, hemicellulose, lignin and cellulose. Due to the complexity in the formation of its structure, the pre-treatment is a fundamental step in the bioconversion process, because it should disrupt the structure of the biomass, remove structural and compositional barriers making it more accessible and, easier for cellulolytic enzymes, therefore, new technologies have been developed to overcome these barriers. Among them are several pre-treatments such as steam explosion, explosion with ammonia, microwave and dilute acids. There is currently a large search of procedures for the hydrolysis of bagasse fermentable sugars, which are of low cost and avoiding the formation of toxic compounds for subsequent fermentation.

**Key-words:** biofuels, lignocellulosic biomass, sugars.

## 1. INTRODUÇÃO

O consumo excessivo de combustíveis fósseis resultou na emissão de altos níveis de poluentes, tais como os gases de efeito estufa durante as últimas décadas. Por isso, pesquisas por fontes de energia alternativa e renovável têm se tornado muito importantes (SARKAR et al., 2012).

O aumento exacerbado do preço do petróleo, a natureza finita dos combustíveis fósseis, o aumento das preocupações quanto ao impacto ambiental, às considerações de saúde e de segurança estão forçando a busca por novas fontes de energia (DEMIRBAS, 2008). Portanto a produção de etanol, sem aumentar a exploração de terras cultiváveis a partir de resíduos lignocelulósicos, constitui um novo padrão de produção de energia (BENEDETTI et al., 2009).

O Brasil atingiu a produção de 659.10 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2013/14 (CONAB, 2014). São gerados em torno de 280 kg de bagaço por tonelada de cana, equivalente a 187 milhões de toneladas de bagaço de cana gerados em todo o território nacional, tornando esse material a principal biomassa lignocelulósica produzida (CGEE, 2010).

Desta forma, o Brasil se encontra em destaque, sendo privilegiado e capaz de liderar por completo todo o uso da biomassa lignocelulósica, porque é um dos maiores produtores de matérias-primas renováveis do mundo. Tais matérias-primas têm alto valor agregado, custo relativamente baixo, estão disponíveis em grande abundância, possuem fornecimento sustentável e não competem com a produção de alimentos, incluindo resíduos agrícolas, florestais e industriais, motivando a coprodução de biocombustíveis e por consequência a produção de energia sustentável com desempenhos ambientais e econômicos mais satisfatórios (CHERUBINI e STROMMAN, 2010).

Os resíduos lignocelulósicos são compostos principalmente de: celulose, hemicelulose e lignina. Eles também contêm pequena porcentagem de lipídeos, denominados de extraíveis. A celulose se encontra intimamente associada à

hemicelulose e a outros polissacarídeos estruturais, formando as microfibrilas ricas em carboidratos envolvidas por uma espécie de ‘selo’ constituído pela lignina (LIN et al., 2010).

Devido a esta complexidade na formação de sua estrutura, o pré-tratamento é um passo fundamental no processo de bioconversão, porque ele deve desorganizar a estrutura da biomassa, remover barreiras estruturais e composicionais tornando-a mais acessível, obtendo enriquecimento na percentagem de hidrólise e aumento dos rendimentos de açúcares fermentáveis a partir da celulose e hemicelulose, evitando a formação de compostos que impedem os processos subsequentes de hidrólise e fermentação. Tais pré-tratamentos podem ser realizados por meio de processos físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos (HENDRIKS e ZEEMAN, 2009).

Diante da diversidade de pré-tratamentos disponíveis na literatura, várias metodologias de pré-tratamento têm sido amplamente estudadas. E, todos esses métodos têm vantagens e desvantagens. Sendo assim, para ser um método economicamente viável, é imprescindível uma triagem do tipo de pré-tratamento a ser aplicado, uma vez que esta etapa irá influenciar diretamente sobre os rendimentos de glicose durante a hidrólise enzimática do material (MORETTI et al., 2014).

O combustível de segunda geração possui grande importância regional com o setor agro energético, já que o mesmo está em ampla expansão no Estado de Goiás (SALVI et al., 2010). Considerando que Goiás ocupa o segundo lugar em relação à produção de cana-de-açúcar nacional e do grande número de centros industriais do setor sucroalcooleiro presentes na região, gerando enorme quantidade de biomassa (bagaço de cana), com alto potencial energético pela sua concentração de celulose e baixo custo para a obtenção, além de constituir um resíduo ambiental a ser tratado, surge à oportunidade de utilizar esta biomassa para a fabricação de etanol de lignocelulósicos. (CONAB, 2014).

Diante disso o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do pré-tratamento químico alcalino e ácido combinado com a radiação de micro-ondas sobre a composição do bagaço da cana-de-açúcar, a fim de maximizar o teor de celulose para os processos de hidrólise e fermentação para obtenção de etanol de segunda geração.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Segundo Silva, Silva Junior e Pinto Junior (2010) no final da década de 1970, o Brasil buscou tecnologias para a produção de álcool a partir de celulose. Na ocasião, o

país optou por uma tecnologia ofertada pela ex-União Soviética. Desde então, foi implantado o programa COALBRA que contou com a instalação de uma usina experimental, com capacidade para 30 mil litros/ dia. Esta se fixou em Uberlândia, empregando como matéria-prima as plantações de eucalipto existente no triângulo mineiro. Porém, o processo não foi satisfatório por causa das dificuldades de transferência de tecnologias, ao tipo de madeira utilizada e aos problemas no processo fermentativo (SCHLITTLER e PEREIRA-JUNIOR, 2008).

Nos últimos trinta anos, empresas brasileiras e norte-americanas, são as que mais investem em pesquisa com etanol de segunda geração. Atualmente, os Estados Unidos possuem algumas plantas para a produção do etanol celulósico em escala pré-industrial. E, o Brasil vem caminhando no desenvolvimento de um mercado estável de etanol e apenas nesta década surgiram novos mercados à custa de forte intervenção, incentivos e subsídios. O etanol de cana-de-açúcar apresenta expressivas vantagens comparativas de custo de produção, sendo de 30% a 50% inferior ao custo de etanol norte-americano a partir do milho e três quartos do etanol europeu a partir da beterraba (BOZZEL et al., 2011; ROCHA et al., 2012).

Os custos dos processos para a produção de biomassa lignocelulósica ainda estão elevados. No entanto, a intensa mobilização de empresas, universidades e o enorme apoio público nos países desenvolvidos, como concessão de diversos incentivos, prometem resultados auspiciosos num horizonte não muito distante (BOZZEL et al., 2011; ROCHA et al., 2012).

O governo Federal Brasileiro tem investido significativamente em ciência e tecnologia vinculada ao etanol de segunda geração, esperando obter no futuro um combustível com alta produtividade, visando a máxima aplicação de matéria-prima e proporcionando a sustentabilidade do setor. Foi inaugurado em Campinas o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia. Está em funcionamento uma unidade em fase experimental na cidade de Piracicaba (SP) para fabricação de etanol de segunda geração. Com capacidade de produção diária chega a mil litros de etanol lignocelulósico. (CTC, 2013).

Resíduos agrícolas e florestais tais como a palha e o bagaço da cana-de-açúcar, gramíneas e cascas, que passam por processo de combustão ou são descartados, podem ser matérias-primas para obtenção de bioetanol (JARDINE e PERES, 2009).

Os resíduos agrícolas sobressaem por exibir maior valor agregado e obter elevada produção no Brasil. Portanto, vários métodos estão sendo estudados para o

reaproveitamento desses materiais, já que a concentração de resíduos é crescente, provocando a perda de recursos e prejudicando o meio ambiente. Esse acréscimo colabora significativamente para a problematização da reciclagem e conservação da biomassa. Estes materiais estão sendo modificados em produtos com alto valor agregado e em compostos químicos tais como ácidos orgânicos, enzimas, álcool, aminoácidos, entre outros. A utilização destes resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma opção coerente para fabricação de substratos e um auxílio para elucidar a questão da poluição ambiental (DEMIRBAS, 2008).

O Brasil tem a maior produção de cana-de-açúcar para a indústria sucroalcooleira. Depois da obtenção do caldo, são fabricados o açúcar e o álcool etílico, o bagaço que sobra é parcialmente queimado para a obtenção de energia elétrica e térmica para os processos industriais (FURLAN et al., 2012). Por causa do excesso de bagaço e a legislação que limita a queima da palha no campo, devendo atuar positivamente para que este resíduo seja incorporado ao sistema de geração de energia nos próximos anos, avalia-se que as usinas sucroalcooleiras podem disponibilizar de 30 a 50% do bagaço gerado para usos alternativos (BENEDETTI et al., 2009).

As matérias-primas lignocelulósicas formam o material mais abundante no mundo, surgindo de forma atrativa para produção de etanol, assim como para outros biocombustíveis. Por apresentar condições favoráveis, o plantio de cana-de-açúcar no cerrado do sudoeste goiano vem crescendo; assim o estado de Goiás ocupa a 2ª posição em área cultivada (CONAB, 2014).

### **2.1. Cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma gramínea da espécie *Saccharum officinarum*, sendo uma planta da família *Poaceae*, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas; originária do território asiático, onde era cultivada desde tempos ancestrais e introduzida em território brasileiro pelos portugueses no século XVI. Hoje é muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país (GOLDEMBERG et al., 2008). A mesma vem passando por modificações desde a sua origem, resultando em várias espécies, que distinguem entre si especialmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Atualmente, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido multiespecífico, recebendo a designação de *Saccharum ssp.* (GOLDEMBERG et al., 2008).

A cana-de-açúcar é composta por partes subterrâneas e aéreas. As raízes e rizomas fazem parte da parte subterrânea da planta, enquanto o colmo, as folhas e as flores fazem parte da parte aérea. É composta principalmente por água e açúcares que se reúnem nos colmos, e a sacarose é o carboidrato dominante. A composição química da cana-de-açúcar é muito mutável quanto à proporção dos elementos, mas, qualitativa e quantitativamente, expõe regularidades em todas as variedades (FURLAN et al., 2012). Do seu processo de industrialização obtêm-se como produto o açúcar nas suas mais variadas formas e tipos, o vinho, o etanol e o bagaço (ROCHA et al., 2012).

Atualmente, o Brasil está à frente dos 80 países produtores de cana e a previsão da produção de cana-de-açúcar, para a atual safra (2014-2015), indica que o total dessa matéria-prima que será processada pelo setor sucroalcooleiro deverá atingir um montante de 659,10 milhões de toneladas. Logo, o resíduo agroindustrial mais produzido é o bagaço da cana com aproximadamente 280 kg/ton de cana moída. (CONAB, 2014).

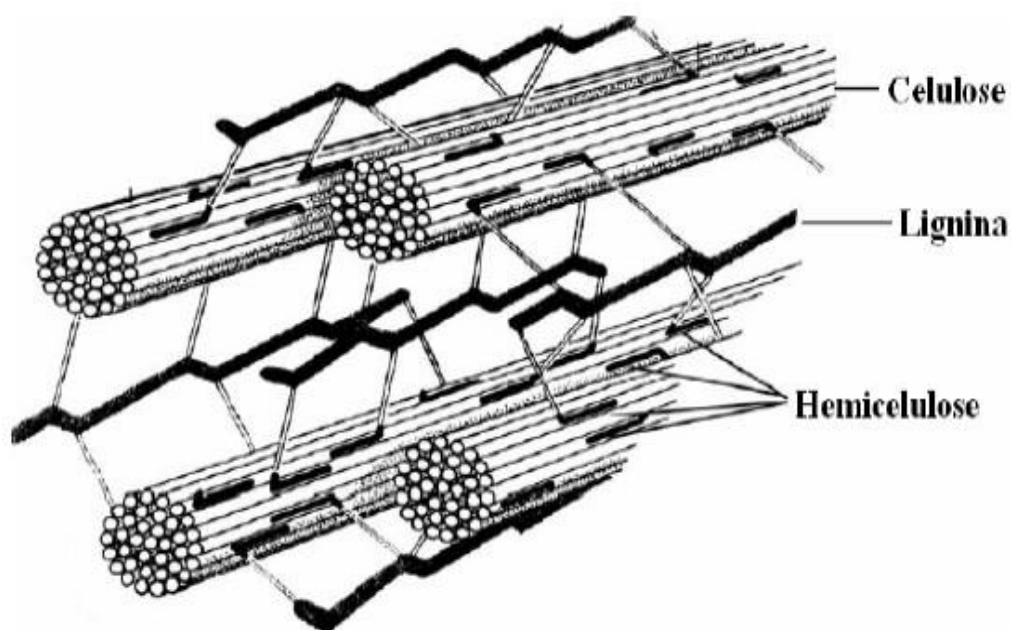
De acordo com a União da Indústria de Cana-de-Açúcar - (UNICA, 2014) estima-se que nesta safra tenha gerado 187 milhões de toneladas de bagaço de cana. Em grande parte das usinas o bagaço resultante é queimado para gerar energia para própria usina, entretanto, cerca de 40 a 50 kg por tonelada de cana-de-açúcar moída não é utilizada, e se torna um passivo ambiental, em termos de espaço e material poluente.

## **2.2. Bagaço da cana-de-açúcar**

Atualmente, o bagaço da cana tem sido alvo de vários estudos visando seu potencial energético, relacionado à produção de biocombustível, entretanto, seu uso não está restrito a esse fim. Devido à grande quantidade produzida e a suas características químicas e físicas tal material depara com grande campo de utilização como exemplos, na fabricação de papelão e papel, na produção de ração animal, na indústria química e aglomerados, como material alternativo na construção civil, na produção de biomassa microbiana e também, na produção de álcool via bagaço e palha de cana. O bagaço da cana-de-açúcar é um coproduto adquirido em altas quantidades e provém da moagem da cana para a extração do caldo, com a técnica que ocorre nos ternos das moendas das empresas produtoras de açúcar e etanol. A utilização deste subproduto na produção de etanol celulósico proporcionará aumento significativo na produção nacional de biocombustíveis (RODRIGUES e CAMARGO, 2008).



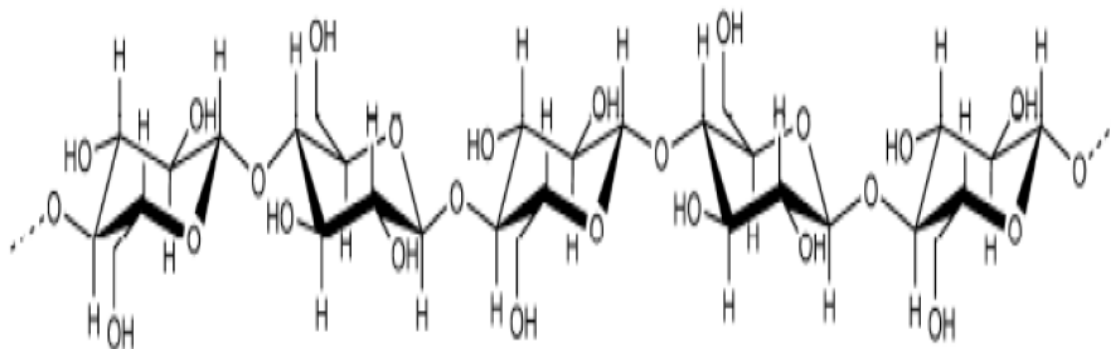
A composição do bagaço varia de acordo com diversos fatores, entre eles, o tipo de solo, o tipo de cana, as técnicas de manuseio e colheita. Quimicamente, é composto por: lignina, hemicelulose e celulose, os quais são os principais polímeros naturais, (Figura 1). E, uma pequena concentração de outros compostos como proteínas, pectinas e outros polissacarídeos complexos em quantidade menores (CORRALES et al., 2012). Do ponto de vista físico, constitui-se por 45% de fibra (fração sólida orgânica insolúvel em água presente no talo da cana); 2 a 5 % de sólidos insolúveis; sólidos solúveis e 50% de água (GEDDES et al., 2010).



**Figura 1:** Modelo da estrutura molecular dos principais constituintes do material lignocelulósico (BIDLACK et al., 1992).

### 2.2.1. Celulose

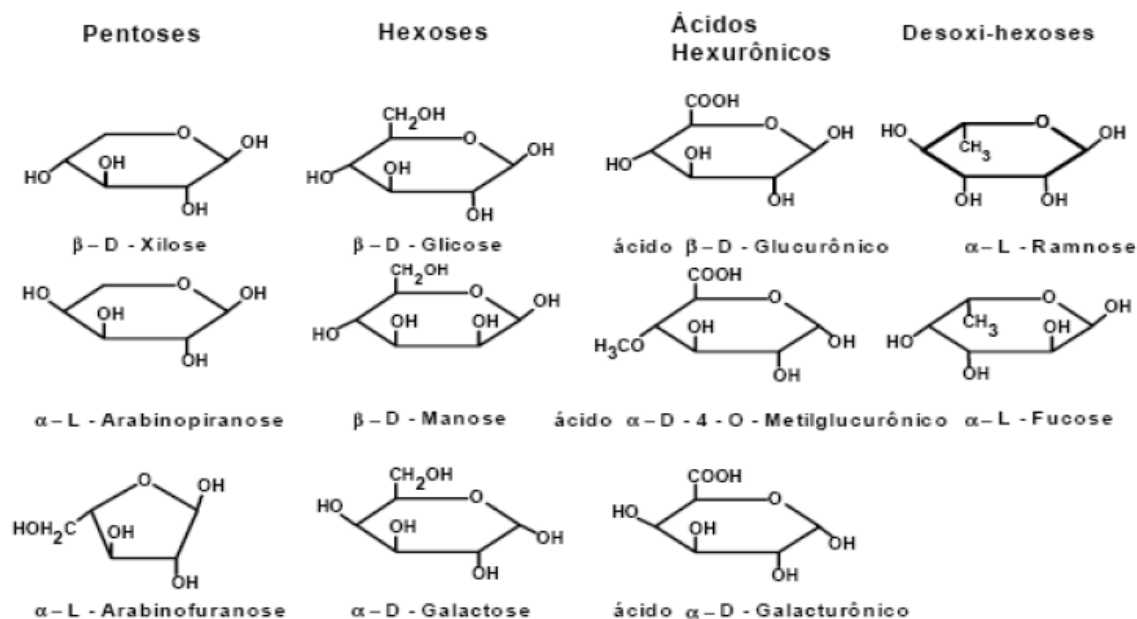
A celulose é o principal componente da lignocelulose e o polímero de carboidratos mais abundante do planeta. É um polissacarídeo linear que consiste em unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Figura 2), cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização (DP) que altera de 100 a 2000 DP. As cadeias de celulose constituem as fibrilas simples, compostas por regiões diferentes, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e força de Van der Waal's, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível à hidrólise (CADETE, 2009).



**Figura 2:** Estrutura da celulose (FENGEL e WEGENER, 1989).

### 2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é o segundo grande componente da lignocelulose e o segundo polissacarídeo natural mais abundante no mundo. Hemicelulose são polímeros heterogênicos ramificados, compostos por polissacarídeos de baixa massa molecular e, em grande abundância, pentoses (xilose, ramnose e arabinose) e hexoses (glicose, manose e galactose) como pode ser observado na Figura 3 (GIRIO et al., 2010).

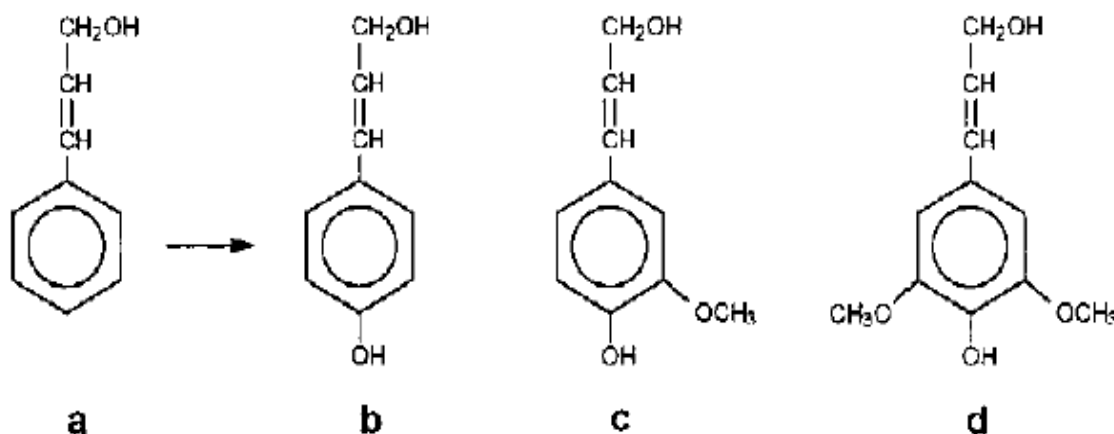


**Figura 3:** Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

### 2.2.3. Lignina

É um polímero proveniente de grupos fenilpropanoides, reproduzidos de forma irregular, que têm sua origem na polimerização desidrogenada do álcool coniferílico. Os polímeros fenilpropanoides que constituem a lignina são altamente condensados e muito

resistentes à degradação por causa das ligações aleatórias carbono-carbono entre os compostos fenólicos. Estes resultam na formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros que definem a estrutura complexa da lignina. Essas ligações carbono-carbono constituem o principal obstáculo para a ruptura da cadeia de lignina (CADETE, 2009; KESHWANI, 2009). A Figura 4 expõe os precursores primários na formação da lignina.



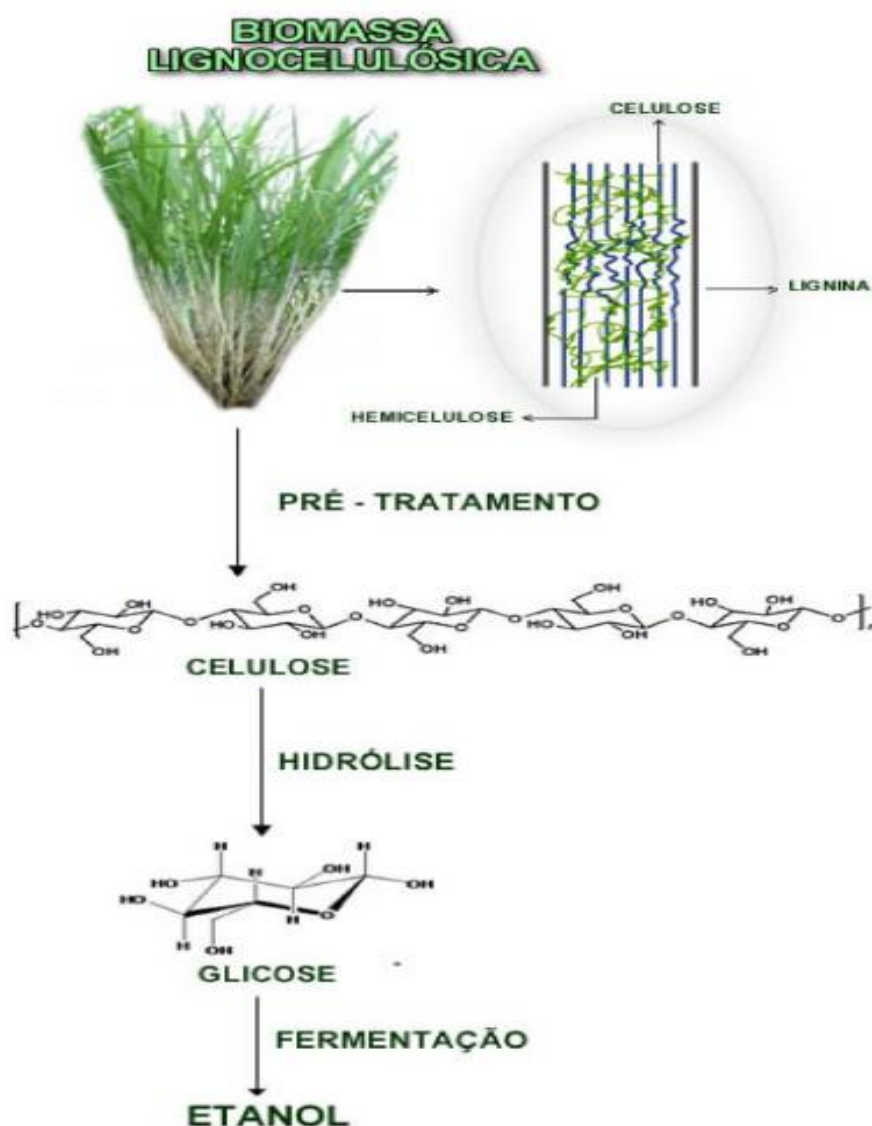
**Figura 4:** Precursores na formação da lignina derivados do (a) álcool cinâmico; (b) álcool trans-p-cumárico, (c) álcool trans-coniferílico e (d) álcool trans-sinapílico (FENGEL e WEGENER, 1989).

Cumprе ressaltar que os componentes são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose sejam fixadas pela lignina. Paralelamente, as cadeias de celulose se mantêm compactadas através de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto a lignina circundante “gruda” os componentes e age como barreira física para o ataque de microrganismos e água. A hemicelulose, por sua vez, proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa. Por isso, os dois maiores obstáculos para impedir a hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos são a recalcitrância da própria celulose cristalina, proveniente da estrutura linear das cadeias de celulose compactadas em microfibrilas, e a alta proteção que a lignina proporciona à estrutura celulósica, atuando como barreira física contra o ataque enzimático (CORRALES et al., 2012).

### 2.3. Produção de etanol a partir de biomassa

Segundo Aita et al. (2011), o processo de obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos possui basicamente três etapas, com diferentes possibilidades de combinação: pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação, como demonstrado na Figura 5.

Na conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, a primeira etapa consiste no pré-tratamento da biomassa com o intuito de remover as estruturas primárias da matéria-prima disponibilizando a celulose ao ataque enzimático. Em seguida, um complexo enzimático hidrolisa os polímeros de hemicelulose e celulose, a monômeros que são transformados em etanol por bactérias e leveduras. Posteriormente, o etanol é separado para ser enfim comercializado, como combustível ou adicionado à gasolina. A lignina que é recuperada da matéria-prima pode ser utilizada no processo como fonte de energia. Atualmente, novas tecnologias estão em desenvolvimento para agregar valor à lignina no mercado de alimento, fármacos, cosméticos e higiene pessoal (ALVIRA et al., 2010).



**Figura 5:** Representação esquemática da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (SANTOS et al., 2012).

## 2.4. Pré-tratamento

É necessário realizar um pré-tratamento do bagaço para aumentar a exposição das fibras de celulose, deixando-a mais disponível aos agentes hidrolíticos enzimáticos.

A fase operacional mais relevante da biomassa em termos de custo direto é o pré-tratamento da biomassa, além de influenciar consideravelmente os gastos das fases anteriores e subsequentes do processo. Em geral, estes podem se classificar em três grupos principais: físicos, químicos e biológicos, além de combinações entre eles (DA CRUZ et al., 2012; LI et al., 2014).

De modo geral, o pré-tratamento deve ser eficiente em termos de rentabilidade, funcionalidade, seletividade (garantindo a disponibilidade da celulose aos agentes hidrolíticos), simplicidade operacional, segurança e consistir em reduzido consumo de insumos químicos e energia (CHEN, ZHAO e XIA, 2009).

Os principais objetivos do pré-tratamento são: aumentar a área superficial da biomassa, separar o complexo lignina-celulose, diminuir o grau de cristalinidade da celulose, poupar as pentoses, maximizando os rendimentos em açúcares e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores nos processos subsequentes (PENG et al., 2013; PANG et al., 2013).

Ainda que vários processos de pré-tratamento tenham sido experimentados ao decorrer desses últimos anos, verifica-se a crescente necessidade de desenvolver e ampliar as alternativas tecnológicas eficazes em termos de competitividade econômica e custo geral. Basicamente, extrações seletivas de componentes não celulósicos (hemiceluloses e lignina) empregando ácidos ou álcalis, têm sido alcançadas com despesas relativamente plausíveis (CHUNDAWAT et al., 2010; LI et al., 2014).

Alguns autores relatam que o uso de micro-ondas é um método alternativo em relação ao aquecimento convencional (HU e WEN, 2008; MORETTI et al., 2014). As micro-ondas apresentam a capacidade de gerar calor de forma rápida e direta, comparado com o aquecimento baseado na transferência de calor por condução e convecção, que é realizado pela transferência de calor superficial (PENG et al., 2013).

A utilização de aparelhos de micro-ondas ocorre entre uma faixa de 900 a 2.450 MHz. E, mesmo operando na frequência, o aparelho de micro-ondas é insuficiente para induzir qualquer atividade química nos materiais. Entretanto, se o material exposto contiver moléculas polares ou íons, a radiação pode acelerar o processo. Outras vantagens na utilização desta tecnologia incluem investimento inicial reduzido, capacidade de iniciar e interromper o processo de forma instantânea, além da

uniformidade e seletividade no processo. Muito se tem investigado sobre esse método, que tem sido utilizado em inúmeras aplicações como aquecimento, secagem, cozimento e esterilização (KESHWANI, 2009).

Contudo, ressalva-se que a utilização somente da radiação não apresenta efeito expressivo sobre o material lignocelulósico. É necessária a utilização de algum composto iônico ou polar que induza a ruptura do material. Diante disso, os trabalhos da literatura, que estudam os efeitos das micro-ondas no pré-tratamento dos lignocelulósicos, avaliam a combinação da radiação com o uso de compostos alcalinos e ácidos (HU e WEN, 2008; KESHWANI, 2009).

Através do pré-tratamento químico, almeja-se obter a solubilidade da lignina e hemicelulose para deste modo expor a celulose à conversão por componentes alcalinos ou ácidos. No pré-tratamento com álcalis, a lignina é solubilizada, enquanto no pré-tratamento ácido, a cadeia de hemicelulose é hidrolisada. (ZHANG et al., 2013).

No Brasil, os reagentes ácidos mais utilizados são os ácidos sulfúricos ( $H_2SO_4$ ), clorídricos (HCl) e fosfóricos ( $H_3PO_4$ ). E, os álcalis mais comuns usados como agentes de pré-tratamento são os hidróxidos de sódio, cálcio, amônia e ureia (DA CRUZ et al., 2012).

O pré-tratamento com amônia tem recebido destaque porque, além de promover maior exposição da celulose pela modificação da estrutura da lignina facilitando o ataque enzimático, a amônia apresenta a facilidade de poder ser recuperada e reciclada devido à sua elevada volatilidade (HU e WEN, 2008; YOON et al., 2011).

Por isso, para que o processo de obtenção de etanol de lignocelulósicos seja um processo economicamente viável, é necessária a seleção rigorosa do tipo de pré-tratamento a ser aplicado, já que essa etapa irá intervir diretamente sobre os rendimentos de glicose durante o processo de hidrólise enzimática do material. Um eficiente pré-tratamento minimizará os custos envolvidos na aquisição de enzimas, viabilizando o processo (PANG et al., 2013).

#### **2.4.1. Pré-tratamento alcalino**

Os pré-tratamentos alcalinos (sódio, cálcio, potássio, e hidróxido de amônio) são muito eficazes na solubilização da lignina, exibindo um efeito menor sobre a glicose e xilose, em comparação com os pré-tratamentos ácidos (ALVIRA et al., 2010; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009). Outra relevante função dos álcalis é a possibilidade de remoção de inibidores formados da degradação dos açúcares. Estes subprodutos

incluem ácidos alifáticos, furaldeídos e compostos fenólicos (furfural e hidroximetilfurfural) que estão contidos no hidrolisado que posteriormente inibe o crescimento microbiano e a formação de etanol durante a fermentação (BOONMANUMSIN et al., 2012).

O pré-tratamento baseado em álcalis demonstra grande sucesso na deslignificação de substâncias lignocelulósicas, tais como bagaço e palha de cana. A amônia em particular rompe a parede celular, decompondo as ligações éter (C-O-C) e éster entre a hemicelulose e a lignina, assim como a sua penetração na estrutura da celulose provoca o inchaço da celulose. Ou seja, o tratamento alcalino do bagaço da cana-de-açúcar remove a matriz de lignina e deixa a celulose e hemicelulose mais disponíveis à degradação enzimática. E, por último diminui a cristalinidade da celulose (CARDONA et al., 2010; AITA et al., 2010). Pré-tratamentos a base de amônia com ou sem calor têm apresentado bons resultados na deslignificação do bagaço da cana, bagaço do sorgo, palha de milho e outros resíduos (AITA et al., 2010; ALVIRA et al., 2010; KIM et al., 2010; SALVI et al., 2010; ZHAO et al., 2011, AITA et al, 2011).

Segundo estudos realizados por Aita et al. (2011), o bagaço da cana foi tratado com hidróxido de amônio em alta pressão em um reator ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , solução a 28% v / v, Fisher Scientific) e água na proporção de 1: 0,5: 8. O reator foi aquecido com vapor a 160 ° C a 0,9-1,1 MPa e mantida a esta temperatura durante 1 h, em seguida, arrefeceu-se a 50-80 ° C. A biomassa foi prensada, seca a 20% de umidade a 40-45 ° C. Avaliou e demonstrou com sucesso a produção de etanol celulósico a partir do bagaço da cana. O pré-tratamento do bagaço da cana com hidróxido de amônio resultou em deslignificação significativa (55%), com uma perda mínima de celulose (<10%), um rendimento total de glicose  $37 \pm 2,3$  g de glicose / 100 g de biomassa seca e 87% de digestibilidade da celulose. Fermentações da glicose produzida com *Saccharomyces cerevisiae* resultaram em  $23 \pm 1$  g de etanol / 100 g de biomassa seca e 78% de rendimento teórico de etanol (AITA et al, 2011).

Em outro estudo realizado por Salvi et al. (2010) observou-se menor deslignificação (44%) e a perda de hemicelulose (30%) em sorgo pré-tratados com a solução de hidróxido de amônio diluído sob as mesmas condições descritas no estudo feito por Aita et al. (2011). A maioria da celulose (> 90%) foi retida na biomassa.

Em um trabalho realizado por Zhao et al. (2011) foi relatado um processo para produção integrada de polpa de papel, lignina e etanol com bagaço da cana como matéria-prima. Os resultados experimentais da sacarificação simultânea e fermentação

mostraram que a concentração de etanol produzido pelo processo alcalino foi o dobro da obtida com o bagaço de cana pré-tratado com ácido diluído.

O pré-tratamento à base de hidróxido de amônio é usado para remover parte do lignocelulósico, tal como descrito por Salvi et al. (2010). O hidróxido de amônio, sendo um reagente seletivo para lignina e não corrosivo serve como fonte de nitrogênio nos processos posteriores. Além disso, a celulose e a hemicelulose são bem preservadas na etapa de pré-tratamento com hidróxido de amônio, com baixos níveis ou nenhuma degradação (HAN et al., 2009). O principal efeito do pré-tratamento de  $\text{NH}_4\text{OH}$  é promover a deslignificação quebrando as ligações éter e éster da lignina (SALVI et al., 2010).

#### **2.4.2. Pré-tratamento ácido**

O pré-tratamento ácido tem por finalidade a solubilização da hemicelulose dos lignocelulósicos, além da liberação de parte da glicose presente na cadeia de celulose. Entre os diversos tipos de métodos, o pré-tratamento ácido é ainda uns dos métodos mais usuais para tratar o material lignocelulósico (CHENG et al., 2008; PATTRA et al., 2008; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009; GEDDES et al., 2010; YOON et al., 2011).

O ácido clorídrico foi utilizado para o pré-tratamento de diferentes lignoceluloses (por exemplo, palha de sorgo, bagaço da cana-de-açúcar e resíduos de óleo de palma), no entanto, o impacto ambiental e propriedades corrosivas limitam fortemente a sua aplicação. A hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar com HCl mostra rendimentos maiores em comparação com outros materiais lignocelulósicos e a conversão de mais de 30%, em peso, a açúcares redutores (CARDONA et al., 2010).

#### **2.4.3. Pré-tratamento em duas etapas**

Em pesquisas desenvolvidas por Wang et al. (2010), descobriu-se que o pré-tratamento em duas fases aumentou significativamente a digestibilidade de celulose por causa da remoção parcial de hemicelulose e lignina e explosão das fibras de celulose após o primeiro estágio de pré-tratamento.

Em trabalho realizado por Boonmanumsin et al. (2012), após submissão de *Miscanthus sinensis* a condições ótimas de pré-tratamento alcalino, ácido e em duas etapas. Identificou que os rendimentos de açúcares obtidos a partir do pré-tratamento em duas fases comparado com o pré-tratamento em fase única foram muito mais elevados, sendo que 2,93 g / 100 g de biomassa foram obtidos para o pré-tratamento



alcalino, 62,28 g / 100 g de biomassa para o pré-tratamento ácido e 71,64 g / 100 g de biomassa para o pré-tratamento em dois estágios.

#### **2.4.4. Pré-tratamento com micro-ondas**

Ao longo dos anos, muitos estudos têm sido realizados para reconhecer o efeito de micro-ondas no processo de pré-tratamento de biomassa para a produção de bioetanol. Tem sido relatado que a irradiação de micro-ondas provoca efeito de explosão física entre as microfibras, fazendo com que haja desintegração das estruturas recalcitrantes da biomassa. Para além do aquecimento convencional, o aquecimento por micro-ondas é outra via adequada para realizar a ruptura das estruturas recalcitrante da biomassa lignocelulósica. As micro-ondas aquecem a solução por meio de radiação. Isto implica, por sua vez, que as micro-ondas são capazes de penetrar na solução. Portanto, as micro-ondas podem ser absorvidas de maneira uniforme pela solução e proporcionar um aquecimento rápido e eficiente em termos energéticos do pré-tratamento da biomassa (CHEN e LIN, 2010).

Além disso, o campo eletromagnético presente no aparelho de micro-ondas produz efeitos físico-químicos que aceleram a decomposição das regiões cristalina. As vantagens do uso de micro-ondas se dão também pelos efeitos não térmicos associados (HUANG et al., 2009). Também há relatos que a irradiação de micro-ondas facilita a dissolução da lignina e hemicelulose em soluções alcalinas (KUMAR et al., 2009).

Ooshima et al. (1984) foi o primeiro a relatar sobre o uso de aquecimento por micro-ondas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Em seu estudo, a palha de arroz e bagaço eram colocados individualmente em vasos de vidro hermeticamente fechados com água e eram pré-tratados por irradiação de micro-ondas. Os resultados indicaram aumento na acessibilidade enzimática de 1,6 e 3,2 vezes para a palha de arroz e o bagaço da cana-de-açúcar, respectivamente, quando comparadas com amostras não tratadas.

Em uma pesquisa em que, antes do pré-tratamento de micro-ondas, *Miscanthus sinensis* foi suspensa em solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0,5-5% (w / v)), utilizando diferentes razões líquido-sólido (15: 1 - 45: 1 mL de solução de *M. sinensis*). A mistura foi agitada até ficar homogênea. O pré-tratamento com forno de micro-ondas (300 W) foi conduzido sob várias temperaturas (60-160 °C) e tempos (5-60 min) (BOONMANUMSIN et al., 2012).

Neste estudo de *M. sinensis*, pré-tratado com  $\text{NH}_4\text{OH}$  no intervalo de temperatura de 60-160 °C durante 5-60 min, resultou em maior quantidade de açúcares monoméricos (cerca de 1,37-1,47 g / 100 g do material), a 120 °C por 15 min. Também mostrou que o aumento da temperatura resultou em não só um aumento significativo na remoção da lignina, mas também a diminuição no rendimento total de açúcar, indicando a conversão de açúcar de outros compostos, tais como o furfural. Por isso, a temperatura ótima e tempo selecionado para o pré-tratamento  $\text{NH}_4\text{OH}$  foram 120 °C por 15 min para obtenção do rendimento máximo de glicose, xilose e arabinose, de 1,42, 0,66, e 0,66 g por 100 g de biomassa, respectivamente (BOONMANUMSIN et al., 2012).

Na pesquisa feita por Vani et al. (2012), em que o objetivo era comparar pré-tratamentos feitos com um reator de alta pressão e com um micro-ondas através da geração de energia de resíduos de plantas de algodoeiro. E também observar a otimização das condições dos resíduos de plantas de algodão após o pré-tratamento para suscetível hidrólise. Foi demonstrado que a exigência de energia para a unidade de pré-tratamento com micro-ondas foi de 5 vezes menor do que tratamento de alta pressão do reator. E, o pré-tratamento alcalino com micro-ondas produziu 0,495 g/g de açúcar após 6 min de tratamento, enquanto o reator de alta pressão produziu 0,79 g/g de açúcar depois de 45 min de tratamento. Assim o pré-tratamento alcalino com micro-ondas é também mais rápido.

Na metodologia utilizada por Ma et al. (2009), para avaliar o melhor pré-tratamento da palha de arroz com micro-ondas descobriram que a eficácia máxima da celulose, hemicelulose e sacarificação totais da palha de arroz aumentaram em 30,6%, 43,3% e 30,3%, respectivamente, quando foram realizadas as condições ótimas de pré-tratamento de micro-ondas.

A partir da revisão da literatura acima, é evidente que os métodos de pré-tratamentos podem ser métodos eficazes e promissores para a disponibilidade da celulose da biomassa para a produção de bioetanol.

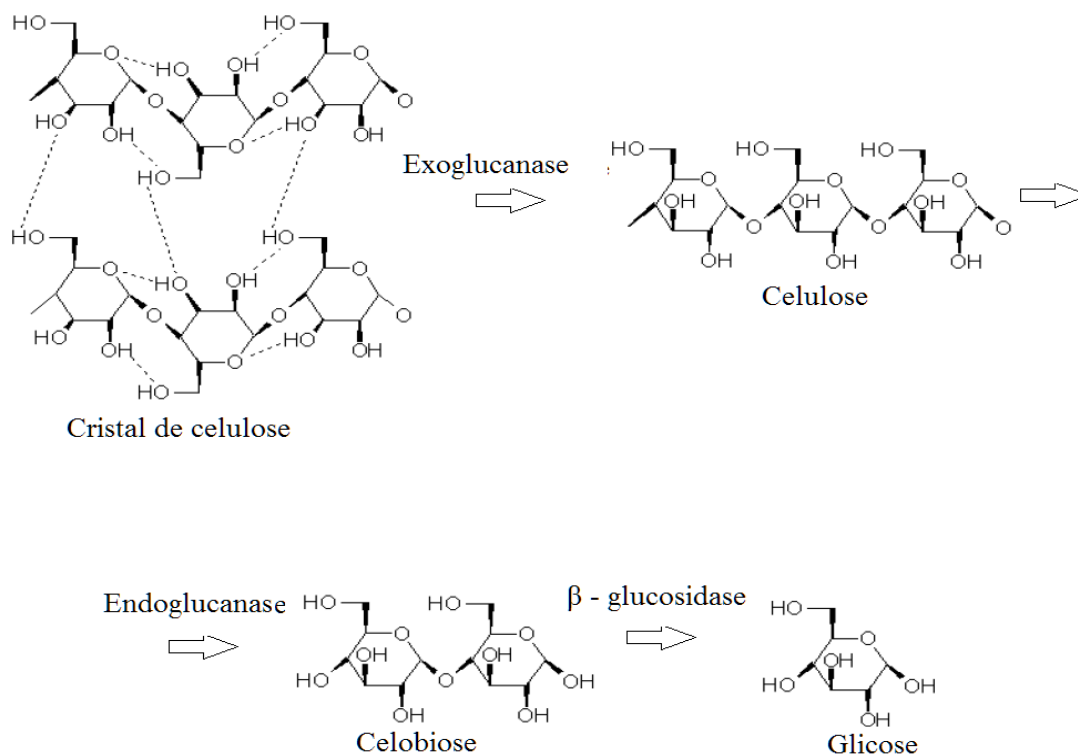
## **2.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

De acordo com Velmurugan e Muthukumar (2012) são reconhecidas três técnicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

Aswathy et al. (2010) descreve que as vias enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as vias químicas, em relação à produção de etanol através do bagaço da cana. As conversões enzimáticas surgem como opções promissoras, em termos de custo global, em benefício da possibilidade de atingir rendimentos glicosídicos próximos ao teórico, além do fato de poder contar com as técnicas avançadas de microbiologia e engenharia genética, a fim de aperfeiçoar as etapas do processo integrado. Ainda é um grande desafio converter o processo de hidrólise enzimática em um método possível, de modo que a produção de etanol a partir de biomassas possa ser tão competitiva quanto às outras rotas de produção de etanol de segunda geração em larga escala.

No processo enzimático, o material pré-tratado, rico em celulose é exposto ao contato com um coquetel de enzimas para a disponibilização da glicose presente. As melhores condições para o processo enzimático são particulares de cada extrato enzimático e influenciadas pela natureza do mesmo. Em geral, a faixa ótima de temperatura e pH para atividade enzimática se encontram em torno de 50°C e pH 4,0 – 5,0 (NIKOLIC et al., 2010).

A celulase é um complexo de enzimas composto por três enzimas com funções distintas, as endoglucanases, celobiohidrolases e a  $\beta$ -glicosidase (Figura 6).



**Figura 6:** Transformação do cristal de celulose em glicose através do processo enzimático. (ASWATHY et al., 2010).

Inicialmente as endoglucanases atacam aleatoriamente a cadeia de celulose para formar glicose, celobiose e celotriose. As celobiohidrolases fracionam a cadeia em dímeros de glicose (celobiose). Então, a  $\beta$ -glicosidase faz a conversão da molécula de celobiose em duas moléculas de glicose, sendo que sua ausência pode provocar inibição pela grande quantidade de celobiose presente. Na hidrólise da hemicelulose, o processo é mais complexo que o da celulose, porém apresenta maior privilégio de acessibilidade ao substrato, por que a estrutura das hemiceluloses não é cristalina como as celulosas (VELMURUGAN e MUTHUKUMAR, 2012).

Uma pesquisa desenvolvida por Hernández-Salas et al. (2009), demonstrou que a hidrólise enzimática obteve melhores resultados comparada a hidrólise ácida para a posterior fermentação porque não há formação de componentes de degradação da glicose, embora o processo seja mais lento.

Enzimas comerciais foram utilizadas para converter o bagaço da cana-de-açúcar a açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática de materiais celulósicos, por enzimas celulase é a abordagem mais promissora para obter altos rendimentos de produtos para o sucesso econômico (HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009).

## 2.6. FERMENTAÇÃO

A fermentação da glicose já é um processo completamente instituído. Não há microrganismo mais adequado do que a *Saccharomyces cerevisiae*, levedura que já foi extensivamente utilizada em fermentação industrial, sobrevivendo de um processo de seleção natural, demonstrando ótimos desempenhos em relação à transformação de glicose a etanol e produtividade alcoólica. Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados, a fermentação acontece sem maiores problemas (TALEBNIA et al., 2010).

Quanto ao processo fermentativo, sabe-se que atinge a estabilidade após 48 h, as condições ideais de temperatura são de 30 °C a 40 °C e o pH do meio de 4,8 - 5,0 (HENDRIKS e ZEEMAN et al., 2009).

## 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, G.A., KIM, M. Pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic materials to bioethanol. In: Sustainability of the Sugar and Sugar–Ethanol Industries. **American Chemical Society**. p. 117–145, 2010.

AITA, G.A.; SALVI, D.A.; WALKER, M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresource Technology**. n. 102, v. 6, p. 4444–4448, 2011.

ALVIRA, P.; PEJO, T.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzyme hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ASWATHY, U.S.; SUKUMARAN, R.K.; LALITHA-DEVI, G.; RAJASREE, K.P.; R.R. SINGHANIA, R.R. .; PANDEY, A. Bio-ethanol from water hyacinth biomass: an evaluation of enzymatic saccharification strategy. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 925–930, 2010.

BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M. Análise preliminar da produção de etanol a partir da celulose. Espírito Santo do Pinhal: **Engenharia Ambiental**. n. 2, v. 6, p. 272-284, 2009.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell wall in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**. v. 72, p. 51-56, 1992.

BOONMANUMSIN, P.; TREEBOOBPHA, S.; JEAMJUMNUNJA, K.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; CHAISUWAN, T.; WONGKASEMJIT, S. Release of monomeric sugars from *Miscanthus sinensis* by microwave-assisted ammonia and phosphoric acid treatments. **Bioresource Technology**. v. 103, p. 425–431, 2012.

BOZZELL, J.J.; BLACK, S.K.; MYERS, M.; CAHILL, D.; MILLER, W.P.; PARK, S. Solvent fractionation of renewable woody feedstocks: organosolv generation of biorefinery process streams for the production of biobased chemicals. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 4197–4208, 2011.

CADETE, R. M. Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanases associadas à

madeira em decomposição. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais. **Instituto de Ciências Biológicas**. Belo Horizonte, MG, 2009.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA. Censo Varietal e de Produtividade em 2012. Piracicaba: **CTC**, p. 1-18, 2013.

CGEE. Química verde no Brasil: 2010–2030. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos**, Ed. Revisada e atualizada. Brasília. p. 33-131, 2010.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Biomass Bioenergy**. v. 33, p. 1381–1385, 2009.

CHEN, W.H; LIN, B.C. Effect of microwave double absorption on hydrogen generation from methanol steam reforming. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.35, p. 1987–1997, 2010.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**. v. 38, p. 105–109, 2008.

CHERUBINI F. e STROMMAN, A. H. The production of biofuels and biochemicals from lignocellulosic biomass: estimated theoretical maximum productivity and efficiency, using matrix. **Energy Fuels**. v. 24, p. 2657-2666, 2010.

CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DA COSTA, L.; DALE, B. E. Thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Waldron, Keith (Ed.), **Bioalcohol Production**. Woodhead Publishing, Cambridge, UK, p. 24–72, 2010.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: cana de-açúcar, segundo levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, Disponível em:< [www.conab.gov.br/](http://www.conab.gov.br/)>. Acesso em: 01 setembro. 2014.

CORRALES, R.C.; MENDES, F.M.; PERRONE, C.C.; SANT ANNA, C., DE SOUZA, W.; ABUD, Y.; BON, E.P.; FERREIRA-LEITAO, V. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. **Biotechnology for Biofuels**. n. 5, v. 1, p. 36-42, 2012.

DA CRUZ, S. H.; DIEN, B. S.; NICHOLS, N. N.; SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse using response surface methodology improves digestibility and ethanol production by SSF. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. v. 39, p. 439–447, 2012.

DEMIRBAS, A. Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections. **Energy Conversion Manage**. v. 49, p. 2106-2116, 2008.

FURLAN, F. F.; COSTA, C. B. B.; FONSECA, G. C.; SOARES, R. P.; SECCHIC, A. R.; CRUZ, A. J. G.; GIORDANO, R. C. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**. v. 43, p. 1-9, 2012.

GEDDES, C.C.; PETERSON, J.J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M.T.; SHANNUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1851–1857, 2010.

GIRIO, F.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.; MARQUES, S.; LUKASIK, R. Hemicellulose for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production for sugarcane. **Energy Policy**. n. 36, v. 6, p. 2086-2097, 2008.

HAN, M.; MOON, S.K.; KIM, Y.; CHUNG, B.; CHOI, G.W. Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 14, p. 606–611, 2009.

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

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 1238–1245, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: **Walter de Gruyter & CO**. p. 613-620, 1989.

HU, Z. N. e WEN, Z. Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**. v. 38, p. 369-378, 2008.

HUANG, H.J.; RAMASWAMY, S.; AL-DAJANI, W.; TSCHIRNER, U.; CAIRNCROSS, R.A. Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: a comparative process and economic analysis. **Biomass Bioenergy**. v. 33, p. 234–246, 2009.

JARDINE, J. G. e PERES, M. R. Considerações sobre o bioetanol lignocelulósico para subsidiar a elaboração de conteúdo da Árvore de Conhecimento Agroenergia. Campinas, SP: **Embrapa Informática Agropecuária**, 2009.

LI, J.; ZHOU, P.; LIU, H.; XIONG, C.; LIN, J.; XIAO, W.; GONG, Y.; LIU, Z. Synergism of cellulase, xylanase, and pectinase on hydrolyzing sugarcane bagasse resulting from different pretreatment technologies. **Bioresource Technology**. v. 155, p. 258–265, 2014.



LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass waste based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8271-8223, 2010.

KESHWANI, D. R. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual da Carolina do Norte**, Carolina do Norte, Estados Unidos da América – EUA, 2009.

KIM, M.; AITA, G.; DAY, D.F. Compositional changes in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161, p. 34–40, 2010.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 48, p. 3713–3729, 2009.

MA, H.; LIU, W.W.; CHEN, X. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 1279–1284, 2009.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. C. C.; VILLENA, M. A.; PERRONE, O. P.; SILVA, R.; BOSCOLO, M.; GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**. v. 122, p. 189–195, 2014.

NIKOLIC, S.; MOJOVIĆ, L.; RAKIN, M.; PEJIN, D.; PEJIN, J. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal, **Food Chemistry**. v. 122, p. 216–222, 2010.

OOSHIMA, H.; ASO, K.; HARANO, Y. Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. **Biotechnology Letters**. v. 5, p. 289–294, 1984.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal Hydrogen Energy**. v. 33, p. 5256–5265, 2008.

PENG, H.; LI, H.; LUO, H.; XU, J. A novel combined pretreatment of ball milling and microwave irradiation for enhancing enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Bioresource Technology**. v. 130, p. 81-87, 2013.

PANG, F.; XUE, S.; YU, S.; ZHANG, C.; LI, B.; KANG, Y. Effects of combination of steam explosion and microwave irradiation (SE-MI) pretreatment on enzymatic hydrolysis, sugar yields and structural properties of corn stover. **Industrial Crops and Products**. v. 42, p. 402-408, 2013.

ROCHA, G.J.M.; GONC, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**. v. 35, p. 274–279, 2012.

RODRIGUES, C. P.; CAMARGO, J. A. Bagaço de cana-de-açúcar como potencial para co-geração de energia elétrica e etanol celulósico. São Joaquim da Barra: **Colégio Iara Coimbra**. p. 405-410, 2008.

SALVI, D. A.; AITA, G. M.; ROBERT, D.; BAZAN, V. Ethanol production from sorghum by a dilute ammonia pretreatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 27–34, 2010.

SCHLITTLER, L. A. F. S. e PEREIRA-JUNIOR, N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. **Revista Diálogos & Ciência**. v. 6, n. 15, set. 2008.

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

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**. v. 37, p. 19–27, 2012.

SILVA, M. G. E.; SILVA JUNIOR, J. L.; PINTO JUNIOR, C. R. T. Produção de etanol de segunda geração: uma revisão. São João da Boa Vista, SP. **Revista Pensamento Plural**. p.34-40, 2010.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: Na overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4744-4753, 2010.

UNICA. Acompanhamento da safra atual. **UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR**. São Paulo, Disponível em: [www.unica.com.br/unicadata](http://www.unica.com.br/unicadata) Acesso em: 01 setembro. 2014.

VANI, S.; BINOD, P.; KUTTIRAJA, M., SINDHU, R.; SANDHYA, S.V.; PREETI, V.E.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Energy requirement for alkali assisted microwave and high pressure reactor pretreatments of cotton plant residue and its hydrolysis for fermentable sugar production for biofuel application. **Bioresource Technology**. v. 112, p. 300–307, 2012.

VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Sono-assisted enzymatic saccharification of sugarcane bagasse for bioethanol Production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 63, p. 1-9, 2012.

WANG, B.; WANG, X.; FENG, H. Deconstructing recalcitrant miscanthus with alkaline peroxide and electrolyzed water. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 752– 760, 2010.

YOON, L. W.; NGOH, G. C.; SEAK, A.; CHUA, M.; HASHIM, M.A. Comparison of ionic liquid, acid and alkali pretreatments for sugarcane bagasse

enzymatic saccharification. **Journal Chemical Technology Biotechnology**. v. 86, p. 1342-1348, 2011.

ZHANG, L.; YU, H.; WANG, P.; DONG, H.; PENG, X. Conversion of xylan, D-xylose and lignocellulosic biomass into furfural using  $AlCl_3$  as catalyst in ionic liquid. **Bioresource Technology**. v. 130, p. 110-116, 2013.

ZHAO, X.; WU, R.; LIU, D. Production of pulp, ethanol and lignin from sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid delignification. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 2874-2882, 2011.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Avaliar e otimizar condições de pré-tratamentos químicos para a produção de bioetanol combustível a partir do bagaço da cana-de-açúcar, sob condições ácidas e alcalinas, com o uso de radiação de micro-ondas.

### **Específicos**

-Quantificar os teores de celulose, hemicelulose, lignina e extraíveis no material bruto;

-Verificar a atuação do hidróxido de amônio em determinada concentração, especificamente, sobre o teor de celulose;

-Avaliar a atuação do ácido clorídrico em determinada concentração, especificamente, sobre o teor de celulose;

- Quantificar o teor de açúcares redutores totais produzidos na hidrólise enzimática e o rendimento de etanol obtidos pelo melhor pré-tratamento químicos associado à radiação de micro-ondas.

## ASSOCIAÇÃO DE PRÉ-TRATAMENTOS QUÍMICOS E RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo: A pesquisa por fontes energéticas renováveis ganhou força, atualmente crescem os problemas ligados à emissão de CO<sub>2</sub> e também surge demanda por combustíveis que não agridam o meio ambiente. Neste contexto, surgem os combustíveis renováveis que se tornam a grande esperança para a diminuição da dependência do petróleo, dentre os quais, encontra-se o etanol de segunda geração. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar e otimizar as condições de pré-tratamentos químicos para a produção de bioetanol combustível a partir do bagaço da cana-de-açúcar, sob condições ácidas e alcalinas, com o uso de radiação de micro-ondas. Dentre os experimentos alcalinos, o experimento 14 exibiu menores teores de extraíveis, lignina e principalmente de hemicelulose, alterou de forma positiva a composição química da biomassa, elevando o teor de celulose presente para 38,3%. O teor de açúcar redutor total foi de 0,887g L<sup>-1</sup> e o rendimento de etanol foi de 64,3%. O pré-tratamento alcalino combinado com micro-ondas foi a técnica mais eficiente dentre os três processos de pré-tratamento químico associado à radiação de micro-ondas avaliados.

**Palavras-chave:** combustível; energia; bioetanol.

Abstract: The search for renewable energy sources has gained strength because of currently growing problems related to CO<sub>2</sub> emissions and a demand for fuels that do not harm the environment. In this context, renewable fuels arise that become a great hope to reduce oil dependency, among which is the second-generation ethanol. Thus, the objective of this study was to evaluate and optimize the conditions of chemical pretreatments for the production of fuel ethanol from cane sugar bagasse under acidic and alkaline conditions, with the use of microwave radiation. Among the alkali experiments, the experiment 14 showed lower levels of extractables, lignin and hemicellulose mainly, changed positively the chemical composition of biomass, bringing the present cellulose content to 38.3%. The total reducing sugar content was 0,887g L<sup>-1</sup> and the ethanol yield was 64.3%. The alkaline pretreatment combined with microwave technique was the most efficient of the three chemical pre-treatment processes associated with radiation of evaluated microwave.

**Key-words:** fuel; energy; bioethanol.

## 1. INTRODUÇÃO

O esgotamento inevitável de combustíveis fósseis, o aumento no preço do petróleo, as crescentes preocupações sobre as emissões de gases de efeito estufa e o aquecimento global têm resultado em interesse mundial de substituir os combustíveis fósseis por fontes alternativas de energia (DEMIRBAS, 2011). Além disso, a produção de bioetanol pode reduzir a importação de petróleo, ampliando a soberania do Brasil, um país dependente (BALAT, 2009). Destaque, o interesse em fontes de combustíveis renováveis continua a crescer dentro da indústria, o que requer o fomento de pesquisas em comunidades acadêmicas (ZHAO et al., 2011).

O Brasil, em 2014, produziu aproximadamente 659 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 187 milhões de toneladas de bagaço, um resíduo sólido resultante da extração do suco (CONAB, 2014). Uma parte desse material foi queimado por geração de eletricidade e o restante não tiveram uso direto. Considerando o alto teor de carboidratos, o bagaço é matéria-prima em destaque para a fabricação de etanol celulósico (KARP et al., 2013). Vários outros resíduos agrícolas, como palha de arroz, ou de milho podem ser reaproveitados para a produção de etanol e demais produtos químicos (BOONMANUMSIN et al., 2012).

Esta é uma das maneiras mais promissoras de utilizar a biomassa lignocelulósica, na conversão de glicanos de açúcares fermentáveis para produção de biocombustíveis (etanol, biodiesel, etc) e produtos de base biológica (butanol, glicerol, 1,3-propanodiol, etc). No entanto, a recalcitrância da biomassa lignocelulósica a enzima, como a interação entre a celulose e hemicelulose e o grau de lignificação necessita de um processo de pré-tratamento para aumentar a sua digestibilidade enzimática (ALVIRA, 2010).

Portanto, o maior entrave na produção de etanol a partir de material lignocelulósico é caracterizado pela recalcitrância da biomassa na natureza onde hemicelulose e celulose são densamente embaladas por camadas de lignina. Isso resulta na dificuldade de hidrólise enzimática e a baixa conversão de biomassa lignocelulósica



para açúcares fermentáveis. Por isso, variedade de métodos de pré-tratamento estão sendo desenvolvidos, a fim de melhorar a taxa de hidrólise enzimática e otimizar o rendimento de açúcares fermentáveis por meio da celulose e hemicelulose (KUMAR et al., 2009; HENDRIKS e ZEEMAN, 2009; CHEN e LIN, 2010).

Os principais objetivos destes processos de pré-tratamento são a remoção da lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, a fim de isolar a celulose no intuito de torná-la mais acessível e apta à hidrólise enzimática, fornecendo elevado rendimento de açúcares fermentáveis (PENG et al., 2013).

A remoção da lignina se dá por meio do pré-tratamento alcalino que viabiliza a quebra da estrutura rígida dos lignocelulósicos (AITA et al., 2011). O pré-tratamento ácido é capaz de hidrolisar a celulose e hemicelulose, enquanto o aquecimento por micro-ondas aprimora a eficiência desses processos (CARDONA et al., 2010; BOONMANUMSIN et al., 2012).

Deste modo, este trabalho tem como objetivo investigar o efeito do pré-tratamento com álcalis e ácido combinado com radiação de micro-ondas sobre a composição do bagaço da cana para maximizar os processos de hidrólise enzimática, fermentação e rendimentos de etanol.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

O material lignocelulósico utilizado neste trabalho foi o bagaço da cana-de-açúcar disponibilizado por uma usina da região do sudoeste do Estado de Goiás em julho de 2013.

No Laboratório de Química Tecnológica, do IF Goiano – Campus Rio Verde, foi realizada a lavagem em água corrente para remover quaisquer sujidades, a secagem em estufa com circulação forçada de ar, a trituração do material até a obtenção de um pó homogêneo e o armazenamento em pote plástico hermeticamente fechado, sob refrigeração, até o seu uso.

Antes de iniciar a etapa de pré-tratamento, foi elaborado um planejamento fatorial em dois níveis e com quatro variáveis conforme indicado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Planejamento fatorial do pré-tratamento químico alcalino e ácido associado à radiação de micro-ondas.

Experimento	Concentração (0,5 – 5%)	Razão Líquido- Sólido (10:1 – 50:1)	Tempo de Irradiação (10 – 60min)	Potência M.O. (10 – 20%)
Bruto	-	-	-	-
Controle (M.O+H <sub>2</sub> O)	-	250	60	20
1	0,5	50	10	10
2	5	50	10	10
3	0,5	250	10	10
4	5	250	10	10
5	0,5	50	60	10
6	5	50	60	10
7	0,5	250	60	10
8	5	250	60	10
9	0,5	50	10	20
10	5	50	10	20
11	0,5	250	10	20
12	5	250	10	20
13	0,5	50	60	20
14	5	50	60	20
15	0,5	250	60	20
16	5	250	60	20

### 2.1. Pré-tratamento alcalino

As amostras do pó lignocelulósico foram submetidas à concentração de 0,5 e 5% (m/v) de hidróxido de amônio, em razões de 10:1 e 50:1 entre a solução alcalina e o pó lignocelulósico e submetidas a potências de radiação de micro-ondas de 10% e 20% com duração de 10 e 60 minutos.

### 2.2. Pré-tratamento ácido

As amostras do pó lignocelulósico foram submetidas à concentração de 0,5 e 5% (m/v) do ácido clorídrico, razões de 10:1 e 50:1 entre a solução ácida e o pó lignocelulósico e submetidas a potências de radiação de micro-ondas de 10% e 20% com duração de 10 e 60 minutos.

### 2.3. Pré-tratamento duplo (alcalino seguido de ácido)

Foi selecionada a melhor condição alcalina e ácida obtida para o pré-tratamento duplo. Assim, o bagaço da cana-de-açúcar foi submetido ao tratamento alcalino e, posteriormente, ao ácido, sempre sob radiação de micro-ondas.

Após o pré-tratamento duplo, todas as amostras foram filtradas e os resíduos sólidos foram separados para a determinação da sua composição.

Todas as experiências foram realizadas em duplicata. Os resultados apresentados são os valores médios e os respectivos desvio padrão.

#### **2.4. Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e extraíveis**

Foram realizados em duplicata todos os experimentos da caracterização do bagaço da cana, definindo assim a quantidade de extraíveis, hemicelulose, lignina e celulose presente no material bruto sem nenhum tipo de tratamento, no material tratado apenas com água e micro-ondas (controle), nos materiais pré-tratados com hidróxido de amônio, naqueles tratados com ácido clorídrico combinado com micro-ondas e o material submetido ao pré-tratamento duplo (alcalino seguido de ácido).

As determinações dos respectivos teores foram feitas conforme descrito por Li et al. (2004) e Lin et al. (2010).

#### **2.5. Hidrólise enzimática**

Os pré-tratamentos que apresentaram os maiores rendimentos de celulose foram submetidos à hidrólise enzimática. O processo de hidrólise enzimática foi realizado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 2 g do material lignocelulósico, 100 mL de tampão citrato de sódio e um coquetel enzimático com 10 FPU/g da enzima comercial celulase e suplementação de  $\beta$ -glicosidase (0,3% m/v), sob agitação constante a 150 rpm e 50 °C. A hidrólise foi acompanhada diariamente durante três dias, nos intervalos de 0, 1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente, até a sua estabilização. E, os teores de açúcares redutores totais foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959; GHOSE, 1987).

#### **2.6. Fermentação**

Após três dias, quando o processo de hidrólise estabilizou, foi inoculada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* YPO4 seca em proporção de 2% (m/v). As condições de fermentação foram 35 °C por 48 h, em estufa. Novamente, foram realizadas leituras de açúcares redutores totais para acompanhar o consumo e conversão de glicose (SANTOS et al., 2010). O método do dicromato ácido foi utilizado para a avaliação do rendimento de etanol lignocelulósico produzido (SALIK e POVH, 1993).

## 2.7. Análise Estatística

Submeteram-se os resultados do pré-tratamento à análise de variâncias e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de significância estatística.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Efeito dos Pré-tratamentos Químicos Associados à Radiação de Micro-Ondas sobre o Bagaço de Cana-de-açúcar.

Através do referido planejamento fatorial, foram obtidos os resultados dos componentes dos materiais lignocelulósicos que podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores médios e desvio padrão dos resultados obtidos após caracterização do material.

Experimentos	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Bruto	7,4 ± 0,2	32,3 ± 1,36	40,7 ± 0,3	19,6 ± 1,4
Controle(M.O+H <sub>2</sub> O)	3,8 ± 0,0	42,9 ± 0,0	33,5 ± 0,2	19,8 ± 0,2
1-Alcalino	3,6 ± 0,2	45,7 ± 0,3	36,1 ± 1,3	14,6 ± 1,2
2- Alcalino	1,3 ± 0,1	35,4 ± 0,4	38,4 ± 0,5	24,9 ± 0,0
3- Alcalino	3,6 ± 0,2	45,7 ± 0,9	34,6 ± 0,3	16,2 ± 0,4
4- Alcalino	1,5 ± 0,0	36,9 ± 0,1	44,0 ± 0,0	17,7 ± 0,1
5- Alcalino	17,7 ± 0,6	38,2 ± 0,8	39,4 ± 2,4	4,7 ± 1,1
6- Alcalino	2,2 ± 0,1	34,2 ± 0,1	43,2 ± 0,2	20,4 ± 0,4
7- Alcalino	1,9 ± 0,0	44,2 ± 2,8	48,2 ± 1,6	5,6 ± 4,3
8- Alcalino	2,5 ± 0,2	34,5 ± 0,2	42,8 ± 0,7	20,1 ± 0,7
9- Alcalino	1,4 ± 0,1	38,1 ± 0,6	42,6 ± 1,8	18,0 ± 2,3
10- Alcalino	1,5 ± 0,0	34,3 ± 0,6	42,8 ± 0,6	21,4 ± 1,2
11- Alcalino	2,5 ± 0,1	38,9 ± 1,0	50,5 ± 1,1	8,1 ± 2,0
12- Alcalino	0,3 ± 0,1	37,5 ± 0,6	38,5 ± 0,3	23,7 ± 0,3
13- Alcalino	3,6 ± 0,0	41,1 ± 1,1	53,7 ± 4,7	2,1 ± 2,9
14- Alcalino	6,8 ± 0,0	16,2 ± 0,1	38,6 ± 0,3	38,3 ± 0,2
15- Alcalino	3,9 ± 0,2	32,7 ± 0,8	52,7 ± 0,5	10,7 ± 0,2
16- Alcalino	0,7 ± 0,1	19,9 ± 0,2	40,3 ± 0,1	36,0 ± 0,2
1-Ácido	1,7 ± 0,1	40,2 ± 0,2	49,1 ± 0,1	9,0 ± 0,2
2- Ácido	3,5 ± 0,0	43,5 ± 0,6	43,9 ± 0,1	9,1 ± 0,7
3- Ácido	2,8 ± 0,1	37,0 ± 0,3	45,4 ± 0,1	14,9 ± 0,3
4- Ácido	6,7 ± 0,0	43,8 ± 0,2	47,5 ± 0,2	2,0 ± 0,4
5- Ácido	7,1 ± 0,0	43,5 ± 0,0	44,9 ± 0,1	4,6 ± 0,0
6- Ácido	2,1 ± 0,1	35,2 ± 0,4	45,3 ± 0,5	17,4 ± 1,0
7- Ácido	6,4 ± 0,1	42,4 ± 1,0	46,0 ± 0,6	5,1 ± 0,3
8- Ácido	1,8 ± 0,1	40,4 ± 0,7	48,4 ± 0,2	9,4 ± 0,7
9- Ácido	2,0 ± 0,0	35,7 ± 0,2	46,4 ± 0,1	15,9 ± 0,3
10- Ácido	2,5 ± 0,1	34,2 ± 0,2	43,8 ± 0,5	19,5 ± 0,2
11- Ácido	2,9 ± 0,1	41,2 ± 0,1	42,1 ± 0,4	13,9 ± 0,2
12- Ácido	2,9 ± 0,0	33,3 ± 0,2	38,6 ± 0,6	25,1 ± 0,8
13- Ácido	10,8 ± 0,0	40,2 ± 0,6	39,9 ± 0,3	9,1 ± 0,9
14- Ácido	0,7 ± 0,1	42,9 ± 0,1	36,3 ± 0,4	20,1 ± 0,3
15- Ácido	6,3 ± 0,1	37,3 ± 0,6	51,4 ± 0,5	4,9 ± 0,4

16- Ácido	0,7 ± 0,0	41,1 ± 0,1	35,2 ± 0,4	23,0 ± 0,3
Trat. Duplo	0,7 ± 0,4	35,0 ± 0,2	43,1 ± 0,4	21,0 ± 0,3

Analisando a tabela 2, observa-se que o material bruto contém em sua composição 7,4% de extraíveis, 32,2% de hemicelulose, 40,7% de lignina e 19,6% de celulose.

Os valores obtidos na análise estão dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Pelo fato de a constituição final de cada planta sofrer vários tipos de influência - como, por exemplo, as variedades da cana-de-açúcar, clima (temperatura, umidade), infecção e pragas, constituição do solo, métodos de plantio, época de colheita e outros - as plantas de mesma espécie apresentam composições diferentes (CORRALES et al., 2012). Isto faz com que, normalmente, não se encontre valores fixos para cada análise, mas sim uma faixa de valores.

Ao realizar análise estatística dos resultados obtidos de todos os experimentos observaram as médias gerais e efeitos primários da mudança de cada variável, como demonstrado nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 3:** Médias Gerais e Efeitos Primários sobre os constituintes do Bagaço da Cana-de-açúcar submetidos ao Pré-tratamento Alcalino e Radiação de micro-ondas.

Variáveis	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Médias Gerais	3,4%	35,8%	42,9%	17,7%
Concentração (0,5 – 5%)	2,6%	9,4%	3,6%	-15,3%
Razão L/S (10:1 – 50:1)	2,7%	-0,9%	-2,1%	0,8%
Tempo (10 – 60 min)	- 2,9%	6,4%	-3,9%	0,8%
Potência (10 – 20%)	1,7%	-7,0%	-4,1%	-4,3%

Para os extraíveis, foi obtido o valor médio geral de 3,4% como pode se observar na Tabela 3, o que é menor do que o teor no bagaço de cana-de-açúcar bruto (7,4%) Tabela 2. Tal redução do teor indica que o pré-tratamento alcalino com radiação de micro-ondas atua sobre os extraíveis, reduzindo o seu teor relativo. Ainda, pode-se presumir que isto se deva a solubilização dos constituintes na água e ao efeito da radiação de micro-ondas, pois no controle, em que foi usado somente água e radiação de micro-ondas, o teor de extraíveis atingiu cerca de 3,8% (Tabela 2), muito próximo ao valor médio obtido pela associação entre solução alcalina e radiação de micro-ondas.

Na Tabela 3, observa-se que os efeitos da concentração dos álcalis, da razão Líquido/ Sólido e da potência da radiação de micro-ondas foram todos positivos, conduzindo a redução do teor de extraíveis no bagaço, o que significa que os demais constituintes foram afetados em menor grau. Já para o tempo de irradiação, ocorreu um efeito inverso, de modo que o aumento do tempo do pré-tratamento com radiação de micro-ondas levou ao aumento do teor de extraíveis, significando que os demais constituintes foram mais afetados, elevando o teor relativo de extraíveis.

As quatro variáveis apresentaram efeitos de magnitude semelhante sobre o teor de extraíveis, não sendo possível indicar a variável predominante.

Para a hemicelulose do material pré-tratado, pode-se observar valores que variaram de  $16,2\% \pm 0,1$  no experimento 14; até  $45,7\% \pm 0,3$  e  $45,7\% \pm 0,9$  nos pré-tratamentos 1 e 3, respectivamente (Tabela 2). Foi obtido o valor médio geral de  $35,8\%$  (Tabela 3), que é maior do que o teor no bagaço de cana-de-açúcar bruto ( $32,3\%$ ), ocorrendo a diminuição dos outros componentes, tornando a quantidade relativa de hemicelulose maior. Já o experimento 14 demonstrado na Tabela 2, apresentou teores de hemicelulose de  $16,2\%$ , sendo o menor resultado obtido, diminuindo consideravelmente a quantidade de pentoses no material lignocelulósico, destacando-se como ótimas condições para a retirada de hemicelulose.

Percebe-se que a concentração do álcali e do tempo de radiação remove a hemicelulose, preservando os demais constituintes, conduzindo a menores teores de hemicelulose. Quanto a razão líquido-sólido e potência do micro-ondas, a sua mudança produziu elevação dos teores de hemicelulose, o que indica efeito mais pronunciado sobre os demais constituintes do bagaço de cana-de-açúcar.

Quanto à lignina, a mesma apresentou o teor médio de  $42,9\%$  nos materiais pré-tratados, ligeiramente acima do valor médio do material bruto ( $40,7 \pm 0,3$ ). Nota-se a extração mais efetiva quando utilizados pré-tratamentos com maior concentração de hidróxido de amônio ( $5\%$ ); porém quando se aumenta a razão líquido/sólido, o tempo e a potência de radiação do micro-ondas há o decréscimo na extração, conforme ilustrado na Tabela 3, provavelmente por maior remoção dos outros constituintes, promovendo a elevação do teor relativo de lignina.

O valor médio encontrado para a celulose foi de  $17,7\%$ , com a variação entre  $2,1\%$  no experimento 13 até  $38,3\%$  no experimento 14. Quando comparado ao material bruto ( $19,6 \pm 1,4$ ), o experimento 14 supera a quantidade de celulose obtida na biomassa em quase o dobro, mostrando no geral, o quão eficiente é o pré-tratamento alcalino

auxiliado por micro-ondas na manutenção da celulose na biomassa (Tabela 2). Ao elevar a razão líquido/sólido e o tempo da radiação de micro-ondas, observa-se o decréscimo da celulose na biomassa, porém quando variado a concentração e a potência há o aumento de 15,3% e 4,3% da celulose, respectivamente, demonstrando que é viável a elevação da concentração do hidróxido de amônio e da potência da radiação de micro-ondas para a preservação de celulose.

Com essa análise fatorial, as melhores condições verificadas para a obtenção de material lignocelulósico com alto teor de celulose consistem em concentração alcalina alta (5%), razão líquido-sólido baixa (10:1), tempo de irradiação alto (60 minutos) e potência de micro-ondas alta (20%), indicado pelo experimento 14, na Tabela 2.

O pré-tratamento com micro-ondas apresenta resultados positivos na composição da biomassa, principalmente quando é associado a substâncias químicas. A utilização de soluções alcalinas tem mais efeito sobre os componentes de lignina, enquanto a celulose e hemicelulose permanecem intactas. Contudo, aqueles que utilizam soluções ácidas tendem a hidrolisar as frações da hemicelulose, enquanto deixam as porções de celulose e lignina intactas no sólido residual (HU e WEN, 2008; KESHWANI, 2009).

A chave para o pré-tratamento é encontrar as condições adequadas de processo que irão remover a maior parte da lignina, preservando os açúcares (KESHWANI e CHENG, 2009). Keshwani e Cheng (2009) usaram aquecimento por micro-ondas com 2% de NaOH durante 10 minutos ao nível de potência 250W para pré-tratar um tipo específico de gramínea conhecida como “switchgrass” e observaram a remoção de 68% da lignina, mantendo 82% de celulose. Da mesma forma, o pré-tratamento de gramínea usando micro-ondas ao nível de potência de 250W com NaOH a 1% durante 10 min removeu quase 65% da lignina e manteve 87% da celulose.

Corroborando com a constatação da eficiência do pré-tratamento com micro-ondas, Zhu et al. (2006) também relataram que o pré-tratamento alcalino combinado com micro-ondas da palha de trigo removeu mais lignina e hemicelulose a partir da biomassa, em menor tempo do que o pré-tratamento alcalino por aquecimento convencional.

Gupta et al. (2011) estudaram e avaliaram métodos de pré-tratamento que utilizam produtos químicos diferentes e observaram que independente do substrato (sabugo de milho, *Prosopis juliflora* e *Lantana camara*) a quantidade máxima de

deslignificação foi de cerca de 80-90% usando 4% (m / v) de clorito de sódio a 121° C durante 30 min.

Estudos sobre *L. camara* usando Sulfito de sódio a 20% a 140° C durante 45 minutos por Kuhad et al. (2010) relataram 77% de deslignificação. Quando tratado com clorito de sódio à temperatura ambiente, foi capaz de atingir 34% de deslignificação. Ainda em outra pesquisa realizada por Naseeruddin et al. (2013), o tratamento de *Prosopis juliflora* com sulfito de sódio a 4% removeu  $74,70 \pm 2,66\%$  de lignina à temperatura ambiente após 18 h.

No que se refere ao pré-tratamento ácido, tal como no pré-tratamento alcalino, os valores de extraíveis obtidos denotam maior eficiência deste pré-tratamento em relação ao material bruto. Por meio do pré-tratamento ácido se obteve o valor médio geral de extraíveis de 3,8% (Tabela 4), menor do que o teor no bagaço da cana-de-açúcar bruto (7,4%).

**Tabela 4:** Médias Gerais e Efeitos Primários sobre os constituintes do Bagaço da Cana-de-açúcar submetidos ao Pré-tratamento Ácido e Radiação de micro-ondas.

\* valor não significativo

Variáveis	Extraíveis	Hemicelulose	Lignina	Celulose
Médias Gerais	3,8%	39,4%	44%	13,4%
Concentração (0,5 – 5%)	2,3%	0,3%	3,2%	-7,5%
Razão L/S (10:1 – 50:1)	-0,0%*	-0,1%*	-0,6%	-0,7%
Tempo (10 – 60 min)	-1,3%	-1,7%	1,7%	0,4%
Potência (10 – 20 %)	0,3%	2,5%	4,5%	-9,0%

Tal redução do teor indica que a radiação de micro-ondas atua sobre os extraíveis, reduzindo o seu teor relativo, pois no controle, em que foi usada somente água e radiação de micro-ondas, o teor de extraíveis também atingiu cerca de 3,8%, idêntico ao valor médio obtido pela associação entre solução ácida e radiação de micro-ondas.

Os efeitos da concentração do ácido e da potência da radiação de micro-ondas foram todos positivos, conduzindo a redução do teor de extraíveis no bagaço, o que significa que os demais constituintes foram afetados em menor grau. Quanto ao tempo, ocorreu efeito inverso, de modo que o aumento do tempo do pré-tratamento levou ao aumento do teor de extraíveis, o que significa que os demais constituintes foram mais



afetados. Já a variação da razão líquido/sólido não promoveu qualquer alteração sobre o teor relativo dos extraíveis.

O principal objetivo do pré-tratamento com ácidos diluídos é o de solubilização da hemicelulose, que apresenta estrutura ligeiramente amorfa e ramificada resistente à hidrólise (ALVIRA et al., 2010; TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

Quanto aos teores de hemicelulose no pré-tratamento ácido, a média geral foi de 39,4%, indicando que houve maior extração dos outros constituintes da biomassa em relação ao material bruto (teor de hemicelulose de 32,3%). Na Tabela 2, pode-se observar que nos dezesseis experimentos ácidos realizados, todos revelaram teores relativos de hemicelulose maiores do que o material bruto, variando de  $33,3\% \pm 0,2$  no experimento 12 até  $43,8\% \pm 0,2$  (experimento 4). Com isso constatou-se que ocorreu a diminuição drástica de algum ou alguns dos outros componentes, tornando a quantidade de hemicelulose maior.

Pode ser observado que, ao elevar a concentração do ácido (de 0,5 para 5%) e a potência da irradiação do micro-ondas, obteve-se o acréscimo na extração de hemicelulose, mas as variações em relação à razão líquido/sólido são praticamente neutras e a elevação do tempo não é favorável para a retirada de hemicelulose.

Com o teor médio de 44%, e variações entre 34,2% no experimento 16 até 51,4% no experimento 15, nota-se que os teores de lignina são fracamente afetados pelos pré-tratamentos ácidos associados com radiação de micro-ondas.

Quanto à lignina, eleva-se consideravelmente sua extração quando se altera a potência de radiação do micro-ondas de 10% para 20% e da concentração do ácido clorídrico de 0,5% para 5%. Ocorrem pequenos acréscimos de extrações com a elevação do tempo da radiação de micro-ondas. Quanto a razão líquido/sólido, à medida que se aumenta de 10:1 para 50:1 há o decréscimo na extração (-0,6%), conforme ilustrado na Tabela 4.

A celulose apresentou o teor médio de 13,4% nos materiais submetidos ao pré-tratamento ácido com radiação de micro-ondas, o que indica uma redução do mesmo em relação ao material bruto (19,6%).

Quando se varia a razão líquido/sólido de 10:1 para 50:1 ocorre o aumento de 0,7 p.p. da celulose na biomassa, o que ocorre também com a variação da concentração do ácido clorídrico de 0,5% para 5% que apresenta a elevação de 7,5 p.p. de celulose na biomassa. A elevação da potência de radiação no micro-ondas permite incrementos de 9,0 p.p. no teor de celulose, indicando que outros constituintes são afetados,

preservando a celulose, o que é um aspecto muito importante, porém ao mudar o tempo de irradiação de 10 minutos para 60 minutos há a perda de 0,4 p.p. da celulose.

Conclui-se, portanto, que a condição ideal de pré-tratamento ácido associado à radiação de micro-ondas consiste em concentração do ácido clorídrico elevada (5%), da razão líquido/sólido de 50:1, potência da radiação de micro-ondas alta (20%), mas com tempo de irradiação reduzido (10 minutos). O qual corresponde às condições assinaladas é o pré-tratamento 12 ácido, que foi justamente o que mais se destacou, com um teor de 25,1% de celulose.

Enquanto no presente trabalho a alta concentração do ácido clorídrico contribuiu para o melhor desempenho do processo de pré-tratamento; um estudo realizado por Silva et al. (2010) que utiliza baixas concentrações do ácido fosfórico resultou em maior desempenho do pré-tratamento, denotando comportamentos divergentes para cada tipo de ácido.

O pré-tratamento com ácido fosfórico de 0,20% a 186 °C e 8 min foi comparado com outros pré-tratamentos de bagaço da cana realizado no mesmo reator. O método foi realizado com os resultados obtidos em dois estudos distintos: (i) um processo catalisado por ácido com ácido sulfúrico diluído e outro por ácido acético (ROCHA et al., 2011), e (ii) um pré-tratamento hidrotérmico (SILVA et al., 2010).

Comparando este trabalho de pré-tratamento com ácido fosfórico com o pré-tratamento hidrotérmico realizado por Silva et al. (2010), conclui-se que o uso de baixa concentração de ácido fosfórico como catalisador no pré-tratamento do bagaço da cana é muito mais eficaz na remoção de hemicelulose, enquanto ocorre menor remoção de celulose e lignina. Com relação aos resultados obtidos através do pré-tratamento com ácido sulfúrico e ácido acético (ROCHA et al., 2011), em uma amostra o uso de ácido fosfórico com concentração muito menor possui capacidade ligeiramente maior de solubilizar a hemicelulose, com a vantagem de ser fonte de fósforo para a subsequente fermentação do hidrolisado.

Wei et al. (1996) também discutiu o potencial do uso de ácido fosfórico sobre a descristalização e dissolução da celulose. A maior quantidade do rendimento total de açúcares monoméricos, 62,28 g / 100 g de biomassa, a partir do pré-tratamento de  $H_3PO_4$  contém o máximo de glicose, xilose e os rendimentos de arabinose de 41,05, 18,69, e 2,53 g de biomassa, respectivamente.

Gámez et al. (2006), também utilizou o ácido fosfórico (4%) para hidrolisar o bagaço da cana-de-açúcar por 300 minutos e obter rendimentos máximos de açúcar de

(34,7 g / 100 g de biomassa. Vázquez et al. (2007) utilizaram a palha de sorgo hidrolisado por meio de ácido fosfórico a 6% a 134 °C para 300 minutos a fim de se obter o rendimento de açúcar de 8 g / L.

Diante do exposto, o planejamento fatorial realizado, revela que os pré-tratamentos que obtiveram maior teor percentual de celulose foram os experimentos 14 alcalino e 12 ácido, sendo que as condições experimentais para os mesmos foram: concentração de hidróxido de amônio a 5%, razão líquido/sólido 10:1, potência do micro-ondas ajustada para 20% e tempo de radiação em 60 minutos e concentração do ácido clorídrico a 5%, razão líquido/sólido 50:1, potência do micro-ondas ajustada para 20% e tempo de radiação em 10 minutos, respectivamente. A partir de tais descobertas, executou-se outra forma de pré-tratamento, conjugando o pré-tratamento alcalino nas condições do experimento 14, seguido de pré-tratamento ácido, conforme as condições do experimento 12, que se denomina de pré-tratamento duplo.

Os resultados do pré-tratamento duplo, observados na Tabela 2, revelam-se eficaz para retirar extraíveis da biomassa, porém os teores de lignina e hemicelulose na biomassa aumentam. Obtendo o teor de celulose de 21%, relativamente baixo quando comparado ao experimento 14 alcalino e o 12 ácido.

Após o estudo de caracterização do material e levando em consideração os resultados obtidos, pode-se destacar o pré-tratamento alcalino, dentre os pré-tratamentos aplicados foi o que obteve a maior quantidade de celulose evidenciada, sendo maior do que o encontrado no material bruto, e que teoricamente aumentará o rendimento da conversão de celulose em açúcares fermentáveis e possivelmente em maior produtividade de etanol. Segundo Perego e Bianchi (2010) a digestibilidade enzimática da celulose na biomassa sem pré-tratamento é baixa (<20% de rendimento) por causa das suas características estruturais. Com isso para tornar a hidrólise enzimática mais eficaz, deve-se fazer algum tipo de processo de pré-tratamento para quebrar a estrutura cristalina do material lignocelulósico e remover a lignina para expor celulose e hemicelulose.

Após a análise de todos os resultados encontrados, o experimento 14 alcalino destacou-se, principalmente quanto aos teores de celulose obtidos (38,3% ± 0,2), à diminuição de gorduras no material (6,8% ± 0,0), à deslignificação da lignina na biomassa (38,6% ± 0,3) e da hemicelulose (16,2% ± 0,1), favorecendo a quebra do material lignocelulósico, evidenciando a seletividade do pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas na deslignificação do material lignocelulósico.

### 3.2. Hidrólise enzimática e rendimento de etanol

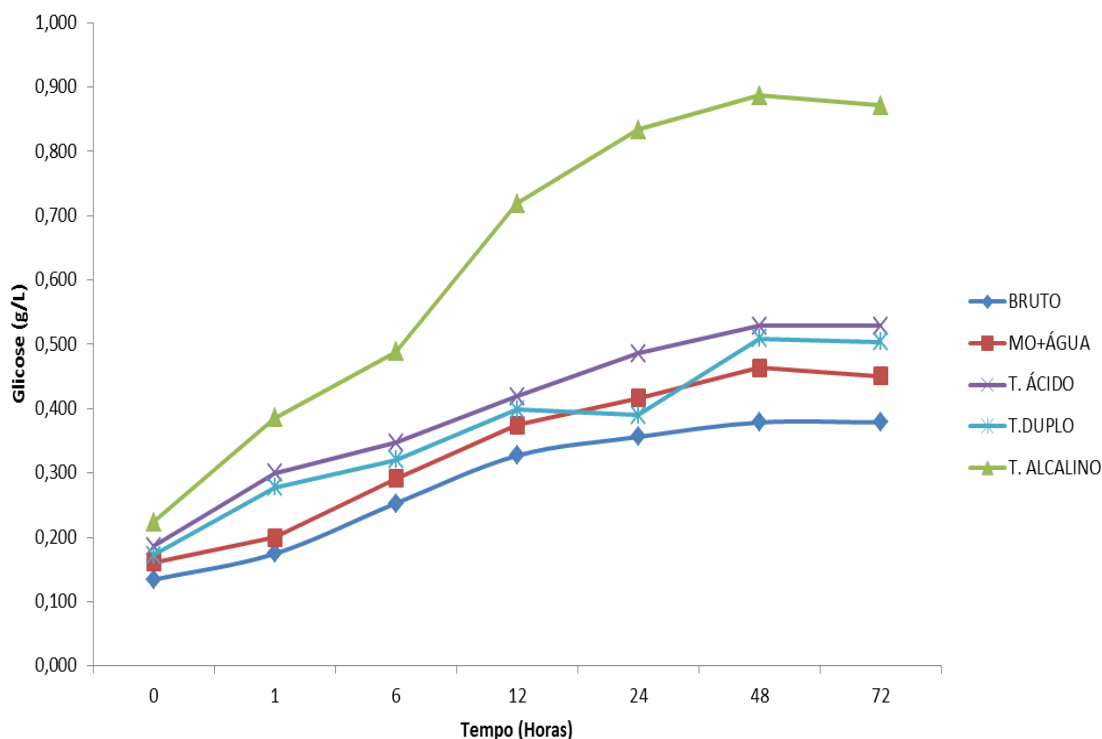
- Teores de Açúcares Redutores Totais e Atividade Enzimática da Celulase

Foi feita a curva de calibração da glicose e foi encontrada a equação glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) = 0,1488 absorvância, com o  $R^2 = 0,9949$ . Com os resultados de absorvâncias das soluções padrão, foi construído um gráfico de absorvância em função da massa de glicose e se obteve a equação usada para encontrar a massa de glicose liberada em 60 minutos.

Para a enzima celulase comercial, foi encontrada a atividade enzimática igual a  $27,5 \text{ FPU mL}^{-1}$ , a qual foi utilizada para os cálculos dos teores enzimático necessários para as etapas de hidrólise.

Para a enzima  $\beta$ -glicosidase não foi feita a determinação de FPU, pois segundo instruções do fabricante, para a mistura com a celulase basta adicionar a razão de 4% v/v em relação à celulase.

As amostras submetidas ao processo de hidrólise enzimática foram monitoradas por três dias, com coletas de amostras nos intervalos de 0,1, 6, 12, 24, 48 e 72 horas para quantificação dos teores de glicose como se observa na Figura 1.



**Figura 1:** Teores de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) produzidos pela hidrólise enzimática do bagaço da cana.

Observou-se que nas primeiras 24 horas as enzimas conseguiram obter quase o máximo de açúcares possíveis e a quantidade máxima liberada de glicose foi obtida em 48 horas, que chegou a  $0,379 \text{ g L}^{-1}$  no material bruto;  $0,464 \text{ g L}^{-1}$  no controle;  $0,509 \text{ g L}^{-1}$  no pré-tratamento duplo;  $0,529 \text{ g L}^{-1}$  no pré-tratado com ácido clorídrico;  $0,887 \text{ g L}^{-1}$  no pré-tratado com hidróxido de amônio (conforme Figura 1). Tais dados nos revelam que o pré-tratamento alcalino auxiliado pelo micro-ondas foi o mais exitoso, obtendo mais que o dobro da quantidade de açúcares presentes no material bruto, proporcionando maior liberação de carboidratos durante a hidrólise enzimática. Provavelmente, o hidróxido de amônio, sob a ação de micro-ondas, agiu sobre a fração hemicelulose das fibras do bagaço deixando-o mais acessível ao processo enzimático.

O pré-tratamento bruto obteve o menor desempenho, denotando a necessidade de um pré-tratamento para que seja potencializada e disponibilizada a celulose presente.

A menor liberação de glicose nos demais pré-tratamentos pode ser atribuído ao acesso limitado das enzimas aos polímeros de açúcar, que dependem em grande parte da alteração da estrutura da biomassa (CHEN et al., 2012).

Sendo que o pré-tratamento que revelou melhor desempenho foi o alcalino, a sua primazia em relação ao demais decorre justamente da alteração da estrutura do material.

Ressalta-se que todos os três pré-tratamentos realizados produziram níveis de glicose acima do material bruto e do controle. Estes resultados estão de acordo com a literatura revelando que o uso de substâncias químicas atua sobre as ligações internas da hemicelulose e lignina (ARAQUE et al., 2008).

Chen et al. (2012) confirma os dados citados anteriormente, no qual a produção de álcool da biomassa pré-tratada também atingiu seu ápice em 48 h, sendo que os melhores resultados referentes a glicose ( $4,2 \text{ g de glicose / 10 g da biomassa seca}$ ) e rendimentos de etanol ( $2,1 \text{ g de etanol / 10 g da biomassa seca}$ ) foram obtidos com o bagaço do sorgo tratado com amoníaco combinado com micro-ondas a  $130 \text{ °C}$  durante 1 h.

O êxito do pré-tratamento alcalino com hidróxido de amônio pode ser explicado, conforme Kim et al. (2010), pela ligação C-O-C em lignina e outras ligações éter e éster na matriz de carboidratos da lignina que são rompidas durante o tratamento. A clivagem do complexo de carbonos-lignina pode resultar na formação de poros e inchaço da biomassa, aumentando assim a área de superfície, facilitando a acessibilidade da enzima (MOSIER et al., 2005; KIM et al., 2010).

Zhu et al. (2006) relataram a produção de álcool de 3,1 g de etanol por 10 g de palha de trigo seco, utilizando o NaOH combinado com micro-ondas como pré-tratamento, evidenciando, a proficuidade do pré-tratamento alcalino.

Ao final da hidrólise enzimática foi realizado o processo de fermentação para posterior análise de etanol, cujos resultados estão descritos na Tabela 5.

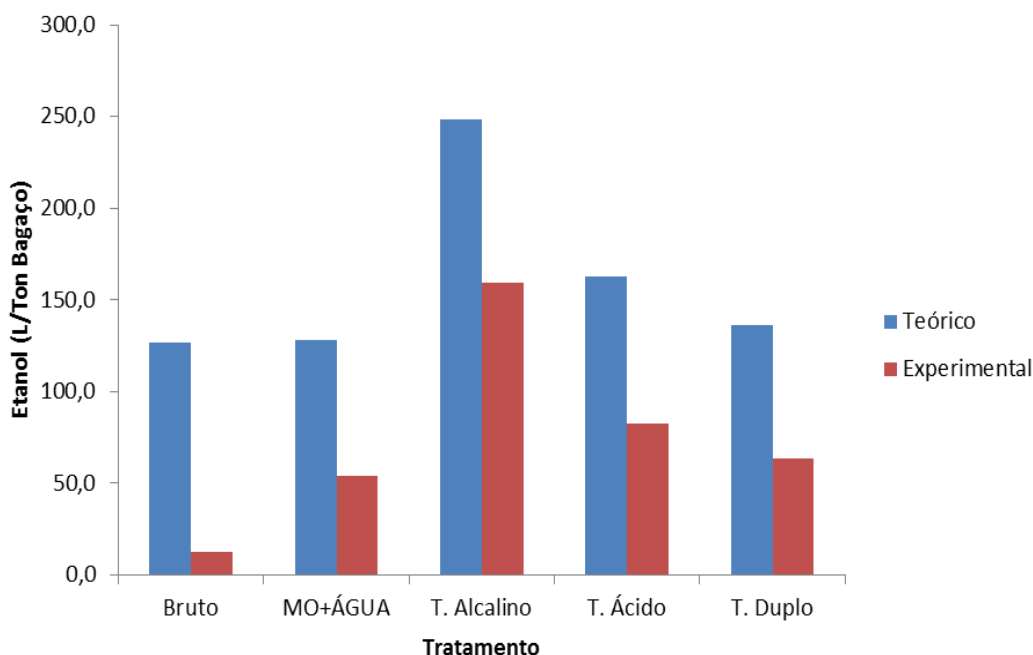
Para realizar análise do etanol, foi construído um gráfico padrão a partir de concentrações conhecidas de etanol que resultou na seguinte equação  $\text{Absorbância} = 0,0075 \times \text{Etanol (g/L)} + 0,0071$ , com o  $R^2 = 0,9962$ .

**Tabela 5:** Concentração de Etanol ( $\text{g L}^{-1}$ ) após fermentação e avaliação em relação ao teor máximo esperado.

Experimentos	Etanol (g/L)	Rendimento de etanol (%)
Bruto	0,19	9,7
Controle	0,85	42,1
T. Alcalino	2,52	64,3
T. Ácido	1,31	50,9
T. Duplo	1,00	46,6

Observa-se que a concentração de etanol produzido está diretamente relacionada com a concentração de celulose disponibilizada nos materiais, como mostrado na Tabela 2.

A partir destes dados laboratoriais realizados em pequena escala, projetou-se a produção em toneladas, no intuito de vislumbrar a viabilidade de utilização deste processo em escala industrial. Os resultados são os que seguem na Figura 2, na qual há a comparação entre o valor teórico máximo extraível em relação ao efetivamente alcançado.



**Figura 2:** Comparação entre os valores obtidos e o máximo estimado de Etanol ( $L\ ton^{-1}$  bagaço de cana-de-açúcar).

Ressalta-se que o valor máximo extraível se refere a projeção teórica e que o valor experimental do pré-tratamento alcalino apresentou excelente desempenho ao alcançar 159,5 L, permitindo acessar cerca de 64% dos açúcares contidos no bagaço de cana-de-açúcar. Isto indica o impacto do pré-tratamento alcalino associado à radiação de micro-ondas, aumentando o rendimento de etanol produzido de 9,7% para 64,3%.

Ao mesmo tempo, o uso da radiação de micro-ondas sobre o bagaço de cana-de-açúcar possibilita o acesso de cerca de 42% dos açúcares, enquanto a sua associação com solução alcalino de hidróxido de amônio eleva para 64% o rendimento de etanol produzido.

Diante de todo exposto, percebe-se que o tratamento alcalino associado com radiação de micro-ondas foi o que se destacou em todos os processos anteriores, confirmando seu êxito de rendimento na produção de etanol, corroborando com os resultados descritos na literatura.

Hu e Wen (2008) estudaram aquecimento por micro-ondas combinado com pré-tratamento alcalino em gramíneas, seguido por hidrólise enzimática e conseguiram o rendimento de açúcar de 58,7 g / 100 g de biomassa.

Zhu et al. (2005) também usou a hidrólise enzimática após o pré-tratamento alcalino da palha de arroz conjugado com micro-ondas e constatou que a maior concentração de açúcares redutores foi 34,9 g / L.

Krishnan et al. (2010) relataram melhoria no rendimento da digestibilidade da celulose e hemicelulose observados no bagaço de cana tratado quando comparado aos controles. Ao tratar o bagaço da cana com hidróxido de amônio a 4%, obteve-se o teor de 77% de celulose, resultado satisfatório quando comparado com os 35% do pré-tratado somente com água e os 18% da biomassa não tratada, após 24 horas de hidrólise a carga enzimática de 30 FPU de Spezyme CP / g de glicose e 32 CBU de Novozyme 188 / g de glicose.

O bagaço tratado com amônio atingiu  $34 \pm 1,4$  g de glicose / 100 g de biomassa seca; enquanto ao final do processo de hidrólise realizado com água tratada e biomassa não tratada, se obteve, respectivamente, apenas  $14 \pm 0,2$  g e  $0,9 \text{ g} \pm 3$  g. Neste trabalho que compara o bagaço da cana-de-açúcar não tratado e tratado, observa-se que o pré-tratamento do bagaço da cana com amônio diluído resulta em maiores rendimentos de hidrólise (0,887 g/ L) e etanol (64,3%) quando comparado aos controles 0,464 g/ L e 42,1%, respectivamente, melhorando o acesso das enzimas nos teores de celulose e hemicelulose (KRISHNAN et al., 2010).

A literatura corrobora a constatação de que o pré-tratamento com micro-ondas aprimora os resultados obtidos. Em uma pesquisa feita por Dogaris et al. (2009) o bagaço de sorgo foi tratado com água combinado com micro-ondas, sob condições diferentes de tempo e temperatura. Este experimento resultou em rendimento de 1% em açúcares redutores e o aumento de 15% na hidrólise do bagaço de sorgo. Quando comparado com o bagaço não tratado.

A superioridade do tratamento alcalino em relação ao ácido também pode ser percebida quando comparado aos outros experimentos. Geddes et al. (2010) traz que o bagaço de cana tratado por meio de explosão a vapor com ácido fosfórico, resultou na liberação de 30% de açúcares redutores.

#### **4. CONCLUSÕES**

Constatam-se que as condições ótimas, para o pré-tratamento químico combinado com micro-ondas, do bagaço da cana-de-açúcar, foi com o hidróxido de amônio a 5%, razão líquido/sólido de 50 mL, tempo e potência de radiação de micro-ondas de 60 minutos e 20%.



Este exibiu menores teores de extraíveis, lignina e principalmente de hemicelulose, alterou de forma positiva a composição química da biomassa, elevando o teor de celulose presente para 38,3%. O teor de açúcar redutor total foi de 0,887g L<sup>-1</sup> e o rendimento de etanol foi de 64,3% em relação ao conteúdo de celulose.

Por isso conclui-se que o pré-tratamento alcalino combinado com micro-ondas é a técnica mais eficiente para o bagaço da cana-de-açúcar, dentre os três processos de pré-tratamento químico associados à radiação de micro-ondas avaliados.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, G.A.; SALVI, D.A.; WALKER, M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. **Bioresource Technology**. n. 102, v. 6, p. 4444–4448, 2011.

ALVIRA, P.; PEJO, T.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzyme hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ARAQUE, E.; PARRA, C.; FREER, J.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J.; MENDONÇA, R.; BAEZA, J. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 43, p. 214–219, 2008.

BALAT M, BALAT H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**. v. 86, p. 2273–2282, 2009.

BOONMANUMSIN, P.; TREEBOOBPHA, S.; JEAMJUMNUNJA, K.; LUENGNARUEMITCHAI, A.; CHAISUWAN, T.; WONGKASEMJIT, S. Release of monomeric sugars from *Miscanthus sinensis* by microwave-assisted ammonia and phosphoric acid treatments. **Bioresource Technology**. v. 103, p. 425–431, 2012.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CHEN, W.H; LIN, B.C. Effect of microwave double absorption on hydrogen generation from methanol steam reforming. **International Journal Hydrogen Energy**. v. 35, p. 1987–1997, 2010.

CHEN, C.; BOLDOR, D.; AITA, G.; WALKER, M. Ethanol production from sorghum by a microwave-assisted dilute ammonia pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 110, p.190-197, 2012.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: cana de-açúcar, segundo levantamento. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Brasília, Disponível em:< [www.conab.gov.br/](http://www.conab.gov.br/)>. Acesso em: 01 setembro. 2014.

CORRALES, R.C.; MENDES, F.M.; PERRONE, C.C.; SANT ANNA, C.; DE SOUZA, W.; ABUD, Y., BON, E.P., FERREIRA-LEITAO, V. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of CO<sub>2</sub> and SO<sub>2</sub>. **Biotechnology Biofuels**. v. 1, n. 5, p. 36-42, 2012.

DEMIRBAS, A. Competitive liquid biofuels from biomass. **Applied Energy**. v. 88, p. 17–28, 2011.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**. v. 59, p. 257-268, 1987.

DOGARIS, I.; KARAPATI, S.; MAMMA, D.; KALOGERIS, E.; KEKOS, D. Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6543-6549, 2009.

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

HU, Z. N. e WEN, Z. Y. Enhancing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**. v. 38, p. 369-378, 2008.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**. v.74, p. 78–88, 2006.

GEDDES, C.C.; PETERSON, J.J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M.T.; SHANNUGAM, K.T.; INGRAM, L.O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 1851–1857, 2010.

GUPTA, A.; RISHI, K.; YOGENDER, P.; KUHAD, K.; RAMESH, C. Evaluation of pretreatment methods in improving the enzymatic saccharification of cellulosic materials. **Carbohydrate Polymers**. v.84, p. 1103–1109, 2011.

LI, S; XU, S; LIU, S; YANG, C; LU, Q. Fast pyrolysis of biomass in free-fall reactor for hydrogen-rich gas. **Fuel Processing Technology**. v. 85, p. 1201-1211, 2004.

LIN, L.; YAN, R.; LIU, Y.; JIANG, W. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass waste based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8271-8223, 2010.

KARP, S.G; WOICIECHOWSKI, A.L; SOCCOL, V.T; SOCCOL, C.R. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. **Braz Arch Bioresource Technology**. v. 56, p. 679–89, 2013.

KESHWANI, D. R. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Tese de Doutorado. **Universidade Estadual da Carolina do Norte**, Carolina do Norte, Estados Unidos da América – EUA, 2009.

KESHWANI, D.R.; CHENG, J.J. Microwave-based alkali pretreatment of switchgrass and coastal Bermuda grass for bioethanol production. **Biotechnology Progress**. v. 26, p. 644–652, 2009.

KIM, M.; AITA, G.; DAY, D.F. Compositional changes in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 161, p. 34–40, 2010.

KRISHNAN, C.; DA COSTA SOUSA, L.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B.; BALAN, V. Alkalibased AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology Bioengineering**. v. 107, p. 441–450, 2010.

KUHAD, K.; RAMESH, C.; GUPTA, A.; RISHI, K.; KHASA, C.; YOGENDER, P.; SINGH, A. Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8348–8354, 2010.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 48, p. 3713–3729, 2009.

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

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

NASEERUDDIN, S.; YADAV, S.K.; SATEESH, L.; MANIKYAM, A.; DESAI, S.; RAO, V.L. Selection of the best chemical pretreatment for lignocellulosic substrate *Prosopis juliflora*. **Bioresource Technology**. v. 136, p. 542–549, 2013.

PENG, H.; LI, H.; LUO, H.; XU, J. A novel combined pretreatment of ball milling and microwave irradiation for enhancing enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose. **Bioresource Technology**. v. 130, p. 81–87, 2013.

PEREGO, C.; BIANCHI, D. Biomass upgrading through acid–base catalysis. **Chemical Engineering Journal**. v. 161, p. 314–322, 2010.

ROCHA, G.J.M.; GONC, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSELL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**. v. 35, p. 274–279, 2012.

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método eletrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. In: **5 ° Congresso Nacional da STAB**, Águas de São Pedro. Anais, Piracicaba. p. 262-263, 1993.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E.S. Comparison of SHF and SSF processes from sugar cane bagasse for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**. v. 33- 4, p. 904-908, 2010.

SILVA, M. G. E.; SILVA JUNIOR, J. L.; PINTO JUNIOR, C. R. T. Produção de etanol de segunda geração: uma revisão. São João da Boa Vista, SP. **Revista Pensamento Plural**. p. 34-40, 2010.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 1621–1651, 2008.

VÁZQUEZ, M., OLIVA, M., TÉLLEZ-LUIS, S.J., RAMÍREZ, J.A., 2007. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 3053–3060, 2007.

WEI, S., KUMAR, V., BANKER, G.S. Phosphoric acid mediated depolymerization and decrystallization of cellulose: preparation of low crystallinity cellulose – a new pharmaceutical excipient. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 142, p. 175–181, 1996.

ZHAO, X.; WU, R.; LIU, D. Production of pulp, ethanol and lignin from sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid delignification. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 2874-2882, 2011.

ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z. Pretreatment by microwave alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3082–6, 2005.

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