



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E
BIOLÓGICA – PPGTQB

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-
DE-AÇÚCAR POR AUTOHIDRÓLISE, COM
ÊNFASE NA REUTILIZAÇÃO DE ÁGUA**

Felipe Brandão de Paiva Carvalho

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

Coorientador: Dr. Rossano Gambetta, D.Sc.

Brasília, fevereiro de 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE QUÍMICA – IQ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS QUÍMICA E
BIOLÓGICA – PPGTQB

PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR POR AUTOHIDRÓLISE, COM ÊNFASE NA REUTILIZAÇÃO DE ÁGUA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre.

Felipe Brandão de Paiva Carvalho

Orientador: Prof. Fabricio Machado Silva, D.Sc.

Coorientador: Dr. Rossano Gambetta, D.Sc.

Brasília, fevereiro de 2018

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **Felipe Brandão de Paiva Carvalho**, matrícula nº **16/0098459**, intitulada “*Pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por autohidrólise, com ênfase na reutilização de água*”, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 8 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Fabricio Machado Silva
Presidente de Banca (IQ/UnB)

Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum
Membro Titular (IQ/UnB)

Dra. Dasciana de Sousa Rodrigues Gambetta
Membro Titular (EMBRAPA Agroenergia)

Prof. Dr. Fábio Moreira da Silva
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 8 de fevereiro de 2018.

DEDICATÓRIA

A meu pai, em memória,
pelo exemplo que foi,
e que, a meu filho,
pretendo ser.

AGRADECIMENTOS

Por medo de me exceder e, em meu excesso, pecar por falta, opto pela concisão.

À minha família, representada nas figuras da minha mãe Márcia, pelo amor que me gerou e me acompanha desde sempre, da minha esposa Larissa, pelo amor que a mim dedica desde que a conheço, e do meu filho Noah, pelo amor com que, sem perceber, me completa.

Aos meus mestres, nas figuras do meu orientador Fabricio e do meu coorientador Rossano, por todos os ensinamentos, mas mais que isso, pela amizade e compreensão.

Aos amigos e colegas, por contribuírem para este trabalho, mesmo, em sua maioria, sem notar.

A todos que leem estas palavras, por seu tempo de dedicação para tal, na esperança de que encontre, em meio aos vocábulos aqui eternizados, aquilo que veio buscar.

RESUMO

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é etapa crucial para a viabilização da utilização dessas biomassas dentro do contexto de uma biorrefinaria, pois é responsável por, através de diferentes mecanismos, facilitar o acesso aos componentes estruturais do material, permitindo sua utilização na cadeia produtiva. O consumo de água durante os pré-tratamentos é muito elevado, trazendo diversas consequências técnicas, econômicas e ambientais em um processo industrial. O processo de autohidrólise é um pré-tratamento que, dentre outras vantagens, utiliza apenas água sob temperatura e pressão elevadas para promover o fracionamento parcial da biomassa, sem a utilização de catalisadores químicos. Neste trabalho, foi estudado o reaproveitamento de água durante o processo de autohidrólise de bagaço de cana-de-açúcar, como forma de minimizar os problemas decorrentes do uso indiscriminado desse insumo, sem, no entanto, alterar o rendimento final em glicose após a hidrólise enzimática. Foram avaliados os efeitos da temperatura e tempo de reação da autohidrólise através de um planejamento fatorial, e a melhor condição obtida (192 °C e 38 minutos) foi testada num arranjo experimental para reuso dos licores provenientes do pré-tratamento. Mesmo com o reciclo, foi possível manter o rendimento de glicose após a hidrólise enzimática em torno de 62 %. Esse resultado abre um leque de opções de estratégias de processo para, em última instância, tornar viável o aproveitamento das matérias-primas lignocelulósicas numa escala industrial.

ABSTRACT

Pre-treatment of lignocellulosic material is a crucial step to make the use of these biomasses feasible within a Biorefinery context, since it is responsible for, through different mechanisms, promote access to the structural components of the material, allowing their use in the production chain. The consumption of water during pre-treatments is very high, bringing several technical, economic and environmental consequences to an industrial process. Autohydrolysis is a pretreatment that, among other advantages, uses only water under high temperature and pressure to promote the partial fractionation of biomass, without the use of chemical catalysts. In this work, reuse of water during autohydrolysis of sugarcane bagasse was evaluated as a way of minimizing problems resulting from the indiscriminate use of this utility, without, however, reducing the final glucose yield after enzymatic hydrolysis. The effects of the temperature and reaction time of autohydrolysis were evaluated through a factorial design, and the best condition obtained (192 °C and 38 minutes) was tested in an experimental arrangement for the reuse of liquors resulting from the pre-treatment. Even with the recycle, it was possible to maintain the glucose yield after enzymatic hydrolysis at around 62%. This result opens up a range of process strategies to, ultimately, make the use of lignocellulosic feedstocks viable on an industrial scale.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
1.1.	Contextualização e aspectos principais	1
1.2.	Objetivos.....	2
1.2.1.	Objetivo geral	2
1.2.2.	Objetivos específicos	3
2.	Revisão Bibliográfica.....	4
2.1.	Matérias-primas Lignocelulósicas.....	4
2.1.1.	Bagaço de cana-de-açúcar.....	5
2.2.	Pré-tratamentos de matérias-primas lignocelulósicas	7
2.2.1.	Autohidrólise.....	10
2.2.1.1.	Principais efeitos da Autohidrólise na estrutura do material... 11	
2.3.	Consumo de água nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática	13
3.	Material e Métodos	18
3.1.	Matéria-prima.....	18
3.2.	Caracterização da Matéria-prima	18
3.2.1.	Umidade	19
3.2.2.	Cinzas.....	19
3.2.3.	Extrativos	20
3.2.4.	Carboidratos estruturais e lignina.....	21
3.2.4.1.	Lignina Solúvel.....	22
3.2.4.2.	Carboidratos estruturais.....	23
3.2.4.3.	Lignina insolúvel.....	25
3.2.4.4.	Lignina total.....	25
3.3.	Autohidrólise.....	25
3.3.1.	Prova de conceito – autohidrólise com reuso de água	25
3.3.2.	Planejamento Fatorial	27
3.3.3.	Autohidrólise com reuso de água na melhor condição obtida.....	30
3.4.	Hidrólise Enzimática	31
3.5.	Análise dos licores, sólidos após autohidrólise e fase líquida da Hidrólise Enzimática	32
3.6.	Microscopia eletrônica de varredura	33
4.	Resultados e Discussão	34
4.1.	Análise da Matéria-prima	34

4.2. Autohidrólise.....	34
4.2.1. Prova de conceito – Autohidrólise com Reuso de água.....	34
4.2.1.1. Efeitos do reuso de água nos produtos da Autohidrólise	34
4.2.1.2. Efeitos do reuso de água na Hidrólise Enzimática.....	41
4.2.1.3. Consumo de água	44
4.2.2. Planejamento Fatorial	44
4.2.3. Autohidrólise com reuso de água na melhor condição obtida.....	54
4.2.3.1. Efeitos do reuso de água nos produtos da Autohidrólise	55
4.2.3.2. Efeitos do reuso de água na Hidrólise Enzimática.....	58
4.2.3.3. Consumo de água	63
5. Conclusão	64
6. Referências Bibliográficas	66
Apêndice A - curvas de calibração para análise de cromatografia líquida.....	75
Apêndice B - perfil de aquecimento e refrigeração do reator marca Parr, modelo 5100.....	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

- AH – Autohidrólise
- ANOVA – Análise de variância
- ASE – Extrator Acelerado por Solvente
- B – Absorbância medida para o branco
- BA – Batelada alimentada
- Carbo – Porcentagem de polímero na amostra original
- $C_{\text{monômero}}$ – Concentração do monômero obtida na análise cromatográfica
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- EHT – Detector de elétrons secundários com voltagem de aceleração
- F – Fator de correção
- FEG-SEM – Microscopia eletrônica de varredura por emissão por campo
- Ffaj – Valor calculado para teste F de falta de ajuste
- Freg – Valor calculado para teste F de regressão
- Ftab – Valor tabelado para teste F
- GL – Graus de liberdade
- HMF – Hidroximetilfurfural
- HPLC – *High performance liquid chromatograph*
- M_{amostra} – Massa medida de amostra
- $M_{\text{amostra seca}}$ – Massa da amostra seca somada à massa da placa de Petri
- $M_{\text{amostra úmida}}$ – Massa da amostra úmida somada à massa da placa de Petri
- M_{cinzas} – Massa de cinzas
- $M_{\text{m, corrigida}}$ – Massa do monômero corrigida
- $M_{\text{monômero}}$ – Massa do monômero analisado
- M_{placa} – Massa da placa de Petri
- MQ – Média quadrática
- MS – Teor de matéria seca
- NREL – *National Renewable Energy Laboratory*
- R^2 – Porcentagem de variação explicada pela regressão
- R^2_{max} – Porcentagem máxima de variação explicada pela regressão
- RLS – Razão líquido:sólido
- S.A. – Sociedade Anônima
- SQ – Soma quadrática

SSF – Sacarificação e fermentação simultâneas

Tubo_{extrativos} – Massa do tubo após extração, secagem e pesagem

Tubo_{inicial} – Massa do tubo coletor de vidro seco sem amostra

V_{amostra} – Volume de amostra

XOS – Xilooligossacarídeos

λ – Absorbância

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica, com destaque para a interação entre os componentes macromoleculares estruturais celulose, hemicelulose e lignina. Extraído de Santos et al.* _____ 5
- Figura 2 – Aplicações potenciais dos componentes macromoleculares das biomassas lignocelulósicas. Extraído de Silva, 2017.* _____ 6
- Figura 3 - representação gráfica dos experimentos de autohidrólise realizados. Flechas pretas são comuns aos dois conjuntos de bateladas (arranjos). Flechas laranjas são específicas do primeiro conjunto e as azuis representam o segundo conjunto.* _____ 27
- Figura 4 – micrografia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar in natura. Detalhe para a superfície lisa do material em (A) e para as células vegetais em (B), com a parede celulósica distinguível ao redor das mesmas.* _____ 38
- Figura 5 – micrografias eletrônicas de varredura das frações sólidas de bagaço de cana-de-açúcar tratado por autohidrólise. Números de 1 a 5 representam o número da bateladas sequenciais realizadas no segundo conjunto de experimentos descrito em 3.3.1.* _____ 39
- Figura 6 – comparação entre o primeiro e segundo conjuntos de reações de autohidrólise em termos do rendimento de glicose após a hidrólise enzimática.* _____ 43
- Figura 7 – Superfície de resposta para o modelo de segunda ordem ajustado aos dados experimentais.* 52
- Figura 8 – gráfico de superfície projetado sobre os eixos x e y.* _____ 53
- Figura 9 – rendimentos em glicose obtidos após hidrólise enzimática.* _____ 59
- Figura 10 – processo tradicional de produção de glicose, através de pré-tratamento e hidrólise enzimática, sem reaproveitamento de fluxos.* _____ 61
- Figura 11 – processo sugerido de produção de glicose, baseado no reaproveitamento dos licores na etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática em sistema de batelada alimentada.* _____ 62

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – fatores e níveis analisados no planejamento composto central.</i>	28
<i>Tabela 2 – condições experimentais codificadas em seus níveis e ordem de execução dos experimentos.</i>	29
<i>Tabela 3 – caracterização do bagaço de cana-de-açúcar (dados apresentados estão em base seca)</i>	34
<i>Tabela 4 - volume de licor reusado e água de make-up adicionados em cada batelada de autohidrólise. A numeração das amostras segue o padrão “conjunto de experimentos-número da batelada”.</i>	35
<i>Tabela 5 – Composição da matéria-prima e sólidos recuperados após autohidrólise em termos dos seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lignina)</i>	36
<i>Tabela 6 – Composição dos licores obtidos após cada batelada de autohidrólise</i>	40
<i>Tabela 7 – concentração de glicose após a hidrólise enzimática dos sólidos recuperados.</i>	42
<i>Tabela 8 – resultados do planejamento composto central.</i>	45
<i>Tabela 9 – valores componentes das matrizes X e Y utilizadas para o cálculo do modelo de primeira ordem proposto.</i>	46
<i>Tabela 10 – tabela de análise de variância para o modelo de primeira ordem ajustado pelo método dos mínimos quadrados.</i>	48
<i>Tabela 11 - valores componentes das matrizes X e Y utilizadas para o cálculo do modelo de segunda ordem proposto</i>	49
<i>Tabela 12 – tabela de análise de variância para o modelo de segunda ordem ajustado pelo método dos mínimos quadrados.</i>	51
<i>Tabela 13 – comparação entre as respostas previstas pelo modelo de segunda ordem e as respostas experimentais.</i>	54
<i>Tabela 14 - volume de licor recuperado e água de make-up adicionados em cada batelada de autohidrólise realizada na condição experimental ótima.</i>	55

Tabela 15 - Composição da matéria-prima e sólidos recuperados após as reações autohidrólise na melhor condição experimental, em termos dos seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lignina) _____ 56

Tabela 16 - Composição dos licores obtidos após cada batelada de autohidrólise realizadas na melhor condição experimental. _____ 57

Tabela 17 – concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática dos sólidos recuperados _____ 58

1. Introdução

1.1. Contextualização e aspectos principais

Existe uma crescente demanda mundial por combustíveis e produtos derivados do petróleo. No entanto, esse crescimento é acompanhado, em igual medida, pela preocupação ambiental decorrente da utilização dessas fontes fósseis, evidenciada pelo grande número de acordos internacionais que abrangem o tema, envolvendo, especialmente, potências do primeiro mundo e países emergentes.

A grande alternativa para reduzir o consumo dessas fontes fósseis sem prejudicar o crescimento econômico e, ao mesmo tempo, atingir as metas estabelecidas nos acordos mencionados, é a substituição da matriz atual por uma matriz renovável. Diversas fontes podem compor uma matriz energética renovável. Em termos energéticos, o sol (energia solar), os ventos (energia eólica) e a biomassa são alguns dos exemplos explorados.¹

A biomassa, em especial, pode ser utilizada não só para a geração de energia, mas também como base para a síntese de uma vasta gama de produtos químicos, com abordagem de processo similar a uma refinaria de petróleo, mas baseada em uma matéria-prima renovável, dando origem ao conceito de biorrefinaria, que é cada vez mais buscado.³⁵

Além da versatilidade, a biomassa apresenta uma série de vantagens perante as outras fontes citadas, como a variedade e disponibilidade existentes a nível mundial, a possibilidade de integração com cadeias produtivas locais, através da utilização de resíduos, pouca dependência de fatores ambientais e o fato de seu uso representar baixa competição com alimentação humana e animal.¹

Nesse cenário, a utilização de biomassas lignocelulósicas ganha ainda mais destaque, pois está disponível em abundância, tanto na sua forma natural (e.g. florestas, capim), com fins energéticos ou não, quanto na forma de resíduos da agroindústria (e.g. bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, engaço do dendê), o que tende a reduzir seu custo. O bagaço de cana-de-açúcar, no âmbito nacional, por possibilitar a imediata integração com as indústrias de álcool e açúcar existentes, tem grande apelo.³⁴

Para viabilizar o uso dessas matérias-primas no contexto de uma biorrefinaria, são necessários alguns processos para a transformação da biomassa em produtos ou intermediários de interesse. No que concerne à biomassa lignocelulósica,

especificamente, a primeira etapa de transformação envolve procedimentos denominados pré-tratamentos.⁶

Existe uma série de pré-tratamentos estudados e aplicados, dependendo, dentre outros fatores, do produto que se deseja alcançar. A autohidrólise é um pré-tratamento que utiliza apenas água como insumo para alcançar o fracionamento parcial da biomassa, através da aplicação de temperatura e pressão elevadas. Seu efeito imediato é a quebra da hemicelulose presente na estrutura lignocelulósica, promovendo um rearranjo da lignina e permitindo maior acesso à celulose.³³

A ausência de reagentes químicos atuando como catalisadores é a principal vantagem da autohidrólise, quando comparada a outros pré-tratamentos. O gasto energético para atingir e manter a temperatura durante o tempo reacional, no entanto, é a sua principal desvantagem.³⁵

Como regra, as reações de pré-tratamento acontecem em meio aquoso e, portanto, o consumo de água para sua realização é muito alto. Esse fato traz algumas consequências, como o aumento do volume dos efluentes e, conseqüentemente, o custo do tratamento dos mesmos, a necessidade de equipamentos maiores e mais robustos e, a principal delas, a diluição excessiva do produto de interesse, tornando cara e laboriosa a sua recuperação.^{35,37}

Algumas estratégias são pesquisadas para a redução desse consumo de água, na tentativa de reduzir os custos econômicos e ambientais e viabilizar os processos de pré-tratamento. A redução da razão líquido:sólido (RLS) e a utilização do regime de batelada alimentada durante as etapas do processo são as principais estratégias utilizadas.^{35,44}

Neste trabalho foi estudado o processo de autohidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, seguido de hidrólise enzimática, para a obtenção de um meio com alta concentração de glicose. Foi dada ênfase na redução do consumo de água através da reutilização das correntes líquidas resultantes das reações.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

O trabalho proposto tem como principal objetivo a redução do consumo de água para a obtenção de meio com alta concentração de glicose, através da reutilização das correntes líquidas residuais do processo de autohidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, seguido de hidrólise enzimática.

1.2.2. Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral proposto, os seguintes passos foram realizados:

- Provar o conceito de que é possível reutilizar as correntes líquidas sem prejudicar o rendimento final do processo, através da avaliação dos efeitos do reuso de água durante o processo de autohidrólise sobre a composição das frações sólida e líquida obtidas e sobre a etapa de hidrólise enzimática posterior.
- Encontrar a melhor condição experimental do processo de autohidrólise através de planejamento fatorial, analisando temperatura e tempo de reação como fatores.
- Reavaliar e validar o conceito de reutilização das correntes líquidas para a melhor condição experimental de autohidrólise obtida.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Matérias-primas Lignocelulósicas

Os materiais lignocelulósicos são formados essencialmente por três componentes estruturais que integram a parede celular das plantas: hemicelulose, celulose, e lignina, que formam uma matriz complexa e de difícil acesso para o ataque químico e enzimático.¹

A celulose é um homopolissacarídeo linear de β -D-glicose unidos por ligações covalentes β -D-(1 \rightarrow 4), denominadas de ligações glicosídicas. A formação da ligação glicosídica acarreta a perda de uma molécula de água para a sua formação.² A celulose está organizada sob a forma de microfibrilas, constituídas de regiões mais organizadas (cristalinas) e menos ordenadas (amorfas), formadas essencialmente pelas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.³

A hemicelulose é um heteropolímero formado por repetição de unidades de pentose (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), ácidos urônicos e grupos acetila.² A presença de cada um desses componentes, bem como sua concentração, varia entre cada material e dentro do próprio material. A hemicelulose não possui regiões cristalinas e sua macroestrutura é muito mais vulnerável ao ataque químico e biológico. Nos tecidos de plantas, normalmente, a hemicelulose está ligada à lignina.^{4,3}

A lignina é uma macromolécula não-polimérica, amorfa, formada essencialmente por componentes fenólicos derivados dos precursores monoméricos: álcool coniferil, álcool sinapil e álcool p-coumaril. A proporção de cada um desses componentes varia de espécie para espécie.⁵

A interação entre celulose, hemicelulose e lignina, com a primeira sendo envolvida e protegida pelas duas últimas, confere grande recalcitrância ao material lignocelulósico e dificulta o acesso ao polímero de glicose. A Figura 1 apresenta uma representação da interação entre esses componentes macromoleculares.

A composição das macromoléculas estruturais torna a matéria-prima muito versátil em termos de aplicações, à medida que seja possível isolar, total ou parcialmente, cada uma dessas frações. Para isso, devido à alta resistência do material, no entanto, é necessário submetê-la a uma etapa primordial de pré-tratamento.⁶

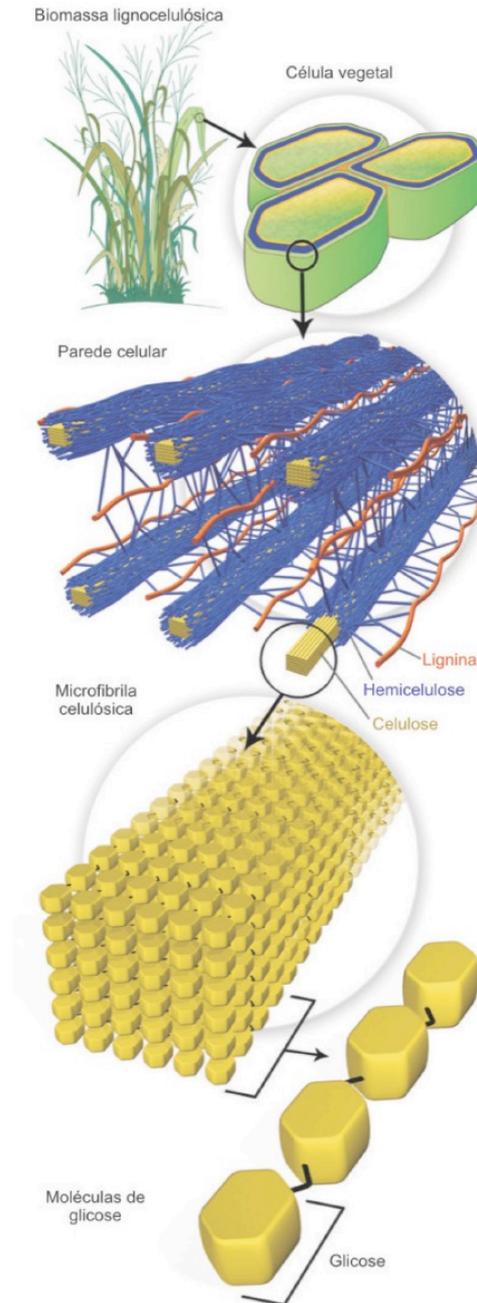


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica, com destaque para a interação entre os componentes macromoleculares estruturais celulose, hemicelulose e lignina. Extraído de Santos *et al.*⁷.

2.1.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar, quando se trata de biomassa lignocelulósica, é um dos principais materiais no cenário agroindustrial brasileiro. O bagaço é um resíduo da moagem da cana para extração do caldo, que vai ser convertido a açúcar e etanol, num mercado que deverá atingir 37,8 milhões de toneladas do primeiro e 26,45 bilhões de

litros do segundo, segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra 2017/2018.⁸

A produção de cana-de-açúcar para atingir esses números deve girar em torno de 647,6 milhões de toneladas. Como, em linhas gerais, o bagaço corresponde a um terço do peso da cana⁹, significa que para a safra em questão, aproximadamente 210 milhões de toneladas de bagaço estarão disponíveis.⁸

O bagaço de cana-de-açúcar, em relação a seus componentes macromoleculares estruturais, é composto, na média, de 33 a 36 % de celulose, 28-30% de hemicelulose e 18-20% de lignina.¹⁰ Sua composição, a exemplo das demais biomassas lignocelulósicas, proporciona uma série de aplicações potenciais para o resíduo em questão. A Figura 2 apresenta alguns exemplos de aplicação dos componentes individuais.

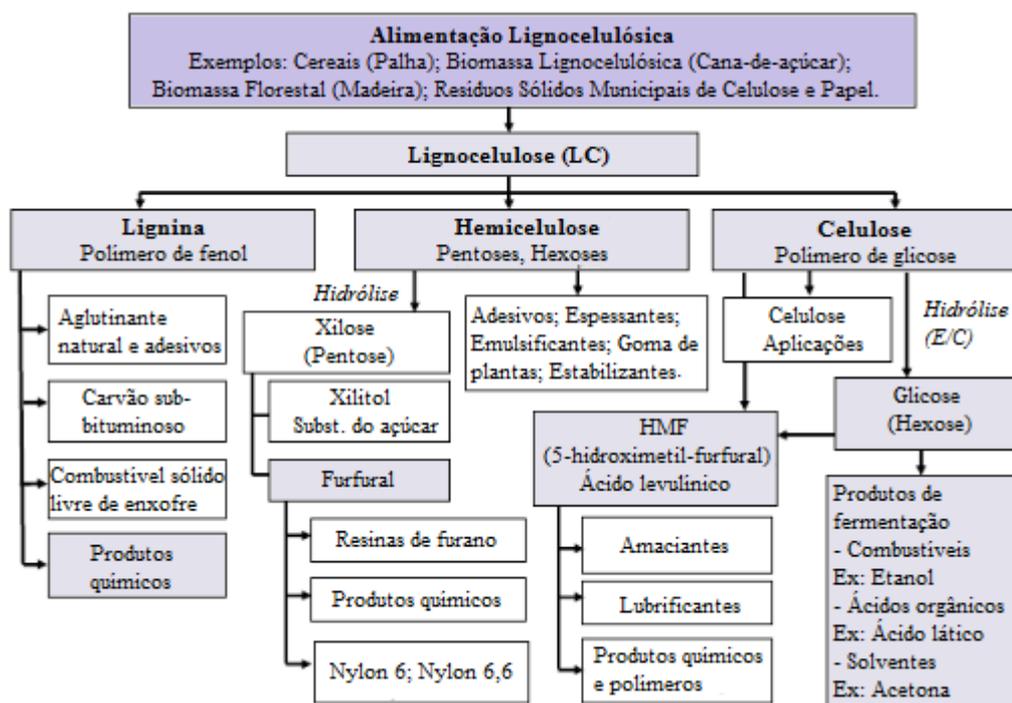


Figura 2 – Aplicações potenciais dos componentes macromoleculares das biomassas lignocelulósicas. Extraído de Silva¹¹.

A maioria das usinas de etanol e açúcar já possui caldeiras adaptadas para a queima direta do bagaço, uma forma de utilizar o resíduo para reduzir os custos, através da geração de vapor e cogeração elétrica. O que inicialmente era apenas um forma de utilizar um resíduo da produção se tornou um ativo das usinas, de modo que muitas delas se tornaram autossuficientes energeticamente e, em adição, comercializam a energia elétrica excedente para concessionárias locais.¹²

Segundo dados do Balanço Energético Nacional de 2017, 35.236 GWh de energia elétrica foram produzidos no Brasil a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Isso representa mais de 6 % de toda a eletricidade gerada no país.¹³

A utilização do bagaço para outros fins, portanto, além de requerer viabilidade técnica, requer também viabilidade econômica, de modo a compensar a retirada da sua utilização no sistema de cogeração.

2.2. Pré-tratamentos de matérias-primas lignocelulósicas

O pré-tratamento da matéria-prima é etapa chave para viabilizar tecnologias de aproveitamento das diferentes frações da biomassa celulósica, pois possui efeito direto no rendimento das etapas posteriores, além de ser um dos processos com maior custo associado.¹⁴ Um pré-tratamento ideal deve possuir baixo custo de capital e operacional, deve ser efetivo para grande variedade e alta concentração de biomassas, além de possibilitar a utilização da maior quantidade de frações possíveis do material tratado, minimizando as correntes degradadas.¹⁵

Há uma variedade de pré-tratamentos sendo pesquisados com o intuito de viabilizar a utilização dessas biomassas para diversos fins.¹⁶

Os pré-tratamentos físicos, sendo a moagem e demais métodos de cominuição os mais comuns, representam altos custos energéticos no contexto industrial, sendo sua aplicabilidade pequena.¹⁷ Muitos estudos, no entanto, tem apontado que a utilização desses processos em conjunto com outros tipos de pré-tratamento, como os químicos, pode viabilizar os custos globais, através do aumento da eficiência nesta e em outras etapas.¹⁵

Os materiais lignocelulósicos também podem ser submetidos à ação de pré-tratamentos biológicos, tipicamente sob a ação de fungos produtores de enzimas que catalisam reações que conduzem ao fracionamento da biomassa. Os tratamentos biológicos, no entanto, apresentam taxa de hidrólise muito baixa e, portanto, não são adequados, no momento, para o cenário industrial. A combinação com outros pré-tratamentos pode trazer algumas vantagens, mas o acréscimo de etapas torna a viabilização do processo mais difícil.^{18,19,15}

Os tratamentos químicos, portanto, são os mais promissores e mais estudados na busca pela escolha de um processo adequado e viável no cenário industrial.

Os pré-tratamentos ácidos são os mais comuns. O principal efeito causado na biomassa é a solubilização da fração hemicelulósica. Embora ácidos concentrados possam ser utilizados, a aplicabilidade para o tratamento de biomassas é maior para os ácidos diluídos, visto que altas concentrações favorecem a liberação de inibidores resultantes da degradação da biomassa (como furfural e hidroximetilfurfural, resultantes da degradação da xilose e glicose, respectivamente), que atrapalham os rendimentos de etapas biológicas subsequentes.¹⁸

Além disso, a utilização de ácidos, per si, traz consigo a preocupação com a corrosão de equipamentos, o que aumenta os custos de manutenção e torna a tecnologia menos atrativa para a indústria.²⁰

A abordagem mais reportada na literatura é a utilização de ácido sulfúrico diluído, embora outros ácidos (fosfórico, nítrico, etc.) tenham sido utilizados.²¹ Várias condições de temperatura, pressão e concentração de ácido são apresentadas na literatura, aplicadas aos mais diferentes tipos de biomassa, e níveis de sacarificação na faixa de 75 % chegaram a ser alcançados utilizando esse ácido.^{22,23}

Os pré-tratamentos alcalinos, que utilizam em sua maioria bases inorgânicas, sendo o hidróxido de sódio o mais comum, diferentemente do tratamento ácido, atuam na deslignificação da biomassa, aumentando a acessibilidade e reatividade dos polímeros no sólido resultante.²⁴ Em adição, esse tratamento apresenta menor solubilização da celulose e hemicelulose, quando comparado ao tratamento ácido e à autohidrólise.²⁵

O tratamento alcalino aumenta o índice de cristalinidade do sólido resultante com a retirada da lignina e substâncias amorfas. Isso aumenta a eficiência das etapas enzimáticas pois, além de proporcionar o maior acesso à celulose, reduz a quantidade existente de sítios não-produtivos com capacidade ligante para a enzima.²⁶

Os tratamentos alcalinos são mais baratos e seguros que os ácidos, mas requerem grande quantidade de água de lavagem para neutralização e preparação do material sólido para hidrólise enzimática seguinte, já que a oxidação dos componentes da lignina a outros compostos aromáticos solúveis representa grande risco de formação de inibidores.¹⁷

A explosão a vapor é um processo onde a biomassa confinada em um vaso é submetida a um rápido aumento de temperatura através da injeção de vapor de alta pressão. A mistura é mantida durante determinado período de tempo, ao fim do qual é realizada uma rápida descompressão explosiva.²⁷

Nesse processo, o tempo de contato entre o vapor e a biomassa promove a quebra da hemicelulose, através da liberação de ácido acético proveniente dos próprios

grupamentos acetil presentes na biomassa, causando quebra parcial e redistribuição da lignina no sólido resultante e aumentando a digestibilidade da celulose.²⁸

A rápida descompressão ao final do processo que acarreta a expansão térmica do material também aumenta a digestibilidade da celulose, embora esse efeito não contribua tanto quanto a mudança na estrutura da biomassa.²⁹

As principais vantagens desse processo são a não-utilização de reagentes químicos, a baixa diluição dos açúcares resultantes, já que não é um pré-tratamento em que o material fica submerso em um meio, além de apresentar baixo custo energético e ambiental.¹⁵

A principal desvantagem desse pré-tratamento é a necessidade de lavagem do material após o tratamento, visto que a condição drástica de operação pode gerar inibidores provenientes da degradação da lignina e da quebra incompleta da celulignina restante.¹⁵

O método de pré-tratamento Organosolv, como o próprio nome sugere, utiliza solventes orgânicos, puros ou em mistura, para promover o fracionamento da biomassa tratada. Metanol, etanol e acetona são somente alguns exemplos dos solventes estudados. O principal alvo desse tratamento é a remoção da lignina, para disponibilizar um resíduo celulósico com maior digestibilidade enzimática.³⁰

A grande vantagem desse pré-tratamento é a possibilidade de, através da modulação dos solvente e das condições operacionais, conseguir um tratamento mais seletivo para o fracionamento da biomassa nos seus componentes estruturais.³¹

O custo dos solventes e eventual necessidade de recuperação é uma das desvantagens desse tratamento, bem como a geração de inibidores provenientes de reações indesejadas. A utilização de solventes voláteis também acrescenta riscos na escala industrial, como explosões e incêndios causados por vazamentos, além dos riscos ocupacionais e ambientais.¹⁵

Esses são alguns exemplos dos pré-tratamentos mais comuns utilizados para preparação da biomassa lignocelulósica para as etapas biológicas subsequentes. Outros pré-tratamentos, bem como a combinação deles também aparecem em muitos estudos, embora não seja o foco deste trabalho relatá-los.

Os processos de pré-tratamento escolhidos dependem diretamente do tipo de resultado almejado, já que os diferentes mecanismos de atuação podem conduzir à geração de diferentes produtos, como mono ou oligossacarídeos, por exemplo.³²

No caso da utilização da glicose, que é o escopo deste trabalho, a viabilização da produção proveniente de uma biomassa lignocelulósica passa pelo isolamento ou aumento do acesso à fração celulósica da matéria-prima.

2.2.1. Autohidrólise

O processo de autohidrólise (AH), também conhecido como tratamento hidrotérmico ou hidrotermal, é um pré-tratamento que consiste na utilização de água submetida a condições de altas temperaturas (150-230 °C) e pressões para o fracionamento da biomassa.^{33,34}

A ausência de reagentes químicos é uma das grandes vantagens desse processo em relação a outros pré-tratamentos, à medida que não há necessidade de recuperação dos mesmos, minimizando os custos de tratamento dos resíduos e reduzindo a corrosão dos equipamentos ou a necessidade de ligas construtivas especiais, o que torna a operação, como um todo, mais simples e econômica.³³

Além disso, a utilização de pré-tratamentos com reagentes químicos, em geral, pressupõe a inclusão de pelo menos uma etapa de lavagem após os mesmos, para remoção de inibidores e ajuste de pH, o que representa mais uma vantagem para o tratamento hidrotérmico, já que, neste tratamento, a alteração do pH decorrente da liberação de ácido acético no meio reacional não é tão acentuada, dependendo da condição reacional, e a necessidade de água de lavagem, se necessária, se torna menor.³⁵

Por outro lado, o gasto energético com o processo de autohidrólise é alto, com o aquecimento do meio reacional até a temperatura de reação, mais alta, de maneira geral, do que as utilizadas em processos com catalisadores químicos, e a manutenção da mesma durante o tempo estabelecido, também mais longo, como regra, do que o de pré-tratamentos químicos.³⁶

A autohidrólise é um tratamento bem seletivo para a retirada de hemicelulose, havendo pouca degradação da celulose, característica imprescindível para a viabilização técnico-econômica do processo. Essa baixa degradação minimiza também a formação de inibidores que podem prejudicar o desempenho das etapas subsequentes.³²

A lignina, no entanto, por estar conectada originalmente à hemicelulose extraída, sofre rearranjo na macroestrutura resultante,³⁷ podendo ser parcialmente solubilizada no processo, e aumentando o tamanho de poro médio do sólido resultante obtido. Essa

característica aumenta a disponibilidade da celulose para, por exemplo, a ação enzimática na etapa seguinte de sacarificação.³⁸

2.2.1.1. Principais efeitos da Autohidrólise na estrutura do material

Sob o efeito das altas temperaturas e pressões, características do pré-tratamento por autohidrólise, as pontes de hidrogênio intermoleculares da água começam a enfraquecer, permitindo sua autoionização, conforme apresentado na equação 1, resultando em alta quantidade de íons hidrônio (H_3O^+) livres, que atuam como catalisadores na desconstrução da biomassa lignocelulósica.¹⁴



Essas condições operacionais em que o pré-tratamento é realizado favorecem a quebra dos grupamentos acetil presentes na hemicelulose, liberados no meio sob a forma de ácido acético, que reduz o pH da solução e atua como catalisador, intensificando o fracionamento da matéria-prima.^{37,32}

As condições operacionais utilizadas no pré-tratamento podem ser alteradas para o direcionamento da reação para um caminho de maior interesse, à medida que diferentes graus de severidade da autohidrólise podem resultar em diferentes efeitos sobre a matéria-prima tratada.

Em reações de autohidrólise com temperaturas inferiores a 150 °C, a extração de xilanas é insignificante,³⁴ e, conseqüentemente, a alteração estrutural da biomassa original também, motivo pelo qual a maioria dos autores considera que o pré-tratamento que efetivamente pode ser chamado de autohidrólise começa a ocorrer a partir dessa temperatura.³³

Xilooligossacarídeos (XOS) são produtos de alto valor agregado que podem ter aplicação nas indústrias química e farmacêutica.¹ Vallejos *et al.*³⁴ estudaram o efeito da temperatura, tempo e RLS no rendimento em xilose e xilooligossacarídeos no licor resultante de processo de autohidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

Nesse estudo, o objetivo era a obtenção de um xarope rico nesses componentes e, por esses motivos, condições mais brandas (até a 177 °C) foram escolhidas para o estudo, de modo a diminuir a degradação desses compostos. O rendimento final em xilanas foi analisado, sem considerar, por exemplo, a degradação de celulose ou extração da lignina.

Hongdan *et al.*³⁹, de maneira diferente, tinham por objetivo o aumento da sacarificação enzimática de bagaço de cana-de-açúcar tratado por autohidrólise, resultado similar ao objetivado nesta dissertação. Nesse caso, o rendimento máximo de glicose, que era o monômero de interesse, após a hidrólise enzimática, foi obtido para a reação realizada a 200 °C por 20 minutos. Nessa condição houve formação de grande quantidade de furfural, o que indica alta degradação de xilose.⁴⁰

A condição intermediária, de 180 °C, de 20 a 30 minutos, foi reportada diversas vezes na literatura, e apresentou resultados intermediários entre os obtidos nas faixas mais baixas e altas citadas anteriormente. Nessas condições, há grande quantidade de xilose liberada no licor pré-tratado e controlada geração de produtos de degradação. No entanto, o rendimento de glucose pós-sacarificação fica aquém do obtido em condições mais drásticas, enquanto o de xilose, devido ao início do processo de degradação, é menor do que o obtido em condições mais brandas.^{39,40,41,14}

Vargas *et al.*³⁸ trabalharam com palha de cevada na faixa de 200 a 230 °C e observaram que, com o aumento da temperatura, há o aumento da geração de oligossacarídeos liberados na fase líquida até atingir um pico, seguido de redução da concentração dos mesmos. Essa redução é devido à quebra dos oligossacarídeos nos monômeros constituintes. Na condição mais drástica, os pesquisadores observaram formação de grande quantidade de hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, que podem ter efeito inibitório nas etapas subsequentes. No entanto, os autores notaram pouca degradação da lignina e o rendimento em glucose da hidrólise enzimática teve seu melhor resultado nessa condição.

Em temperaturas acima de 230 °C, a celulose começa a se degradar significativamente em hexoses e oligossacarídeos, o que não é desejável nesta etapa, pois esses produtos solúveis misturados ao licor não são encaminhados para a sacarificação posterior.^{33,42,43}

É possível verificar um padrão muito claro em relação à composição dos produtos do pré-tratamento. Condições brandas, até 180 °C, tornam inviáveis os rendimentos enzimáticos, nos casos em que o produto desejado é a glicose, mas deixam disponíveis xilooligossacarídeos, dentre outros componentes que, não degradados, podem ser utilizados em alguma cadeia produtiva. Condições de autohidrólise mais severas, a partir de 180 °C, degradam, principalmente, os componentes hemicelulósicos da biomassa, mas tornam a celulose mais acessível para o ataque enzimático, à medida que remove parte da blindagem presente na matéria-prima.

2.3. Consumo de água nos processos de pré-tratamento e hidrólise enzimática

Independente do produto de interesse e da condição operacional utilizada para sua obtenção, a concentração final do mesmo no meio reacional deve ser a mais alta possível. Uma reação com alto rendimento, mas com baixa concentração de produto, pode se tornar inviável do ponto de vista técnico-econômico em escala industrial, já que as etapas de purificação/concentração do produto podem se tornar lentas e onerosas nessas condições, e o consumo de água posteriormente descartada excessivo.³⁷

A produção de etanol de segunda geração, buscada incessantemente para o aumento da produção de etanol e conseqüente redução no consumo de gasolina, é um exemplo desse fato, onde os açúcares presentes na biomassa sólida devem ser extraídos para uma fase líquida em alta concentração (superior a 8%), pois, para o processo ser rentável, é necessário que concentrações de etanol acima de 4% sejam atingidas.^{38,44,45}

A mesma lógica se aplica à utilização de outros compostos (*e.g.* xilooligossacarídeos, pentoses, fenólicos) extraídos dessas matérias-primas, ou da própria glicose, dentro do conceito de biorrefinarias, para a produção de outros produtos que possuam alto valor agregado.

O consumo de água durante os pré-tratamentos, como regra, no entanto, é muito alto, pois as reações ocorrem em meio aquoso, havendo necessidade de água livre para que as espécies reajam. Além de diminuir a concentração do produto final, esse fato, por si só, representa um problema no cenário industrial, à medida que maiores volumes reacionais necessitam de equipamentos maiores e mais robustos para sua manipulação (*e.g.* aquecimento, agitação, resfriamento, bombeamento),³⁵ além de gerarem maior volume de efluentes a serem tratados, encarecendo o custo total de instalação e manutenção da indústria. Além disso, o uso indiscriminado de água traz sérios impactos ambientais.³⁷

Algumas alternativas são pesquisadas buscando a minimização desse problema. A estratégia mais comum encontrada na literatura é a utilização de baixas razões líquido:sólido (RLS) durante as etapas de pré-tratamento⁴⁴ e hidrólise enzimática³⁵.

Tipicamente, as RLS utilizadas nos pré-tratamentos estão na faixa de 10 g/g.³⁴ Isso significa diluir 10 vezes a concentração final do composto de interesse. Os resultados obtidos em muitos desses estudos, apesar de altos em termos de conversão de biomassa,

apresentam baixa concentração do produto final, já que o sistema utilizado opera com concentração de sólidos muito baixa. Em consequência disso, embora à primeira vista o processo pareça estar pronto para os estudos de escalonamento, a viabilidade técnico-econômica, sob o ponto de vista industrial, está comprometida^{41,39,40,46,1,44}

No estudo realizado por Vallejos *et al.*³⁴, foi obtido um licor rico em xilanas, composto de alto conteúdo de xilooligossacarídeos (XOS), utilizando baixa RLS, da ordem de 3 g/g, durante a autohidrólise de bagaço de cana-de-açúcar. O rendimento em relação à composição da matéria-prima, no entanto, foi da ordem de 60%.

Kim *et al.*³⁶ utilizaram, em seu estudo, razão líquido:sólido de 5 g/g para um estudo comparativo entre diferentes condições de autohidrólise (temperatura e tempo de reação) e tratamento com ácido diluído. Os resultados obtidos, em termos da conversão de xilose foram muito parecidos com os obtidos por Vallejos e colaboradores, da faixa de 60% de conversão para a autohidrólise. Nesse mesmo estudo, também foi analisado o rendimento em glicose, e, para a melhor condição obtida, a 180 °C por 4 minutos, a conversão girou em torno de 50%. Gütsch *et al.*³² também conseguiram resultados similares aos demais estudos citados utilizando baixa razão líquido:sólido, de 5 g/g.

Embora a expectativa fosse que a pouca diluição dos sólidos resultasse em um meio mais concentrado em produto, os resultados encontrados evidenciam uma das dificuldades em se trabalhar com alta carga de sólidos, que é a perda de eficiência de homogeneização e transferência de massa no meio reacional, decorrente da redução da quantidade de água livre e consequente aumento da viscosidade aparente do meio.^{47,35} A baixa homogeneização do conteúdo reacional prejudica sua difusão por toda a matéria-prima, provocando a queda de rendimento observada.

Reforçando esse fato, Martins *et al.*⁴⁷ fizeram análise de três pré-tratamentos (alcalino, ácido diluído e hipoclorito-peróxido de hidrogênio) em diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar (20% a 40%) e tempo de reação, buscando obter um sólido pré-tratado rico em celulose e pobre em hemicelulose. Para os três tratamentos analisados, o melhor resultado obtido, em termos de redução da porcentagem de hemicelulose (chegando a aproximadamente 6% na melhor condição do tratamento ácido), foi alcançado com a menor concentração de sólido, onde a transferência de massa é facilitada.

Embora esse estudo não tenha abrangido o pré-tratamento por autohidrólise, a extrapolação dos resultados é válida, já que os íons hidrônio, bem com as moléculas de ácido acético extraídas da estrutura hemicelulósica, responsáveis pelas modificações

estruturais da matéria-prima, necessitam de boa difusão para que possam atingir e atuar sobre todo o material submerso.

Essas dificuldades observadas no pré-tratamento são ainda mais evidentes na etapa de sacarificação enzimática, já que a baixa quantidade de água livre e a maior dificuldade de agitação causa problemas no acesso dos catalisadores ao substrato. A presença de pouca quantidade de água favorece também a concentração dos inibidores gerados nas etapas de pré-tratamento anteriores. Além disso, o meio concentrado torna marcante a presença de inibição pelo produto, à medida que a difusão dos produtos da catálise para longe das enzimas é dificultada.^{47,35}

Uma das maneiras de contornar esses problemas é a utilização da alimentação de substratos e enzimas via batelada alimentada. Nesse sistema, a concentração inicial de sólidos é baixa, minimizando os entraves decorrentes da baixa homogeneização. À medida que novas cargas de sólido são acrescentadas, o meio já reduziu sua viscosidade aparente por conta da ação enzimática, sendo possível manter níveis satisfatórios de transferência de massa e finalizar a etapa com alta carga de sólidos adicionada a uma quantidade fixa de líquido. Além disso, a difusão facilitada dos produtos da catálise minimiza a inibição causada pelos mesmos.³⁵

Martins *et al.*⁴⁷ fizeram comparação entre os sistemas batelada e batelada alimentada (BA) para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. No primeiro sistema, em batelada, o aumento da carga de sólidos (10, 15 e 20%) resultou em maior concentração final de glucose na condição menos diluída (que chegou a atingir 78 g/L, para o sólido resultante do pré-tratamento alcalino). No entanto, a conversão de celulose em glicose foi reduzida em 12%, quando comparada com o meio menos concentrado. Esse padrão também se repetiu para os sólidos pré-tratados com ácido diluído (redução de 13% na conversão) e com hipoclorito-peróxido (redução de 20%).

O sistema em batelada alimentada, por outro lado, conseguiu minimizar os efeitos negativos da alta carga de sólidos. Nesse caso, por exemplo, a hidrólise enzimática do sólido tratado com ácido aumentou sua concentração final de 50 para 57 g/L ao aumentar a carga de sólidos de 15 para 17 %, mantendo a conversão em 53%. Comparativamente, a hidrólise em batelada a 15% rendeu 45 g/L de glicose com uma conversão inferior de 47 %.

Tomás-pejó *et al.*⁴⁸ conseguiram aumentar em 20% a concentração final de etanol produzida a partir de palha de trigo após trocar o sistema em batelada por batelada

alimentada. A maior concentração foi obtida para um conteúdo de sólido inicial de 10 % acrescidos de 4 % após 12 h, atingindo 36,2 g/L.

Buruiana *et al.*¹, trabalhando a uma RLS de 4 g/g para a hidrólise enzimática de palha de milho pré-tratada por autohidrólise, correspondendo a 25% de carga de sólidos, em sistema do tipo batelada alimentada, conseguiu obter 51,6 g/L de etanol ao final do processo, para uma conversão de 77%, que é um valor significativamente alto para o trabalho a alta carga de sólidos, segundo os próprios autores.

Vargas *et al.*³⁸ obtiveram resultados similares, chegando a 51,7 g/L trabalhando com palha de cevada autohidrolisada, para os mesmos 77% de conversão, mas com uma razão líquido:sólido de 5,7 g/g.

Nesses três últimos estudos citados, que envolvem uma etapa fermentativa, foi utilizada a estratégia de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) como forma adicional de contornar os problemas que a alta carga de sólidos traz para a hidrólise enzimática.

Nesse arranjo, enzimas e microrganismos fermentadores são colocados juntos no mesmo meio. Como o microrganismo passa a consumir os insumos imediatamente após a catálise, realizada no mesmo meio reacional, há menor chance de inibição dos catalisadores pelo produto e, conseqüentemente, é possível manter as enzimas ativas por mais tempo, sem necessidade de aumento da carga inicial de catalisador.

Essa estratégia, de associação entre batelada alimentada e sacarificação e fermentação simultâneas, também reduz outro problema associado à hidrólise enzimática realizada com altas cargas de sólidos, que é o aumento no tempo reacional decorrente da dificuldade de difusão dos catalisadores pelo meio. A utilização de batelada alimentada e sacarificação e fermentação simultâneas reduz os custos e aumenta a eficiência do processo ao descartar a necessidade de aumento da carga enzimática para compensar a lentidão da etapa.⁴⁹

Tanto no pré-tratamento quanto na hidrólise enzimática, a limitação de homogeneização pode ser reduzida com a utilização de reatores com projetos diferentes dos tradicionais tanques agitados verticais. Reatores horizontais, com agitação por tombamento, por exemplo, são exemplos já utilizados em indústrias que trabalham com produtos com alta viscosidade, que consomem menor quantidade de energia, são facilmente escalonáveis e apresentam bons resultados em sistemas com alta carga de sólidos.^{35,44,37}

A maior parte dos trabalhos presentes na literatura que buscam a redução de água nos processos de pré-tratamento e hidrólise de biomassa focam na menor adição de líquido nas etapas do processo, mas foram encontrados poucos trabalhos que propõem a reutilização de correntes líquidas residuais e, de maneira geral, as estratégias estão espalhadas entre diferentes tipos de matérias-primas e pré-tratamentos.

Larsson *et al.*⁵⁰ analisaram o efeito da recirculação da vinhaça sobre a fermentação de madeira pré-tratada. A vinhaça foi evaporada e o efeito da reutilização das duas frações (volátil e não-volátil) analisado. A fração volátil (condensado) não teve efeito negativo sobre a fermentação, enquanto a fração não-volátil apresentou efeito inibitório.

Mohagheghi e Schell⁵¹ também analisaram a recirculação da vinhaça, sem nenhum tratamento, na fermentação do hidrolisado de palha de milho suplementado com glicose. Até a carga de sólidos de 15%, o primeiro reciclo de 25% da vinhaça não causou alterações negativas significativas na fermentação. Acima dessa carga de sólidos, particularmente a 20%, a redução da conversão de etanol cai drasticamente, de aproximadamente 70% para menos de 10%. Os autores verificaram também que o acúmulo de inibidores ao longo dos reciclos reduziu drasticamente o rendimento de etanol, atingindo apenas 5% já no terceiro ciclo.

Stenberg *et al.*⁵² Também estudaram o aproveitamento da vinhaça, que, em reciclo único com até 50%, não influenciou negativamente a conversão da celulose de madeira pré-tratada em etanol. Nesse estudo, os pesquisadores também recircularam parte do caldo fermentado de volta para a hidrólise enzimática, de forma a conseguir maior concentração de etanol no caldo, reduzindo o consumo de energia na destilaria.

Os estudos encontrados utilizam correntes líquidas distantes, num fluxograma de processo, das etapas de pré-tratamento, como é o caso da vinhaça. Mesmo nesse caso, no entanto, ainda é possível perceber a influência negativa dos inibidores gerados nas etapas iniciais. Por esse motivo, não é comum a utilização de estratégias de recirculação dos licores pré-tratados em nenhuma etapa do processo global.

Nenhuma estratégia de redução da utilização de água encontrada na literatura é unanimidade e/ou rendeu resultados operacionais adequados para a escala industrial. A saída parece ser a combinação de várias estratégias que possam resultar em um processo técnica, econômica e ambientalmente viável.

3. Material e Métodos

3.1. Matéria-prima

A matéria-prima utilizada em todos os experimentos que compõem esta dissertação foi o bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente fornecido pela indústria Jalles Machado S.A, durante a safra 2016/2017.

O bagaço de cana foi seco a 50 °C em estufa com circulação forçada e renovação de ar, durante 48 horas.

Em seguida, o material foi moído em moinho de martelos com peneira de granulometria máxima de 3 mm. O bagaço de cana com essa granulometria máxima foi o utilizado em todos os experimentos de autohidrólise.

3.2. Caracterização da Matéria-prima

As análises do bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas seguindo as metodologias aprovadas pelo *National Renewable Energy Laboratory* (NREL). Algumas das metodologias foram adaptadas no Laboratório de Química de Biomassa da Embrapa Agroenergia para se adequar aos materiais e equipamentos disponíveis. Os seguintes componentes foram quantificados: umidade, cinzas, extrativos, carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e lignina.

Para todas as análises, o bagaço de cana-de-açúcar com granulometria máxima de 3 mm passou por novo processo de moagem em moinho de facas até que sua granulometria não ultrapassasse 2 mm. Os procedimentos analíticos realizados estão descritos nas seções a seguir. Para todos os métodos aplicados, a metodologia em questão exige que as amostras estejam com teor de umidade inferior a 10%, à exceção, é claro, do próprio procedimento para quantificação desse teor.⁵³

3.2.1. Umidade⁵⁴

Para a determinação do teor de umidade de cada amostra, placas de Petri de vidro foram submetidas à temperatura de 105 °C em estufa de circulação e renovação de ar durante pelo menos duas horas e/ou até que seu peso se mantivesse constante.

As placas foram retiradas e colocadas em dessecador até que sua temperatura se estabilizasse à temperatura ambiente. Em seguida, cada placa foi pesada em balança analítica e seus pesos foram registrados. A cada placa foi acrescentado cerca de 1 g de amostra, cada peso sendo registrado.

As placas com as amostras foram levadas novamente para a estufa a 105 °C e deixadas *overnight* (por pelo menos 8 horas) até que suas massas permanecessem constantes. As placas com o material seco, depois de retornadas à temperatura ambiente em dessecador, foram novamente pesadas em balança analítica e suas massas registradas.

O teor de umidade de cada amostra foi calculado utilizando-se a seguinte expressão matemática:

$$U = \left(\frac{M_{\text{amostra úmida}} - M_{\text{amostra seca}}}{M_{\text{amostra úmida}} - M_{\text{placa}}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde U representa o teor de umidade em porcentagem, M_{placa} representa a massa registrada para cada placa de Petri, $M_{\text{amostra úmida}}$ representa a massa da amostra úmida somada à da placa, o mesmo acontecendo para a massa da amostra seca. O teor de matéria seca é o complementar do teor de umidade em relação ao total de 100%.

Todas as análises de umidade realizadas durante os experimentos aqui descritos foram feitas em triplicata.

3.2.2. Cinzas⁵⁵

Para a determinação do teor de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar, cadinhos de porcelana foram acrescentados a um forno tipo mufla pré-aquecido a 575 °C por tempo não inferior a quatro horas. Decorrido esse tempo, os cadinhos foram retirados com o auxílio de uma pinça metálica e rapidamente transferidos para um dessecador, onde permaneceram até que sua temperatura entrasse em equilíbrio com a temperatura ambiente.

Assim como no procedimento para determinação do teor de umidade, os cadinhos foram pesados e cerca de 2 g de material foram adicionados a cada um deles, sendo levados, em seguida, novamente para o forno tipo mufla já frio, para iniciar o processo de calcinação para a geração das cinzas.

O forno foi aquecido a uma taxa de 5 °C por minuto até atingir 105 °C, onde permaneceu por quinze minutos, sendo novamente aquecido à mesma taxa até atingir 300 °C. Decorrida uma hora, novo processo de aquecimento à mesma taxa se encerra quando a temperatura final atinge 500 °C, patamar mantido durante mais três horas. A temperatura foi resfriada até 105 °C e mantida até o momento da retirada das amostras.

As amostras resfriadas em dessecador são então pesadas novamente.

O cálculo do teor de cinzas é realizado seguindo a seguinte expressão:

$$C = \left(\frac{M_{cinzas} - M_{cadinho}}{M_{amostra} \cdot MS} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde C corresponde à porcentagem de cinzas no material analisado, M_{cinzas} representa a massa registrada da amostra mais o cadinho após a calcinação, $M_{cadinho}$ corresponde à massa do cadinho e $M_{amostra}$ à massa medida da amostra antes da calcinação. MS, por fim, representa o teor de matéria-seca, obtido a partir do procedimento descrito em 3.2.1.

Todas as análises de teor de cinza realizadas durante os experimentos aqui descritos foram feitas em triplicata.

3.2.3. Extrativos⁵⁶

São denominados extrativos os materiais não estruturais solúveis presentes na biomassa. A remoção e quantificação dos extrativos presentes na matéria-prima foi realizada através de um Extrator Acelerado por Solvente (modelo ASE 350, marca Dionex)

De 5 a 20 g de cada amostra foram inseridas em celas de aço inox previamente pesadas em balança semi-analítica, e sua massa foi registrada. Tubos coletores de vidro, próprios para o equipamento, foram secos em estufa com circulação e renovação de ar e, após resfriamento em dessecador, suas massas também quantificadas e registradas.

Para a retirada dos extrativos do bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados dois processos de extração distintos, com dois solventes diferentes: água deionizada e etanol 95%. As celas com o material pesado, bem como os solventes e os tubos coletores, foram colocados no local apropriado do equipamento para início do procedimento.

A extração aquosa foi realizada a 100 °C em três ciclos de sete minutos, e os extratos foram armazenados automaticamente nos tubos coletores de vidro. De maneira semelhante, a extração etanólica foi realizada em três ciclos de sete minutos, a 100 °C, e os extratos coletados.

As amostras sólidas, livres de extrativos, foram retiradas das celas e dispostas em bandejas para secagem à temperatura ambiente, por pelo menos 24 h.

Os tubos coletores de vidro contendo os extratos foram rotaevaporados e levados para estufa a 45 °C durante 48 h e/ou até que apresentassem massa constante. Decorrido esse tempo, os tubos foram pesados e o teor de extrativos, aquosos e etanólicos, foram determinados através da equação 4.

$$\% \text{ extrativos} = \left(\frac{\text{Tubo}_{\text{extrativos}} - \text{Tubo}_{\text{inicial}}}{\text{Massa}_{\text{amostra}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde $\text{Tubo}_{\text{inicial}}$ representa a massa do tubo coletor de vidro seco sem amostra e $\text{Tubo}_{\text{extrativos}}$ representa a massa do tubo após extração, secagem e pesagem. O percentual é calculado separadamente para as extrações aquosa e etanólica. A porcentagem total de extrativos na biomassa foi determinada somando-se os valores obtidos para as duas extrações.

Para converter os resultados obtidos em base úmida para base seca, basta multiplicar o resultado por 100 e dividir pela porcentagem de matéria seca (MS).

Todas as análises de teor de extrativos foram realizadas em triplicata.

3.2.4. Carboidratos estruturais e lignina⁵⁷

As amostras de bagaço de cana-de-açúcar resultantes da remoção dos extrativos foram submetidas à análise de umidade descrita em 3.2.1 e os valores obtidos registrados.

A análise realizada consiste em uma hidrólise com ácido forte concentrado para a quebra total dos carboidratos a seus componentes monoméricos. Uma parte da lignina (aqui denominada lignina solúvel) é solubilizada durante a hidrólise ácida, enquanto o sólido resultante é composto da aqui denominada lignina insolúvel e das cinzas. Todos

os componentes são quantificados e, considerando-se os valores do teor de umidade e de extrativos obtidos, é feito o fechamento da composição em massa seca do bagaço.

Para a hidrólise ácida, foram pesados 0,30 g de cada amostra a ser analisada, com umidade inferior a 10 %. As amostras foram transferidas para tubos de pressão de vidro e os tubos foram colocados em um banho termostático já estabilizado na temperatura de 30 °C. A cada tubo foram acrescentados 3 mL de ácido sulfúrico 72% (m/m) e, com o auxílio de bastões de vidro, o conteúdo dos tubos foi agitado moderadamente a cada 10 minutos, para garantir o contato do ácido com todo material em seu interior, sem retirá-los do banho termostático.

Após 60 minutos, os tubos foram retirados da água e 84 mL de água deionizada foram acrescentados a cada um deles, agitando-os vigorosamente após fechamento dos mesmos.

Em seguida, os tubos de pressão foram levados para autoclave, onde permaneceram por mais 60 minutos à temperatura de 121 °C e pressão de 1 atm. Retirados da autoclave, os tubos foram resfriados em água fria até a temperatura ambiente.

Com o auxílio de bomba à vácuo e kitassato, o conteúdo dos tubos foi filtrado em cadinhos quantitativos de Gooch (porosidade nº 4), previamente secos (à 105 °C até massa constante) e pesados. As frações sólidas e líquidas coletadas foram analisadas para a quantificação dos carboidratos e das ligninas solúvel e insolúvel.

3.2.4.1. Lignina Solúvel

Uma parte do líquido filtrado, contendo tanto os monômeros de carboidrato quanto a lignina solúvel, foi submetido à análise espectrofotométrica de UV-visível para a quantificação dessa última. O equipamento utilizado para a análise, da marca SHIMADZU, modelo UV 1800, foi ajustado para o comprimento de onda de 240 nm, que é o comprimento de onda em que a luz é absorvida pela macromolécula em questão.

Uma solução de 4% de ácido sulfúrico (mesma concentração obtida durante a hidrólise ácida, após acrescentar 84 mL de água deionizada à solução de 72% de ácido), foi utilizada como branco e, para que as leituras se mantivessem dentro da faixa de linearidade do método, que compreende as medidas de absorbância entre 0,7 e 1,0, essa solução também foi utilizada para diluição das amostras. Os volumes de amostra e de solução de ácido utilizados em cada leitura, bem como as absorbâncias obtidas foram registrados.

Para o cálculo do teor de lignina solúvel, percentualmente em relação à massa seca de matéria-prima, foi aplicada a seguinte equação:

$$LS = \left(\frac{(\lambda - B) \cdot 0,087 \cdot (V_{amostra} + V_B)}{25 \cdot M_{amostra}} \right) \cdot \left(\frac{1}{MS} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde LS é a porcentagem de lignina solúvel presente na amostra (base seca), λ é a absorbância da amostra medida no espectrofotômetro, B é a absorbância medida para o branco, 0,087 corresponde ao volume em litros da solução durante a hidrólise ácida, $V_{amostra}$ representa o volume de amostra adicionado para a leitura, V_B o volume da solução de ácido 4%, $M_{amostra}$ é a massa inicial da amostra que entra no tubo de pressão para a hidrólise ácida (~0,3 g) e MS o teor de matéria seca do material. A constante com valor igual a 25 corresponde à absorvidade do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2.4.2. Carboidratos estruturais

Outra alíquota do líquido filtrado foi utilizada para a determinação dos carboidratos estruturais presentes no material analisado.

Para tanto, o líquido, que possuía pH baixo em função da solução ácida utilizada, foi neutralizado com a adição de carbonato de cálcio seguida de centrifugação para a precipitação do sólido formado. O sobrenadante foi filtrado em filtro para seringa de 0,22 μm de tamanho de poro e o líquido filtrado acrescentado a *vials* apropriados para a quantificação dos monômeros de carboidratos por cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *high performance liquid chromatograph*).

O equipamento utilizado foi um HPLC da marca SHIMADZU, modelo Prominence LC-20AD, equipado com detector do tipo RID (índice de refração). As amostras foram injetadas e eluídas através de uma coluna Aminex HPX-87H, utilizando ácido sulfúrico 0,005 M como fase móvel a um fluxo de 0,6 mL/min, de acordo com o protocolo estabelecido para açúcares pelo Laboratório de Química de Biomassa da Embrapa Agroenergia.

Curvas de calibração foram elaboradas para cada componente monomérico a ser quantificado, quais sejam: xilose e arabinose (monômeros constituintes da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar), além da glicose, que é o monômero único constituinte da

celulose. As curvas de calibração para os componentes analisados podem ser verificadas no Apêndice A.

O resultado da análise por cromatografia é a concentração de cada monômero existente no líquido analisado. Para correlacionar o resultado encontrado com a quantidade dos polímeros hemicelulose e celulose presentes na amostra original é preciso, primeiramente, obter a massa de cada componente monomérico presente no volume total de líquido adicionado à hidrólise ácida da amostra (0,087 L):

$$M_{monômero} = C_{monômero} \cdot 0,087 \quad \text{Equação 6}$$

Onde $M_{monômero}$ é a massa do monômero analisado e $C_{monômero}$ é a concentração do monômero obtida na análise cromatográfica. Caso tenha sido feita diluição da amostra antes da injeção no HPLC, é preciso multiplicar a concentração obtida pelo fator de diluição.

Como o processo de polimerização dos carboidratos em questão é uma reação de desidratação, é preciso corrigir a massa total dos monômeros em relação à massa dos polímeros. Para isso, foram utilizados os fatores de correção apresentados no método: 0,90 (162/180) para o monômero glicose e 0,88 (132/150) para a xilose e arabinose.

$$M_{m,corrigida} = M_{monômero} \cdot F \quad \text{Equação 7}$$

Onde $M_{m,corrigida}$ é a massa do monômero corrigida e F o fator de correção correspondente.

A porcentagem correspondente aos carboidratos estruturais em relação à massa seca da matéria-prima analisada, portanto, é calculada a partir da equação 8 abaixo.

$$Carbo = \left(\frac{M_{m,corrigida}}{M_{amostra}} \right) \cdot \left(\frac{1}{MS} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde “Carbo” corresponde à porcentagem de cada polímero na amostra original. Para o caso da Celulose, é utilizada no cálculo apenas a massa de glicose obtida na análise cromatográfica. Para a hemicelulose, são utilizadas as massas somadas dos demais monômeros quantificados.

3.2.4.3. Lignina insolúvel

O sólido resultante do processo de filtração no cadinho de Gooch contém tanto a lignina insolúvel quanto cinzas. Para a quantificação da primeira, o cadinho contendo o sólido filtrado foi levado para estufa com circulação e renovação de ar, estabilizada a 105 °C, para a realização do processo de determinação de umidade descrito em 3.2.1.

Após estabilização, resfriamento em dessecador, pesagem e registro das massas obtidas de cadinho e sólido seco somados, o cadinho com o sólido foi levado para o forno Mufla, para a realização da análise de cinzas descrita em 3.2.2.

A massa de cinzas é o peso final do sólido calcinado descontado do peso do cadinho, enquanto a massa de lignina insolúvel em base seca é a diferença das massas do sólido seco em estufa e calcinado na Mufla, descontado o peso do cadinho em ambos os casos.

Para a obtenção do valor percentual de lignina insolúvel, é feita a razão entre a massa obtida e a massa inicial de amostra (ambos em base seca).

3.2.4.4. Lignina total

A lignina total, percentualmente em relação à massa de matéria-prima em base seca, é obtida através das somas dos valores de lignina insolúvel e solúvel obtidos em 3.2.4.1 e 3.2.4.3.

3.3. Autohidrólise

3.3.1. Prova de conceito – autohidrólise com reuso de água

A primeira etapa deste trabalho de mestrado foi a realização de um experimento denominado de prova de conceito. O objetivo desse experimento foi analisar os efeitos que o reuso de água durante a autohidrólise poderia causar nos produtos da reação, na etapa subsequente de hidrólise enzimática e no consumo de água do processo global. A meta a ser alcançada era a redução do consumo de água sem afetar o rendimento de açúcares ao final da etapa enzimática.

Todos os processos de autohidrólise desta etapa foram realizados em reator Büchi de 5 litros de volume interno (marca Büchi, modelo “Kiloclave Type 4”), encamisado, utilizando uma razão líquido:sólido (RLS) de 10g de água/g de biomassa seca.

Foram pesados 350 g de bagaço de cana-de-açúcar em balança semi-analítica, aos quais foram acrescentados 3,5 L de água de torneira e a mistura foi homogeneizada, até que toda a biomassa estivesse embebida em água.

A mistura foi transferida para o reator e o vaso aquecido até que atingisse a temperatura de 180 °C, patamar que foi mantido por 40 minutos. Decorrido o tempo de reação, o meio foi resfriado através da recirculação do fluido pela camisa do reator.

Todo o conteúdo do reator foi coletado e as frações sólida e líquida foram separadas através de etapa única de filtração. Como membrana de filtração, foi utilizado um pano tipo Perfex®. Tanto sólido quanto líquido foram pesados e a quantidade de líquido após a autohidrólise, que aqui será denominado de licor, foi quantificada em uma proveta.

Foram realizados dois conjuntos de experimentos. No primeiro conjunto, a água de *make-up*, que é a água nova a ser acrescentada ao licor recuperado de modo que o volume final atinja os 3,5 L necessários para o início de outra batelada, foi acrescentada diretamente ao licor. A essa mistura de licor e água foram então acrescentados os 350 g de bagaço de cana e uma nova batelada foi iniciada.

Esse processo foi repetido por mais três vezes, resultando em um conjunto de 5 bateladas de autohidrólise. As frações sólidas obtidas nesse conjunto de reações foram diretamente congeladas para as hidrólises enzimáticas que seriam realizadas no futuro.

A Figura 3 representa esquematicamente os dois conjuntos de experimentos. A única diferença entre o primeiro e o segundo conjunto de bateladas de autohidrólise é que, neste último, antes do volume de água de *make-up* necessário ser acrescentado ao licor recuperado, ele foi utilizado para lavar o sólido filtrado três vezes, da seguinte maneira: a água foi acrescentada ao sólido em um recipiente com volume adequado, a mistura foi homogeneizada com o auxílio de um bastão e separada novamente por filtração.

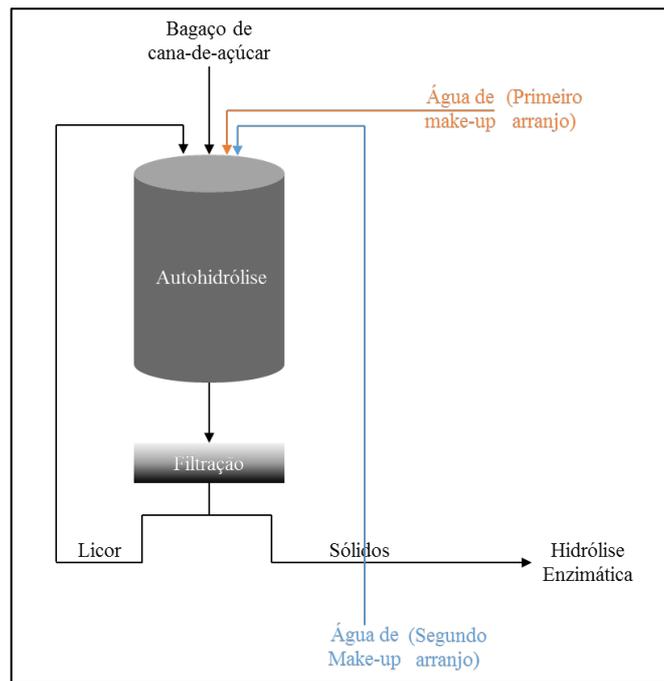


Figura 3 – Representação gráfica dos experimentos de autohidrólise realizados. Flechas pretas são comuns aos dois conjuntos de bateladas (arranjos). Flechas laranjas são específicas do primeiro conjunto e as azuis representam o segundo conjunto.

Nos dois conjuntos de reações, pequenas frações dos sólidos e dos licores foram extraídas para caracterizações futuras. As frações sólidas a serem caracterizadas foram lavadas com água até que o líquido resultante da lavagem apresentasse pH neutro (aproximadamente 8).

3.3.2. Planejamento Fatorial

Após analisados os resultados obtidos para o conjunto de experimentos denominado prova de conceito, foi montado um planejamento fatorial do tipo composto central para o estudo de dois fatores (temperatura e tempo de reação de autohidrólise), com 4 pontos estrela ($\alpha = \sqrt{2}$), que permitem avaliar o ajuste de modelos de ordens superiores à primeira, e três repetições no ponto central, essas últimas para a estimativa do erro experimental e avaliação de não-linearidades, totalizando 11 experimentos. A Tabela 1 apresenta as informações compiladas do planejamento realizado. Embora a razão líquido:sólido seja uma das principais variáveis que podem ser alteradas para a redução do consumo de água no pré-tratamento, devido às limitações dos equipamentos disponíveis para utilização neste trabalho, não foi possível selecioná-la como um dos fatores.

Tabela 1 – Fatores e níveis analisados no planejamento composto central.

Fatores \ Níveis	-α	-1	0	+1	+α
1: Temperatura (°C)	172 \pm 1	180 \pm 1	200 \pm 1	220 \pm 1	228 \pm 1
2: Tempo (min)	12	20	40	60	68

Os níveis – e + foram estabelecidos com base nas informações obtidas na revisão bibliográfica, enquanto os pontos axiais foram calculados por extrapolação linear, como explicitado nas equações 7 e 8.

$$\frac{-\sqrt{2}-(-1)}{x-180} = \frac{-1-0}{180-200} \therefore \frac{-0,41}{x-180} = \frac{-1}{-20} \therefore 8,2 = -x + 180 \quad \text{Equação 9}$$

Os valores obtidos para os níveis $-\alpha$ e $+\alpha$ do fator Temperatura foram 172 °C (resultado da equação 9) e 228 °C (por simetria em relação ao ponto central, para a manutenção da ortogonalidade do sistema), respectivamente.

$$\frac{-\sqrt{2}-(-1)}{x-20} = \frac{-1-0}{20-40} \therefore \frac{-0,41}{x-20} = \frac{-1}{-20} \therefore 8,2 = -x + 20 \quad \text{Equação 10}$$

De forma análoga ao cálculo realizado para a Temperatura, os valores de $-\alpha$ e $+\alpha$ obtidos para o fator Tempo foram 12 minutos e 68 minutos, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta os níveis dos dois fatores para cada experimento e a ordem de execução dos mesmos, que foi definida aleatoriamente através de um sorteio.

Diferentemente das reações realizadas no experimento denominado prova de conceito (seção 3.3.1), as bateladas do planejamento experimental foram realizadas em um reator de alta pressão da marca Parr, modelo 5100, com capacidade de 1 L.

Esse equipamento possui sistema de aquecimento elétrico através de uma manta térmica, diferentemente do reator Büchi encamisado. Com isso, foi possível atingir temperaturas maiores do que as conseguidas anteriormente e, conseqüentemente, estudar essa variável como um dos fatores do planejamento fatorial.

Tabela 2 – Condições experimentais codificadas em seus níveis e ordem de execução dos experimentos.

Ensaio	Temperatura (Fator 1)	Tempo (Fator 2)	Ordem de execução
1	-1	-1	2
2	-1	+1	7
3	+1	-1	6
4	+1	+1	3
5	0	0	1
6	0	0	4
7	0	0	5
8	- α	0	8
9	+ α	0	10
10	0	- α	9
11	0	+ α	11

Para cada batelada foram pesados 60 g de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, aos quais foram acrescentados 600 mL de água de torneira limpa pré-aquecida a 60 °C (esse pré-aquecimento foi realizado para diminuir o tempo de aquecimento até a temperatura de processo estabelecida para cada ensaio), mantendo a razão líquido:sólido (RLS) em 10 g de água/g de biomassa.

A mistura foi transferida para o reator e a agitação, realizada por dois impelidores do tipo hélice naval, foi mantida em 700 rpm durante todo o tempo em que o reator esteve fechado.

Findado o tempo de reação, a manta de aquecimento foi retirada para início do resfriamento. O resfriamento foi feito naturalmente (reator em contato com o ar ambiente) até a temperatura de 100 °C, quando o vaso foi envolvido por um recipiente com água à temperatura ambiente (~22 °C). Exemplos de rampas de aquecimento e refrigeração podem ser vistos no Apêndice B.

Todo o conteúdo do reator foi filtrado uma única vez, como descrito em 3.3.1, e as frações sólida e líquida (licor) foram congeladas.

Após a realização de todos os ensaios, os sólidos foram descongelados e submetidos ao procedimento de hidrólise enzimática descrito em 3.4. A fase líquida

recuperada após a hidrólise enzimática, bem como os licores reservados anteriormente, foram analisados seguindo o procedimento descrito em 3.5.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando a abordagem matricial, com o auxílio do software Microsoft Excel® (2013).

Embora as condições analisadas sejam referentes à reação de autohidrólise, a resposta analisada em cada um dos experimentos foi a concentração de glicose obtida após a hidrólise enzimática e a condição ótima desejada era a combinação temperatura-tempo de reação que apresentasse o maior rendimento em glicose.

3.3.3. Autohidrólise com reuso de água na melhor condição obtida

A melhor condição de autohidrólise (192 °C e 38 minutos), obtida após a realização do planejamento fatorial descrito em 3.3.2 e análise dos resultados alcançados (seção 4.2.2), foi utilizada para a realização de experimento similar ao denominado prova de conceito, descrito em 3.3.1. Nesta etapa, o protocolo-base foi o mesmo utilizado para o segundo conjunto de bateladas de autohidrólise, com algumas modificações.

O equipamento utilizado para a realização dos experimentos foi o mesmo reator Parr utilizado na execução do planejamento fatorial, descrito em 3.3.2.

Foram utilizados 60 g de bagaço de cana-de-açúcar em cada batelada e 600 mL de água de torneira. O equipamento foi aquecido a 192 °C e mantido nessa temperatura por 38 minutos. A agitação foi mantida em 700 rpm durante todo o experimento e o resfriamento do reator realizado naturalmente (apenas em contato com o ar) até a temperatura interna atingir 100 °C, quando o mesmo foi envolvido em um recipiente com água à temperatura ambiente.

O conteúdo do reator foi totalmente recolhido e filtrado em papel de filtro qualitativo, com o auxílio de uma bomba a vácuo e um conjunto de kitassato e funil de Büchner.

O volume de licor foi medido (uma alíquota retirada para posterior análise), reservado para ser utilizado na batelada seguinte de autohidrólise, e o volume de água de *make-up* necessário para completar os 600 mL da próxima reação foi misturado ao sólido, seguido de homogeneização vigorosa para lavá-lo.

Foram realizadas 3 lavagens, o líquido sendo separado do sólido com o auxílio da filtração à vácuo descrita anteriormente após cada uma delas, para ser misturado e homogeneizado novamente. O sólido lavado foi congelado e o líquido resultante das

lavagens foi misturado ao licor reservado anteriormente e o volume total acrescentado a novos 60 g de bagaço de cana para a reação seguinte.

No total, foram realizadas 5 reações sequenciais, o procedimento sendo repetido e o licor da reação anterior sendo aproveitado na reação seguinte.

A cada reação pequenas frações dos sólidos e dos licores foram extraídas para caracterizações futuras, seguindo protocolo descrito em 3.5. As frações sólidas reservadas para caracterização foram lavadas com água até que o líquido resultante da lavagem apresentasse pH neutro (aproximadamente 8).

3.4. Hidrólise Enzimática

Antes de iniciar a hidrólise enzimática, as frações sólidas vindas do processo de autohidrólise foram descongeladas completamente, até que entrassem em equilíbrio com a temperatura ambiente. Foi realizada análise de umidade em cada amostra, seguindo o protocolo descrito em 3.2.1.

O complexo enzimático comercial Cellic® CTec3 (cuja atividade enzimática medida pelo Laboratório de Processos Bioquímicos da Embrapa Agroenergia através do ensaio em papel de filtro, foi 221 FPU/mL) foi utilizado em todas as hidrólises realizadas, sob a dosagem de 10 FPU/g de substrato.

De cada amostra a ser hidrolisada, foram pesados 20 g (base seca) que foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL. A razão líquido:sólido (RLS) utilizado em todos os ensaios foi 10 mL/g de substrato. Para atingir a RLS desejada, foi acrescentado tampão Ácido Cítrico/Citrato de Sódio (0,1 M, pH 5,0) a cada um dos frascos. O cálculo da quantidade de tampão a ser adicionado foi feito através da subtração do volume de líquido já presente na amostra do volume total de líquido necessário para atingir a RLS estabelecida, conforme explicitado na equação 11.

$$T = RLS \cdot 20 - \left(\frac{20}{MS} - 20 \right) \quad \text{Equação 11}$$

Onde T representa o volume de tampão a ser adicionado em mL, 20 é a quantidade em gramas de amostra (base seca) adicionada a cada frasco e MS o teor de matéria seca obtido anteriormente.

Nesse experimento, com o material sólido resultante de todas as reações, um frasco adicional foi acrescentado ao agitador orbital. Esse frasco continha 20 g de material seco, mas foram acrescentados 4 g de cada sólido correspondente a cada uma das reações, formando uma mistura dos cinco sólidos em igual proporção (1/5). Como não havia material suficiente, não foi feita réplica desse experimento.

Os frascos cheios foram colocados em agitador orbital (marca Newlab, modelo NL-343-01) e deixados para aclimação à temperatura de 50 °C, que é a temperatura ótima do complexo enzimático supracitado, durante 2 horas.

Decorrido esse tempo, as enzimas foram acrescentadas a cada um dos frascos, com o auxílio de micropipetas, e o conjunto de frascos foi submetido a agitação orbital constante de 150 rpm por 48 h.

O cálculo da quantidade de enzima adicionada foi feito através da equação 12.

$$Enz = \frac{10.20}{221} \quad \text{Equação 12}$$

Onde “Enz” representa o volume de enzima a ser acrescentado, em mL, 10 é a dosagem estabelecida de enzima em FPU/g de substrato, 20 a quantidade de substrato adicionado em g e 221 a atividade enzimática do complexo.

Todas as hidrólises foram realizadas em duplicata, à exceção da que continha a mistura dos sólidos.

Ao término das 48 horas, foram retiradas alíquotas de cada frasco e centrifugadas a 14.000 rpm para a retirada dos sólidos. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida para elucidação do conteúdo de açúcares, conforme descrito em 3.5. As frações sólidas resultantes da hidrólise enzimática foram descartadas.

3.5. Análise dos licores, sólidos após autohidrólise e fase líquida da Hidrólise Enzimática

Conforme descrito no final da seção 3.3.1, pequenas alíquotas das frações sólidas filtrada após o pré-tratamento foram filtradas, lavadas e reservadas para caracterização.

Essas amostras foram secas em estufa com circulação e renovação de ar à temperatura ambiente (o controle de temperatura da estufa permaneceu desligado) por 96 horas. O sólido seco foi submetido a processo de moagem em moinho de facas do tipo

Wiley, com peneira de tamanho de poro 2 mm, mesmo processo preparatório descrito para o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* descrito em 3.2.

Findada a preparação do material, o sólido foi caracterizado quanto à umidade, cinzas, carboidratos estruturais e lignina, conforme os procedimentos descritos em 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.4, respectivamente. Não foi realizada a análise do teor de extrativos pois o processo de pré-tratamento utilizado retira grande parte desses extrativos, e a quantidade residual na fração sólida é desprezível.

A fração líquida provinda da hidrólise enzimática, cujo conteúdo é principalmente mono e oligossacarídeos de glicose, foi analisada por HPLC, utilizando os mesmos equipamentos e seguindo o mesmo procedimento descrito em 3.2.4.2 para a análise de carboidratos estruturais. O único oligossacarídeo quantificado via cromatografia foi a celobiose, que consiste em duas unidades de glicose.

Para a análise dos licores, que são os líquidos filtrados logo após a realização de uma batelada de autohidrólise, também foram utilizados o aparato e procedimento descrito em 3.2.4.2. No entanto, para a caracterização mais completa dos mesmos, principalmente em relação a inibidores das etapas biológicas subsequentes, foram quantificados também hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético. Para tanto, foram utilizados padrões comerciais para a elaboração das curvas de calibração.

3.6. Microscopia eletrônica de varredura

As amostras sólidas providas do segundo conjunto de experimentos descritos em 3.3.1 e o bagaço de cana-de-açúcar *in natura* foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura por emissão por campo (FEG-SEM) com detector de elétrons transmitidos em um microscópio Zeiss modelo Sigma HV.

Para observação do relevo das amostras foi utilizado o detector de elétrons secundários com voltagem de aceleração (EHT) em 3,5 kV. As amostras foram recobertas com ouro por *sputtering* utilizando o metalizador Q150T-ES (Quorum Technologies) antes das análises.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise da Matéria-prima

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos para a composição do bagaço de cana-de-açúcar (base-seca) utilizado em todos os experimentos que fazem parte desta dissertação. Conforme explicitado na seção 3.2, foram analisados umidade (não mostrada na Tabela, mas calculada em torno de 6%, atendendo aos requisitos do método, de teor inferior a 10%, e sendo utilizada para correção dos valores para base-seca), cinzas, extrativos, carboidratos estruturais e lignina. Os valores se encontram de acordo com resultados encontrados na literatura.^{58,59}

Tabela 3 – Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar (dados apresentados estão em base seca).

Amostra	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
Bagaço	21,38 ± 0,25	29,94 ± 0,50	36,01 ± 0,30	1,75 ± 0,24	4,69 ± 0,41

4.2. Autohidrólise

4.2.1. Prova de conceito – Autohidrólise com Reuso de água

4.2.1.1. Efeitos do reuso de água nos produtos da Autohidrólise

Como explicitado em 3.3.1, dois conjuntos de cinco bateladas sequenciais de autohidrólise de bagaço de cana-de-açúcar foram realizadas. Cada reação foi realizada com 350 g de bagaço de cana e o licor obtido na batelada anterior, quando existiu, foi utilizado para iniciar a batelada seguinte.

Água limpa (de torneira) foi acrescida (água de *make-up*) diretamente ao licor para manter a razão líquido:sólido fixa em 10 g de líquido/g de biomassa no primeiro conjunto de cinco reações, enquanto, no segundo conjunto, essa água de *make-up* foi utilizada primeiramente na lavagem da fração sólida obtida da batelada anterior, para depois ser acrescentada ao licor para o início da próxima reação. A Tabela 4 mostra os volumes de licor e água de *make-up* utilizados em cada batelada.

Tabela 4 – Volume de licor reusado e água de *make-up* adicionados em cada batelada de autohidrólise. A numeração das amostras segue o padrão “conjunto de experimentos-número da batelada”.

Amostra	Volume de licor (L)/pH	Volume de água de <i>make-up</i> (L)
1-1	0,00	3,50
1-2	2,80/3,27	0,70
1-3	2,80/3,09	0,70
1-4	2,85/3,14	0,65
1-5	2,85/3,09	0,65
2-1	0,00	3,50
2-2	2,80/3,39	0,70
2-3	2,80/3,30	0,70
2-4	2,80/3,17	0,70
2-5	2,85/3,14	0,65

Como é possível notar, cerca de 80% do líquido original pode ser recuperado na forma de licor a partir da segunda reação, diminuindo drasticamente o consumo de água de processo. O consumo global de água ou a economia global se manteve nos dois conjuntos de reação, apesar da diferença existente entre os mesmos.

A Tabela 5 apresenta os principais componentes estruturais do bagaço de cana-de-açúcar e das frações sólidas obtidas após cada batelada de autohidrólise dos dois conjuntos de reações.

Tabela 5 – Composição da matéria-prima e sólidos recuperados após autohidrólise em termos dos seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lignina).

Amostra	Sólido recuperado (g)	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Outros (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	-	21,38 ± 0,25	29,94 ± 0,50	36,01 ± 0,30	12,67 ± 1,05
1-1	207,98	31,79 ± 1,07	5,02 ± 1,38	59,24 ± 2,17	3,95 ± 4,62
1-2	209,00	40,25 ± 0,11	3,13 ± 0,13	55,24 ± 2,73	1,38 ± 2,97
1-3	214,51	42,21 ± 1,09	2,76 ± 0,02	51,40 ± 0,15	3,63 ± 1,26
1-4	216,01	43,01 ± 0,35	2,59 ± 0,11	50,20 ± 0,19	4,20 ± 0,65
1-5	215,40	43,98 ± 1,09	2,41 ± 0,02	51,40 ± 0,15	2,21 ± 1,26
2-1	224,24	33,89 ± 0,41	5,72 ± 0,04	56,09 ± 0,26	4,30 ± 0,71
2-2	236,78	40,26 ± 0,86	2,93 ± 0,07	51,81 ± 0,54	5,00 ± 1,47
2-3	229,74	44,02 ± 0,24	2,42 ± 0,04	49,31 ± 0,05	4,25 ± 0,33
2-4	202,66	44,49 ± 0,14	2,43 ± 0,16	48,48 ± 0,59	4,60 ± 0,89
2-5	222,44	45,73 ± 0,28	2,63 ± 0,14	49,88 ± 1,38	1,76 ± 1,80

Em uma primeira análise rápida, é possível perceber que os dois conjuntos de reações apresentaram comportamentos similares. Como esperado, dada a característica do pré-tratamento por autohidrólise, há pouca degradação da lignina e a existente resulta

em produtos insolúveis em água. As pequenas perdas que possam existir são não significativas.

O acúmulo de massa correspondente à porcentagem de lignina vai crescendo ao longo das reações dentro de um mesmo conjunto por causa da degradação dos carboidratos, resultado similar ao encontrado em estudos na literatura.³⁶

As imagens geradas na análise microscópica das amostras sólidas mostram um forte indício do aumento da concentração de lignina no material. Como é possível verificar na Figura 4A, a superfície do bagaço de cana-de-açúcar in natura é lisa e uniforme. À medida que as reações sequenciais são realizadas, o material vai adquirindo aspecto rugoso. A extração da hemicelulose causa o rearranjo da lignina, que precipita sobre a celulose remanescente. Os grânulos visíveis nas micrografias apresentadas na Figura 5 representam esse novo rearranjo da celulose e lignina.

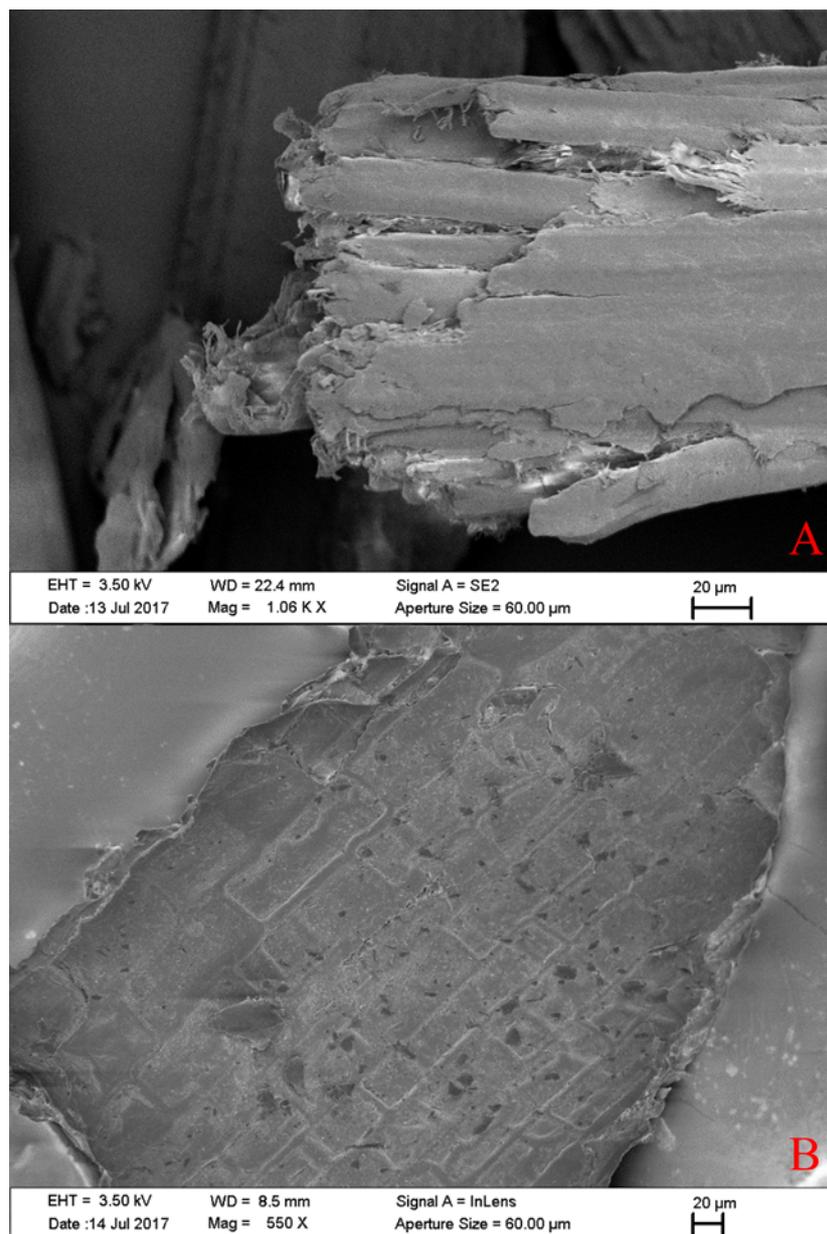


Figura 4 – Micrografia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*. Detalhe para a superfície lisa do material em (A) e para as células vegetais em (B), com a parede celulósica distinguível ao redor das mesmas.

Na imagem do sólido após a primeira reação, o material ainda conserva aspectos do bagaço *in natura*. O aumento na incidência dos precipitados de lignina nas imagens coincide com o aumento da concentração e retirada da hemicelulose apresentados na Tabela 5. O material sólido também adquire aspecto desorganizado, fruto das mudanças estruturais ocorridas após as reações de autohidrólise.

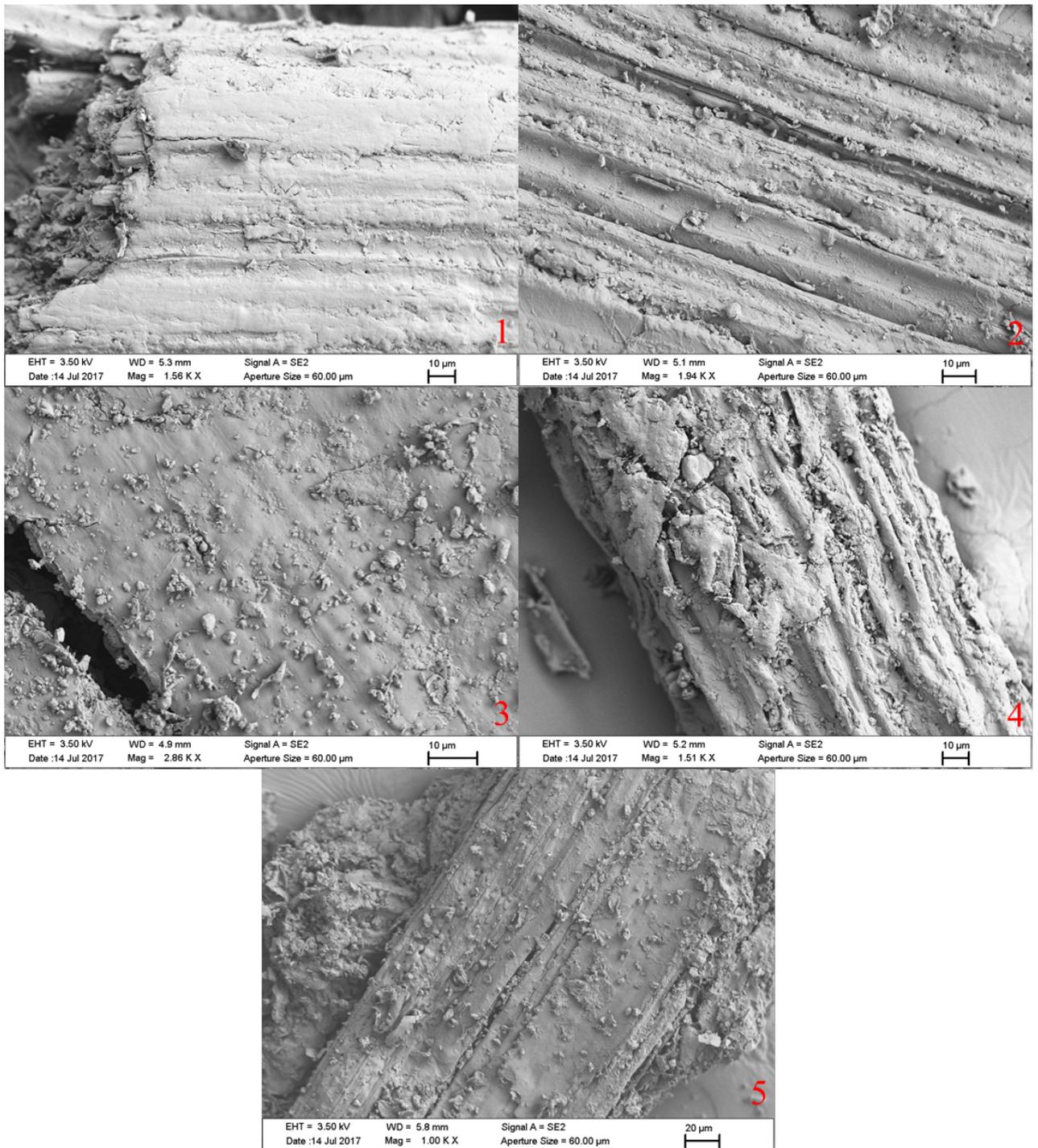


Figura 5 – Micrografias eletrônicas de varredura das frações sólidas de bagaço de cana-de-açúcar tratado por autohidrólise. Números de 1 a 5 representam o número da bateladas sequenciais realizadas no segundo conjunto de experimentos descrito em 3.3.1.

Assim que a degradação dos polímeros hemicelulose e celulose cessa ou diminui drasticamente, o conteúdo de lignina atinge um platô, claramente identificável a partir da terceira batelada de cada um dos conjuntos.

O conteúdo de hemicelulose decresce rapidamente já na primeira reação, quando comparado com o bagaço de cana *in natura*, à medida que a concentração de íons hidrônio começa a aumentar com o aumento da pressão e temperatura dentro do reator e a catalisar a reação de degradação desse polímero, o que é o primeiro e principal efeito que o processo de autohidrólise causa na biomassa.

Entretanto, embora a severidade do tratamento seja a mesma para cada batelada, os valores de hemicelulose e celulose nas frações sólidas continuam a decrescer ao longo das bateladas de um mesmo conjunto. Esse efeito pode ser facilmente explicado pelo fato que, como a água de processo, na forma de licor, tem sido reutilizada nas bateladas subsequentes, alguns componentes vão se acumulando, em especial o ácido acético (ver Tabela 6), e o meio reacional em que a autohidrólise está sendo realizada se torna muito mais agressivo para a biomassa quando comparado com a água limpa utilizada na primeira batelada.

Tabela 6 – Composição dos licores obtidos após cada batelada de autohidrólise.

Amostra	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético(g/L)	HMF* (g/L)	Furfural (g/L)
1-1	0,782	0,517	14,931	1,139	3,974	0,184	3,667
1-2	1,113	1,439	14,306	0,649	7,985	0,711	9,853
1-3	0,477	0,913	5,330	0,265	4,738	0,670	5,037
1-4	0,636	1,379	6,619	0,345	9,619	1,242	9,848
1-5	0,478	1,170	4,579	0,232	9,064	1,292	8,054
2-1	0,960	0,645	19,057	1,051	4,799	0,286	4,356
2-2	1,100	1,551	14,773	0,674	8,635	0,789	10,580
2-3	0,782	10,651	8,198	0,433	9,274	1,231	9,493
2-4	0,725	1,647	6,973	0,378	11,586	1,666	10,213
2-5	0,863	1,756	7,501	0,410	13,498	1,916	9,760

*HMF = Hidroximetilfurfural

Seguindo o padrão observado no caso da lignina, os percentuais de hemicelulose e celulose também atingem um platô após a terceira batelada, embora a concentração de ácido acético continue a aumentar no líquido reutilizado.

Esse platô sugere que o tratamento atingiu sua capacidade máxima de modificação da biomassa, especialmente no que se refere à degradação da hemicelulose. A interação entre as macromoléculas remanescentes na estrutura do sólido é tão intrincada que o aumento da severidade do meio *per se* não é suficiente para desmontar esse arranjo formado.

É possível que aumentando a severidade do tratamento através da modificação de parâmetros de processo, como temperatura e duração da reação, podem levar à formação de um platô diferente.

Antes da execução dos experimentos, a hipótese formulada era que o licor extraído e reutilizado ao longo das bateladas apresentasse acúmulo de ácido acético, vindo da degradação dos grupamentos acetato que fazem a ligação da hemicelulose à lignina, hidroximetilfurfural (HMF), embora a degradação da glicose, que é convertida a este produto, não seja desejável, e de furfural, já que a xilose extraída da hemicelulose do bagaço de cana é, inevitavelmente, convertida sob a ação da alta temperatura.

No entanto, como pode ser visto na Tabela 6, a concentração de furfural tem um aumento inicial, mas logo atinge um platô, entre as bateladas 2 e 3. A conclusão retirada desse fato é que a condição severa do meio é suficiente não somente para converter a xilose em furfural, mas também para converter este último em algum outro composto derivado não quantificado. Novas análises exploratórias são necessárias para a identificação e quantificação desses derivados.

Por outro lado, ácido acético e HMF de fato acumulam ao longo das bateladas e, pelo que é possível verificar na Tabela 6, não parecem atingir um platô. Esse é um fato interessante, já que ambas as moléculas são blocos construtoras e o HMF, especificamente, é uma molécula promissora para os indústrias e mercado de químicos, biomateriais e transportes.^{60,61}

4.2.1.2. Efeitos do reuso de água na Hidrólise Enzimática

As frações sólidas obtidas após cada autohidrólise foram hidrolisadas enzimaticamente e os ensaios foram realizados em triplicata. A hidrólise enzimática é o passo principal na conversão da celulose da biomassa em glicose, que pode então ser convertida em diferentes produtos.

A Tabela 7 mostra a concentração de glicose obtida após os ensaios de hidrólise enzimática. Diferentemente do efeito causado na composição dos sólidos, a diferença na maneira de utilização do licor reutilizado tem efeito significativo na etapa enzimática.

Tabela 7 – Concentração de glicose e rendimento após a hidrólise enzimática dos sólidos recuperados.

Amostra	Concentração de Glicose (g/L)	Rendimento (g Glicose/100 g de celulose) (%)
Bagaço de cana-de-açúcar sem pré-tratamento	10,57 ± 1,32	26,41 ± 3,31
1-1	34,05 ± 1,22	51,94 ± 1,86
1-2	28,95 ± 00,65	47,38 ± 1,06
1-3	27,65 ± 0,95	48,79 ± 1,67
1-4	25,69 ± 1,03	46,24 ± 1,85
1-5	24,43 ± 0,31	44,87 ± 0,56
2-1	33,24 ± 0,54	53,42 ± 0,86
2-2	30,79 ± 0,45	53,49 ± 0,77
2-3	27,89 ± 2,22	50,92 ± 4,05
2-4	29,04 ± 0,89	53,89 ± 1,66
2-5	31,20 ± 1,25	56,27 ± 2,25

A cada batelada realizada no primeiro conjunto de experimentos, é possível notar uma redução significativa na concentração de glicose. Essa redução é devida, principalmente, ao aumento da concentração de inibidores na fase líquida das reações de autohidrólise realizadas, notadamente ácido acético e furfural (como demonstrado anteriormente na Tabela 6).

Como os sólidos encaminhados à hidrólise enzimática nesse primeiro conjunto de reações foram somente separados do líquido por uma única etapa de filtração, ainda existe certo volume de licor impregnado no sólido (igual ao volume de água de *make-up* adicionado, mostrado na Tabela 4), contendo inibidores, que também foi encaminhado para a etapa biológica do processo.

Mantendo a economia de água, mas usando a água de *make-up* para lavar os sólidos filtrados antes de acrescentá-la ao licor recuperado, foi a alternativa encontrada para minimizar o efeito dos inibidores na hidrólise enzimática. Essa estratégia foi utilizada no segundo conjunto de experimentos e os resultados foram muito mais promissores.

Existe um pequeno decréscimo na concentração de glicose da primeira para a segunda batelada, mas, ao olhar para o rendimento da hidrólise (g de glicose/100 g de celulose), conforme mostrado na Figura 6, os valores permanecem os mesmos ao longo das reações sequenciais.

Isso mostra que o desvio da água de *make-up* para lavar os sólidos antes da hidrólise enzimática tem efeito significativo no rendimento desta última, cancelando ou reduzindo o impacto negativo causado pelos inibidores, explicitado nos resultados do primeiro conjunto de pré-tratamentos.

A Figura 6 mostra também que há uma diferença clara no comportamento da hidrólise enzimática entre o primeiro e o segundo conjuntos de reações.

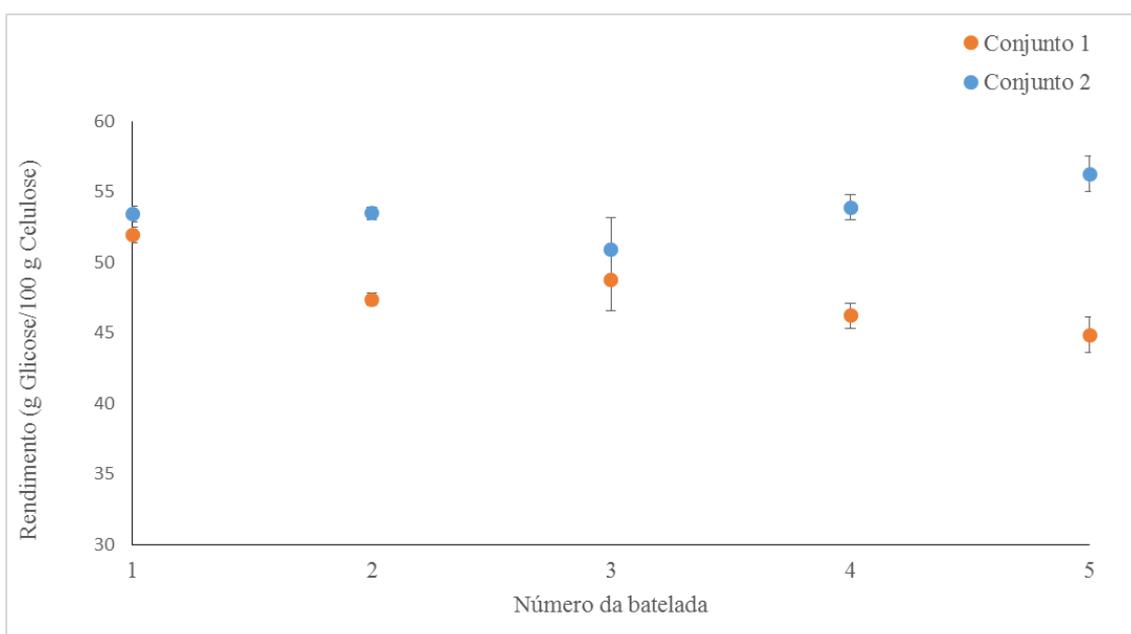


Figura 6 – Comparação entre o primeiro e segundo conjuntos de reações de autohidrólise em termos do rendimento de glicose após a hidrólise enzimática.

O fato que nenhum volume de água limpa adicional foi utilizada para lavar os sólidos antes da etapa enzimática, o que é muito comum entre estudos presentes na literatura^{62,63}, e o rendimento da hidrólise se manteve, mostra um potencial enorme para o reuso de água durante a autohidrólise, sem comprometer o rendimento global do processo.

4.2.1.3. Consumo de água

Reduzir o consumo de água em instalações industriais não é somente uma medida econômica, mas principalmente ambiental. A estratégia idealizada como conceito a ser provado nesses experimentos contribuiu para reduzir o consumo em pouco mais de 11 L de água limpa, quando comparada ao processo de autohidrólise tradicional (5 bateladas de autohidrólise independentes). Esse volume representa 64% de redução, sem reduzir, o que é o mais importante e essencial, o rendimento de glicose ao final da etapa enzimática.

Reduzir o consumo de água significa reduzir, também, o volume de efluentes gerados e os custos de manutenção de equipamentos, e, conseqüentemente, reduzir o custo total e o impacto ambiental que, na escala industrial, pode levar à viabilidade técnica e econômica buscada.

4.2.2. Planejamento Fatorial

Foi realizado um planejamento fatorial do tipo composto central, na tentativa de otimizar o processo de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar por autohidrólise (identificar as melhores condições experimentais que maximizem a concentração de glicose no meio ao final do processo de hidrólise enzimática). Foram analisados dois fatores, temperatura e tempo de reação. Os experimentos realizados estão explicitados nas Tabelas 1 e 2.

Antes de expor e analisar os resultados, é importante ressaltar alguns pontos:

- i) A variável dependente quantificada foi a concentração de glicose obtida ao final da hidrólise enzimática, apesar do planejamento fatorial e as variáveis estudadas serem referentes à reação de autohidrólise. Embora a hidrólise enzimática tenha sido realizada nas mesmas condições para todas as amostras vindas da autohidrólise, essa etapa é um novo processo, com toda a sua complexidade e suas próprias variações e, portanto, pode acrescentar nova carga de erros aos resultados finais.
- ii) O ideal, portanto, seria analisar as amostras diretas da autohidrólise, sem incluir um novo processo entre a reação estudada e a etapa analítica. No entanto, nenhuma análise seria tão precisa, do ponto de vista do resultado esperado (que é a máxima concentração de glicose), quanto a análise de glicose ao final da etapa

enzimática. As análises que poderiam ser realizadas nas amostras vindas da autohidrólise (como teor de lignina, teor de carboidratos, inibidores, etc.) não refletiriam, no entanto, a interação entre os componentes existentes na biomassa tratada e o efeito que esses componentes teriam sobre as enzimas na etapa posterior.

iii) Um material com muito conteúdo de celulose e, conseqüentemente, com ótimo potencial para liberação de glicose, portanto, pode não fornecer a maior concentração do monômero após a hidrólise devido à existência de alta carga de inibidores no mesmo meio, por exemplo.

Para ter esse quadro completo, portanto, optou-se por fazer as análises somente após a etapa biológica. Isso, no entanto, como mencionado anteriormente, adiciona nova fonte de erro e, por esse motivo, durante toda a análise estatística realizada, utilizou-se um nível de confiança de 90%, que engloba a complexidade desse sistema.

Isto posto, a concentração de glicose ao final da hidrólise enzimática referente a cada ensaio foi quantificada e os resultados estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – resultados do planejamento composto central.

Ensaio	Temperatura (Fator 1)	Tempo (Fator 2)	Concentração de glicose (g/L)
1	-	-	29,41
2	-	+	34,58
3	+	-	30,80
4	+	+	18,12
5	0	- α	30,18
6	0	α	25,34
7	- α	0	26,54
8	α	0	22,23
9	0	0	32,83
10	0	0	30,56
11	0	0	29,38

Com os resultados obtidos, foi feita uma primeira tentativa de ajuste dos dados a um modelo empírico de primeira ordem, do tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \quad \text{Equação 13}$$

Onde Y é a resposta em termos da concentração de glicose (g/L), e os índices 1 e 2 das variáveis independentes são referentes, respectivamente, aos fatores 1 (temperatura) e 2 (tempo).

Foi utilizada a abordagem matricial a realização do ajuste por mínimos quadrados. Para o cálculo da matriz dos parâmetros β , foi utilizada a Equação 14.

$$\beta = (X^T X)^{-1} (X^T Y) \quad \text{Equação 14}$$

Sendo X a matriz (11x3) de valores codificados das variáveis para cada ensaio, de acordo com a Tabela 9, e Y a matriz coluna representada pelos valores de concentração de glicose obtidos experimentalmente em cada ensaio (coluna 4 da Tabela 9).

Tabela 9 – Valores componentes das matrizes X e Y utilizadas para o cálculo do modelo de primeira ordem proposto.

Média	Temperatura (Fator 1)	Tempo (Fator 2)	Concentração de Glicose (g/L) (Y)
1	-1	-1	29,41
1	-1	+1	34,58
1	+1	-1	30,80
1	+1	+1	18,12
1	0	-1,4	30,18
1	0	+1,4	25,34
1	-1,4	0	26,54
1	+1,4	0	22,23
1	0	0	32,83
1	0	0	30,56
1	0	0	29,41

O vetor de parâmetros β do modelo representado pela Equação 13 foi::

$$\beta = [28,177 \quad - 2,664 \quad - 1,804]^T$$

Foi calculado o intervalo de confiança para cada parâmetro através da multiplicação do desvio-padrão de cada parâmetro pelo valor de t (da Tabela t de Student) para um nível de confiança de 90%. Esse valor foi escolhido, como mencionado anteriormente, tendo em vista a complexidade do sistema experimental e das reações propriamente ditas.

O desvio-padrão supracitado foi calculado pela raiz quadrado da variância de cada parâmetro. Esta, por sua vez, foi obtida através da multiplicação entre a variância dos dados experimentais (obtida através da triplicata no ponto central e, portanto, com 2 graus de liberdade) e os elementos da diagonal principal da matriz $(X^T X)^{-1}$. O vetor β' abaixo apresenta os parâmetros com seus respectivos intervalos de confiança.

$$\beta' = [28,177 \pm 1,544 \quad - 2,644 \pm 1,819 \quad - 1,804 \pm 1,819]^T$$

É possível perceber a variável 1, que se refere à temperatura, é significativa, já que seu parâmetro possui valor, em módulo, superior ao valor do seu intervalo de confiança calculado. Embora o terceiro parâmetro, β_2 , seja ligeiramente inferior ao intervalo de confiança, a diferença é muito pequena para que a variável 2 (tempo) seja considerada inerte e, portanto, esse parâmetro não foi descartado do modelo.

Foi realizada a Análise de Variância para o modelo de primeira ordem e a Tabela ANOVA está exibida na Tabela 10. O valor de R^2 encontrado, que representa a porcentagem de variação explicada pela regressão, foi muito baixo em relação ao valor máximo de variação explicada (R^2_{\max}), que é calculado retirando-se a contribuição do erro experimental. Isso aponta uma inadequação do modelo de primeira ordem aos dados experimentais.

Um teste F da razão $MQ_{\text{reg}}/MQ_{\text{res}}$ (Freg) foi realizado, comparando-se o valor obtido nessa divisão (2,223) ao valor de $F_{2,8}$ tabelado ($F_{\text{tab}}(\text{reg})$) para o nível de 90%, utilizando os graus de liberdade para a regressão e resíduos (3,113), para verificar se a regressão era significativa. A comparação dos valores, Freg sendo inferior a $F_{\text{tab}}(\text{reg})$, aponta uma regressão não significativa, confirmando a inadequação verificada anteriormente do modelo de primeira ordem para explicar o comportamento das variáveis estudadas.

Tabela 10 – Tabela de análise de variância para o modelo de primeira ordem ajustado pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Regressão (reg)	81,99501	2	40,99751
Resíduos (res)	147,5307	8	18,44134
Falta de ajuste (faj)	141,3814	6	23,56357
Erro puro/experimental (ep)	6,149267	2	3,074633
Total	229,5257	10	22,95257

R ²	0,357237
R ² max	0,973209
Freg	2,223131
Ftab(reg)	3,113118
Ffaj	7,663864
Ftab(faj)	9,32553

Foi feita então nova tentativa de modelar os dados experimentais, através de um modelo empírico de segunda ordem, de acordo com a Equação 15:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad \text{Equação 1}$$

A mesma abordagem matricial para o ajuste de mínimos quadrados foi utilizada. A matriz X agora, com o acréscimo das colunas que representam os termos de segunda ordem, é uma matriz 11x6, apresentada na Tabela 11 abaixo. A última coluna corresponde à matriz Y.

Tabela 11 – Valores componentes das matrizes X e Y utilizadas para o cálculo do modelo de segunda ordem proposto.

Média	Temperatura (Fator 1)	Tempo (Fator 2)	(Fator 1) ²	(Fator 2) ²	Fator 1. Fator 2	Concentração de Glicose (g/L) (Y)
1	-1	-1	1	1	1	29,405
1	-1	+1	1	1	-1	34,575
1	+1	-1	1	1	-1	30,8
1	+1	+1	1	1	1	18,115
1	0	-1,4	0	1,96	0	30,18
1	0	+1,4	0	1,96	0	25,34
1	-1,4	0	1,96	0	0	26,535
1	+1,4	0	1,96	0	0	22,225
1	0	0	0	0	0	32,83
1	0	0	0	0	0	30,56
1	0	0	0	0	0	29,405

De maneira análoga ao realizado para o modelo de primeira ordem, foi calculada o vetor β' dos parâmetros e seus respectivos intervalos de confiança, para um nível de confiança de 90% e 2 graus de liberdade (providos das três repetições no ponto central).

$$\beta' = [30,893 \pm 2,955 \quad - 2,644 \pm 1,819 \quad - 1,804 \pm 1,819 \quad - 2,749 \pm 2,184 \\ - 1,024 \pm 2,184 \quad 4,464 \pm 2,560]^T$$

Comparando os valores dos parâmetros obtidos com seu intervalo de confiança, é possível notar que a variável temperatura e todos as suas interações são significativas. Assim como no modelo de primeira ordem, o valor do parâmetro β_2 é ligeiramente inferior ao seu intervalo de confiança, mas não o suficiente para descartar a significância da variável tempo. O único termo que poderia ser descartado, dado que seu parâmetro apresenta valor, em módulo, notadamente inferior ao seu intervalo de confiança, é o termo quadrático do fator tempo.

É interessante notar que o maior valor em módulo e, portanto, o termo que contribui com a maior parte da resposta, é o termo de interação entre as duas variáveis (o que reforça a significância atribuída à variável tempo, dado que, se um termo de interação é significativo, então as variáveis que fazem parte da interação também devem, individualmente, serem consideradas significativas).

Se analisarmos esse fato do ponto de vista experimental, faz muito sentido que não só as duas variáveis sejam significantes, mas que a interação entre as duas seja ainda mais importante, já que o efeito da autohidrólise realizada a determinada temperatura sobre a biomassa tende a ser mais acentuado à medida que o tempo de contato é prolongado.

A equação do modelo de segunda ordem considerando somente os termos significativos, portanto, é:

$$Y = 30,893 - 2,664x_1 - 1,804x_2 - 2,749x_1^2 - 4,464x_1x_2 \quad \text{Equação 16}$$

A análise de variância para o modelo de segunda ordem está apresentada na Tabela 12. É possível perceber um aumento significativo do R^2 em relação ao modelo de primeira ordem, o que aponta que o modelo quadrático consegue explicar muito melhor os valores experimentais observados, ainda mais se considerada a complexidade do sistema reacional.

A comparação do F calculado para a regressão (Freg) com o valor tdo, dado o nível de significância considerado e o número de graus de liberdade fornecido pelos experimentos, mostra que a regressão é, de fato, significativa, já que o valor calculado é superior ao tabelado.

Foi feito ainda um segundo teste F, dessa vez para verificar a falta de ajuste do modelo em relação aos dados experimentais. Para tanto, foi calculada a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} (Ffaj) e o valor obtido, 2,147, comparado com o valor de F tabelado para a falta de ajuste (Ftab(faj)), que leva em consideração o nível de significância estabelecido de 90% e os graus de liberdade para a falta de ajuste e para o erro puro. O valor encontrado foi de 9,162, e esse valor é bem superior ao valor calculado, o que indica que o modelo proposto apresenta pouca falta de ajuste.

O valor de R^2 obtido e os resultados dos testes F realizados indicam que o modelo proposto é adequado para modelar o comportamento experimental das variáveis estudadas.

Tabela 12 – Tabela de análise de variância para o modelo de segunda ordem ajustado pelo método dos mínimos quadrados.

Fonte de Variação	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Regressão (reg)	203,5708	5	40,71416
Resíduos (res)	25,95492	5	5,190985
Falta de ajuste (faj)	19,80566	3	6,601886
Erro puro/experimental (ep)	6,149267	2	3,074633
Total	229,5257	10	22,95257

R ²	0,886919
R ² max	0,973209
Freg	7,843243
Ftab(reg)	3,452982
Ffaj	2,147211
Ftab(faj)	9,16179

Como o objetivo do planejamento é definir a condição experimental que fornece a maior concentração de glicose no meio pós-hidrólise enzimática, é importante notar que os sinais dos parâmetros, à exceção do termo independente, são todos negativos. Isso implica no fato de que o aumento da temperatura e do tempo, bem como sua interação, tem efeito negativo sobre a variável resposta, que é a concentração de glicose. Para encontrar a combinação de valores de temperatura e tempo de reação que fornecesse a melhor resposta em termos da concentração de glicose, portanto, foi necessário achar o ponto de máximo do modelo.

Para tanto, foi feita a derivada parcial da equação do mesmo em relação a x_1 (temperatura) e depois em relação a x_2 (tempo). Ambas as derivadas foram igualadas a zero, resultando em um sistema de duas equações e duas incógnitas para a obtenção do ponto de máximo (também conhecido como ponto estacionário):

$$0 = -2,664 - 5,4972x_1 - 4,464x_2$$

$$0 = -1,804 - 4,464x_1$$

Equação 17

A solução do sistema é $x_1 = -0,404$ e $x_2 = -0,099$.

Os valores das variáveis codificadas encontradas correspondem à temperatura de 191,9 °C e tempo de reação de 38,02 min, respectivamente. Para a transformação das variáveis codificadas em variáveis reais foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$T_{codificada} = (T_{real} - 200)/20$$

$$Tempo_{codificado} = (Tempo_{real} - 40)/20 \quad \text{Equação 18}$$

Os valores encontrados fazem sentido com o resultado esperado, baseado nos resultados individuais de cada ponto experimental, antes mesmo de realizar a adequação a um modelo. Isso é mais um ponto de confirmação de que o modelo está adequado ao comportamento real dos fatores analisados.

Utilizando o modelo de segunda ordem (quadrático), foi elaborada a superfície de resposta com os eixos horizontais representando as variáveis 1 (Temperatura) e 2 (Tempo de reação), para verificação visual do comportamento dos fatores analisados.

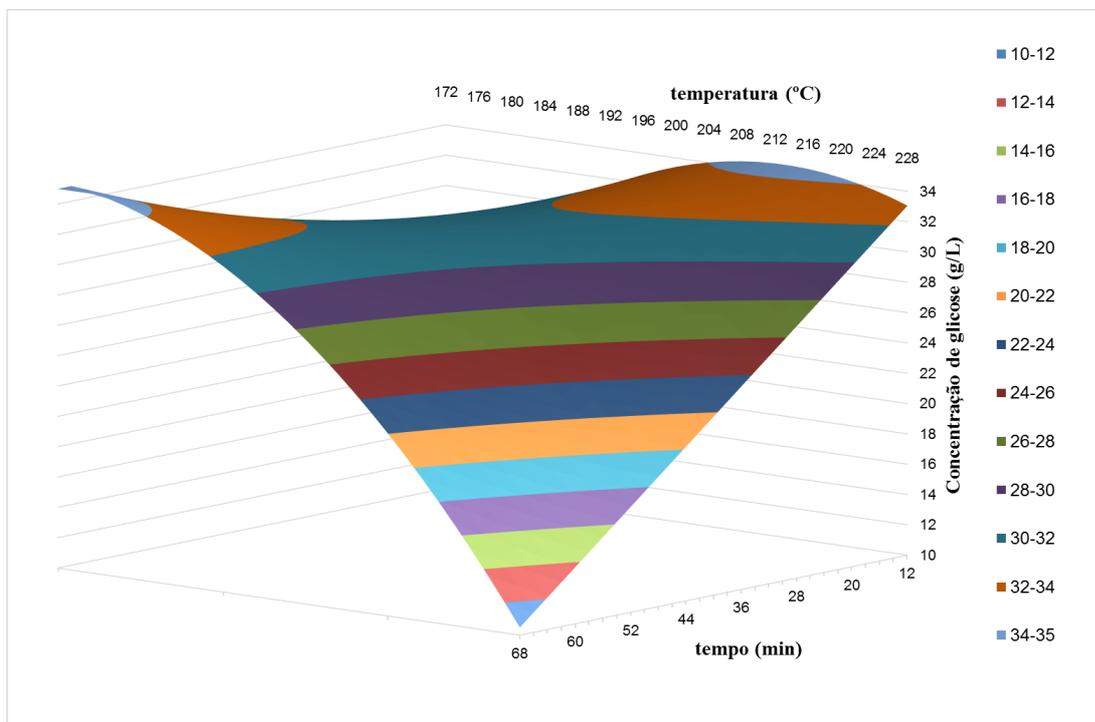


Figura 7 – Superfície de resposta para o modelo de segunda ordem ajustado aos dados experimentais.

Embora algebricamente tenha sido obtido o melhor ponto (estacionário) para o planejamento, que foi o ponto utilizado no experimento descrito em 3.3.3, analisando a

superfície de resposta do modelo, é possível perceber um comportamento de sela, com valores crescentes de concentração de glicose em duas direções distintas.

Se traçarmos uma reta imaginária cortando a essa sela no meio, é possível verificar que ela é quase uma diagonal entre os eixos da temperatura e do tempo (vide Figura 8). Analisando as duas metades especulares separadas pela reta, pode-se notar que à medida que a temperatura é reduzida, em detrimento do aumento do tempo, os resultados são similares, com relação à concentração de glicose obtida. Isso está em total sintonia com a análise feita anteriormente sobre a contribuição da interação entre os dois fatores. De maneira geral, a contribuição individual de cada variável é eclipsada pela contribuição da interação, que nada mais representa do que o grau de severidade do tratamento.

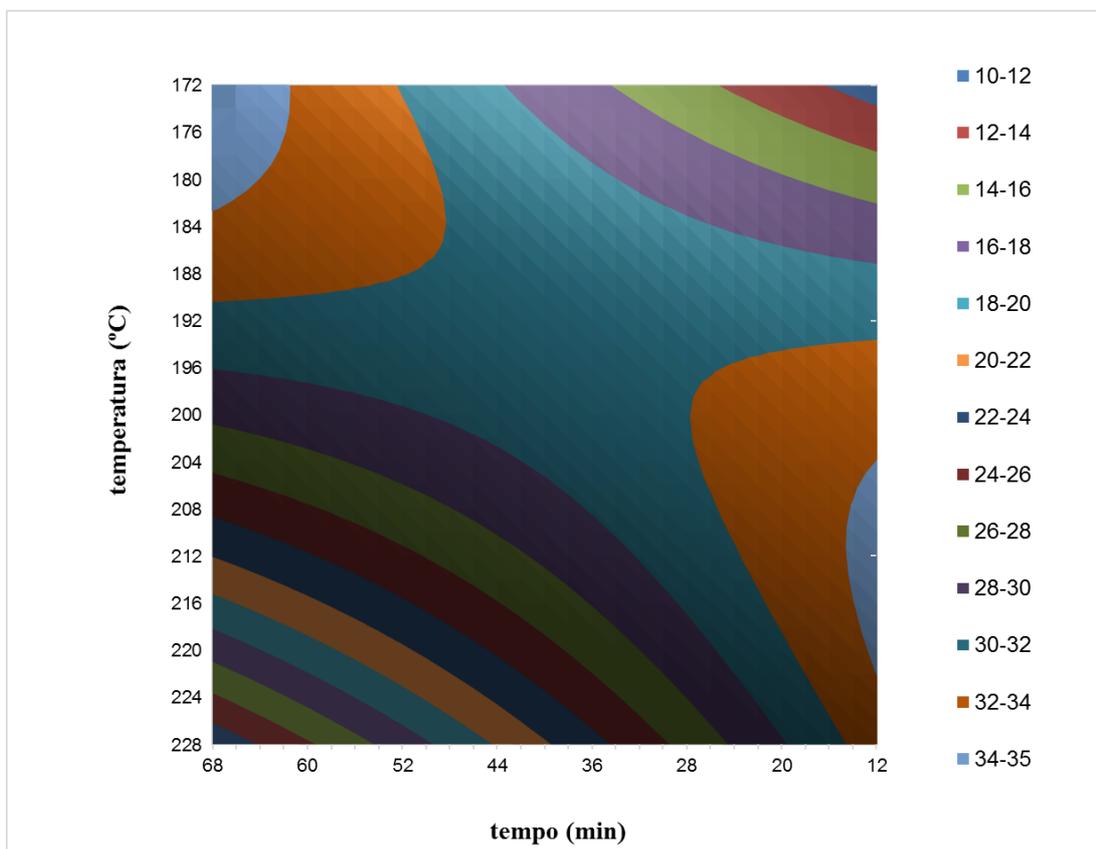


Figura 8 – Gráfico de superfície projetado sobre os eixos x e y.

A Tabela 13 mostra a comparação entre as concentrações de glicose obtidas nos ensaios realizados e as concentrações previstas pelo modelo ajustado de segunda ordem.

Tabela 13 – Comparação entre as respostas previstas pelo modelo de segunda ordem e as respostas experimentais.

Ensaio Temperatura (°C) – tempo (min)	Concentração de glicose experimental (g/L)	Concentração de glicose prevista pelo modelo (g/L)
172-40	26,54	29,24
180-20	29,41	28,15
180-60	34,58	33,47
200-12	30,18	33,42
200-40	30,92	30,89
200-68	25,34	28,37
220-20	30,80	31,75
220-60	18,12	19,21
228-40	22,23	21,78

Nos pontos mais próximos ao ponto central, as respostas de ambas as fontes estão bem próximas, mas à medida que as coordenadas vão se afastando, os valores vão se tornando mais divergentes e o modelo vai perdendo resolução. A escolha do ponto ótimo calculado algebricamente, nas coordenadas -0,404 e -0,099, próximas ao ponto central, portanto, se torna bem adequada.

4.2.3. Autohidrólise com reuso de água na melhor condição obtida

O experimento aqui denominado de prova de conceito (explicado na seção 3.3.1), realizado inicialmente a 180 °C por 40 minutos, foi replicado para as melhores condições de temperatura de operação (192 °C) e tempo de reação (38 min) obtidas após análise do planejamento fatorial realizado (resultados em 4.2.2).

As reações foram realizadas no reator Parr de 1 L de capacidade útil (o mesmo utilizado na execução do planejamento fatorial), diferentemente do experimento de prova de conceito, que foi realizado em um reator Büchi de 5 L. O protocolo utilizado (descrito em 3.3.3), foi o mesmo para o segundo conjunto de reações do experimento de prova de conceito, em que a água de *make-up*, antes de ser acrescentada ao licor reutilizado, era utilizada para a lavagem dos sólidos que iriam ser encaminhados para a hidrólise enzimática.

A Tabela 14 mostra os volumes de água de *make-up* utilizados em cada uma das 5 reações sequenciais, bem como os volumes de licor recuperados na reação imediatamente anterior.

Tabela 14 – Volume de licor recuperado e água de *make-up* adicionados em cada batelada de autohidrólise realizada na condição experimental ótima.

Nº da Reação	Volume de licor (L)	Volume de água de <i>make-up</i> (L)
1	0	0,6
2	0,48	0,12
3	0,47	0,13
4	0,47	0,13
5	0,47	0,13

Assim como no experimento inicial, foi possível reutilizar aproximadamente 80% do líquido acrescentado originalmente, sob a forma de licor. O material sólido recuperado se apresentava mais escurecido e de aparência menos fibrosa, efeitos decorrentes da maior severidade do tratamento em relação ao experimento inicial a 180 °C, que implica em maior degradação dos componentes macroestruturais. No entanto, essas características não alteraram o resultado da filtração, sendo possível recuperar a mesma quantidade de líquido.

4.2.3.1. Efeitos do reuso de água nos produtos da Autohidrólise

Foi realizada a caracterização para quantificação dos componentes estruturais dos sólidos recuperados após cada reação de autohidrólise. Os resultados estão compilados na Tabela 15. Na primeira linha da tabela foi colocado o resultado para o bagaço de cana-

de-açúcar *in natura*, que foi utilizado em todos os experimentos, para efeitos de comparação.

Tabela 15 - Composição da matéria-prima e sólidos recuperados após as reações autohidrólise na melhor condição experimental, em termos dos seus componentes estruturais (celulose, hemicelulose e lignina)

Amostra	Lignina (%)	Hemicelulose (%)	Celulose (%)	Outros (%)
Bagaço de cana-de-açúcar	21,38 ± 0,25	29,94 ± 0,50	36,01 ± 0,30	12,67 ± 1,05
1	36,58 ± 0,96	2,75 ± 0,03	56,11 ± 0,33	4,56 ± 1,32
2	43,90 ± 0,91	1,86 ± 0,03	50,54 ± 0,88	3,70 ± 1,82
3	45,57 ± 1,34	1,84 ± 0,04	50,65 ± 0,43	1,94 ± 1,81
4	45,14 ± 1,18	1,13 ± 0,56	51,72 ± 0,89	2,01 ± 2,63
5	45,50*	1,06 ± 0,53	50,30 ± 0,65	3,14 ± 1,18

*problemas durante a execução das replicatas

Analisando os resultados comparativamente com os resultados obtidos anteriormente a 180 °C (explicitados na Tabela 5), é possível observar o mesmo padrão de comportamento do bagaço de cana tratado sob as condições ótimas de operação.

Inicialmente, há rápida redução da porcentagem de hemicelulose no sólido pré-tratado, decorrente da degradação desse polímero catalisada pelos íons hidrônio formados durante a reação de autohidrólise.

A porcentagem de lignina vai crescendo ao longo das reações por causa da degradação dos carboidratos, mas, em termos absolutos, permanece praticamente inalterada. Assim que a degradação dos carboidratos é reduzida, o conteúdo de lignina atinge um platô, visível inequivocamente a partir da reação de número 3, em torno de 45%.

É interessante notar alguns pontos, quando comparadas as Tabelas 15 e 5: as porcentagens de celulose e lignina, ao atingirem seus respectivos platôs, são muito similares nas reações realizadas a 180 e a 192 °C, embora, nesta última, já seja possível

verificar a formação do platô, apesar de não tão definido, a partir da segunda reação. Esse é um resultado muito interessante se analisado sob o ponto de vista de um processo industrial.

Se pensarmos em um sistema de reuso contínuo de água, em uma planta industrial que utilize o mesmo sistema dos experimentos aqui realizados, o tempo e a quantidade de material “desperdiçados” até que o sistema entre num equilíbrio (atinga o platô), são menores quando comparados com os resultados obtidos a 180 °C. Isso economiza tempo e dinheiro e aumenta a viabilidade do processo como um todo.

A quantidade de hemicelulose restante no material sólido foi menor para os experimentos realizados na condição experimental ótima. Esse resultado pode ter várias implicações, dependendo dos objetivos com relação a esse polímero. A Tabela 16 mostra a composição dos licores obtidos após as reações sequenciais de autohidrólise na melhor condição experimental e fornece um pouco mais de subsídios para essa discussão.

Tabela 16 – Composição dos licores obtidos após cada batelada de autohidrólise realizadas na melhor condição experimental.

Nº da reação	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Ácido acético(g/L)	HMF* (g/L)	Furfural (g/L)
1	0,400	0,945	4,713	0,422	3,977	0,429	6,219
2	0,319	1,582	2,222	0,191	7,987	1,409	9,489
3	0,251	1,239	1,632	0,123	10,42	1,847	9,735
4	0,228	1,121	1,517	0,631	14,025	2,194	10,834
5	0,213	1,048	1,467	0,731	16,258	2,241	9,975

*HMF = Hidroximetilfurfural

Se comparados aos resultados obtidos para as reações sequenciais realizadas a 180 °C (explicitadas na Tabela 6), é possível notar que a quantidade de xilose recuperada na condição ótima é muito menor. Nesse ponto, é importante lembrar que a condição ótima de operação foi estabelecida com base na máxima concentração final de glicose após a hidrólise enzimática.

Como a severidade do pré-tratamento teve que ser aumentada para a obtenção dessa máxima concentração, é natural que a hemicelulose, que é um material não-cristalino e mais externo na composição da parede celular e, conseqüentemente, muito menos protegido de ataques químicos, venha a se degradar em um nível mais elevado.

A diminuição na concentração de xilose obtida é reflexo desse aumento da severidade. A xilose dispersa no meio, sob a ação da temperatura e pressão, é convertida em outros compostos (furfural, por exemplo). Se o objetivo do pré-tratamento fosse obter maior concentração deste monômero, certamente a condição ótima extraída do planejamento experimental seria outra.

Da mesma maneira, se o objetivo fosse obter glicose, mas também xilose, poderia ser realizada uma função resposta para a análise do planejamento experimental, e a condição ótima também seria outra. Analisados os dois resultados, explicitados nas Tabelas 16 e 6, a condição experimental desta última, 180 °C e 40 min, fornece quantidade de xilose muito maior do que a 192 °C.

O aumento da severidade do tratamento também pode ser observado no aumento das concentrações de ácido acético e hidroximetilfurfural (HMF) obtidas. Como dito anteriormente, na seção 4.2.1.1, esse resultado é muito interessante, já que as duas moléculas são bloco construtoras.

4.2.3.2. Efeitos do reuso de água na Hidrólise Enzimática

Os sólidos recuperados após cada reação de autohidrólise foram hidrolisadas enzimaticamente, os ensaios realizados em duplicata. A Tabela 17 mostra a concentração de glicose obtida após os ensaios de hidrólise enzimática.

Tabela 17 – Concentração de glicose obtida após hidrólise enzimática dos sólidos recuperados.

Nº da reação	Concentração de Glicose (g/L)	Rendimento (g de glicose/100 g de celulose)
1	39,06 ± 1,58	62,64 ± 2,53
2	36,98 ± 0,014	65,85 ± 0,03
3	30,99 ± 2,49	55,07 ± 4,42
4	28,68 ± 7,19	49,90 ± 12,51
5	38,09 ± 0,16	68,14 ± 0,29

Embora as variações medidas nos experimentos 3 e 4 atrapalhem um pouco a análise, é perceptível que os valores finais de concentração de glicose tem um pequeno decréscimo ao longo das reações sequenciais (salvo a reação 5, que teve um resultado consistente bem próximo da concentração da primeira reação).

Da mesma forma que anteriormente, ao olhar o rendimento da hidrólise, em g de glicose/100 g de celulose existente no material a ser hidrolisado (extraído da composição apresentada na Tabela 15), a variação se torna mais tênue e, excetuados os resultados com muita variação, mencionados anteriormente, é possível ver que o rendimento se mantém em torno de 62% ao longo das reações sequenciais (vide Figura 9).

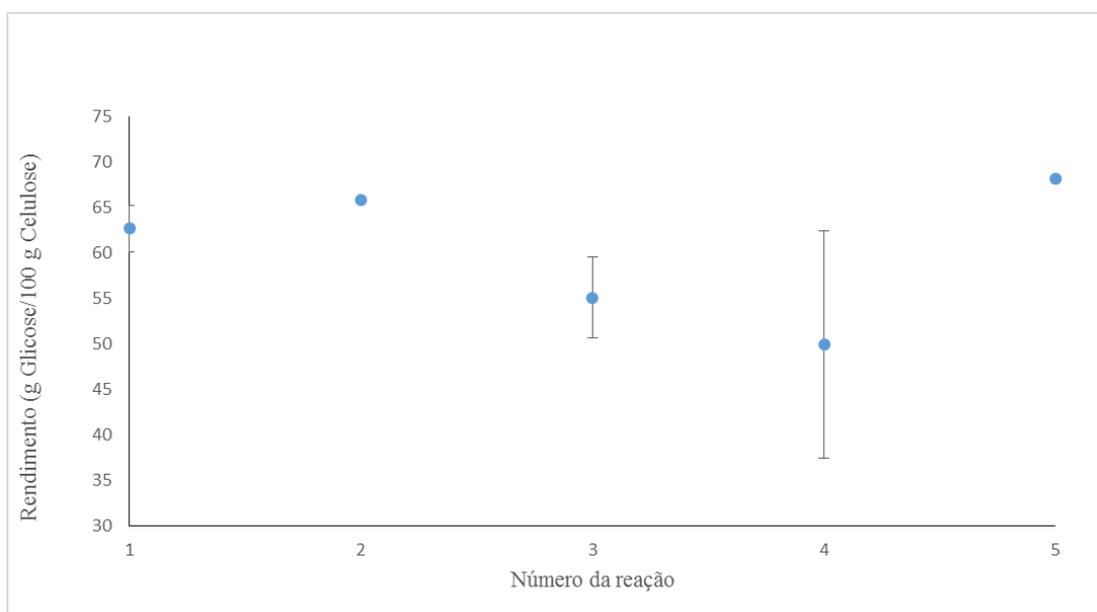


Figura 9 – Rendimentos em glicose obtidos após hidrólise enzimática.

O resultado também foi confirmado na hidrólise única (sem réplica) realizada com todos os materiais juntos (1/5 de cada sólido obtido nas reações sequenciais), que obteve o rendimento aproximado de 63%, ratificando, para a melhor a condição experimental de autohidrólise, o conceito proposto e provado anteriormente, de que a água de *make-up* sendo utilizada para a lavagem dos sólidos consegue retirar as impurezas que minam o rendimento da hidrólise enzimática, fazendo com que, mesmo com a reutilização dos licores, ele se mantenha constante.

Esse resultado, em especial, é muito interessante quando extrapolado mais uma vez para o contexto industrial, pois é possível imaginar um arranjo onde vários reatores em paralelo, utilizando licores reutilizados duas ou mais vezes, alimentam um único

reator de hidrólise enzimática que pode, por exemplo, operar em sistema de batelada alimentada, que apresenta bons resultados, conforme resultados obtidos por Martins *et al.*⁴⁷

A Figura 10 exemplifica graficamente o arranjo de um processo tradicional, enquanto a Figura 11 ilustra o arranjo sugerido acima. Comparando as duas, é possível verificar as diferenças, evidenciadas na última imagem pelos cruzamentos das linhas que representam o reaproveitamento dos fluxos.

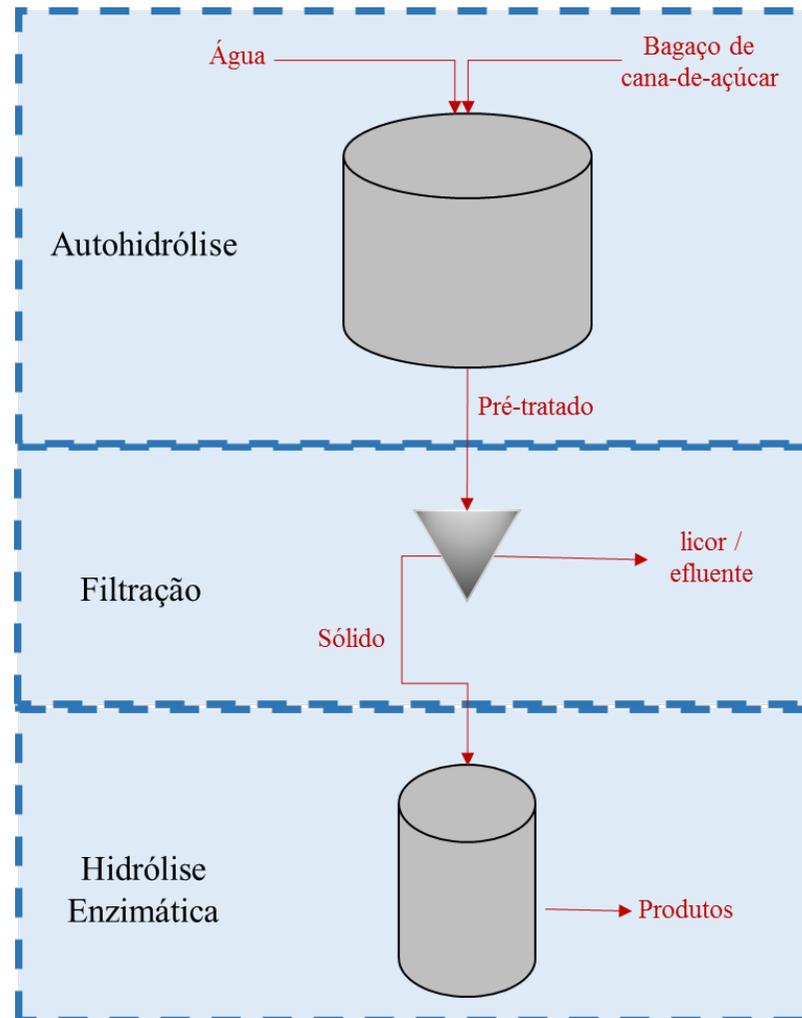


Figura 10 – Processo tradicional de produção de glicose, através de pré-tratamento e hidrólise enzimática, sem reaproveitamento de fluxos.

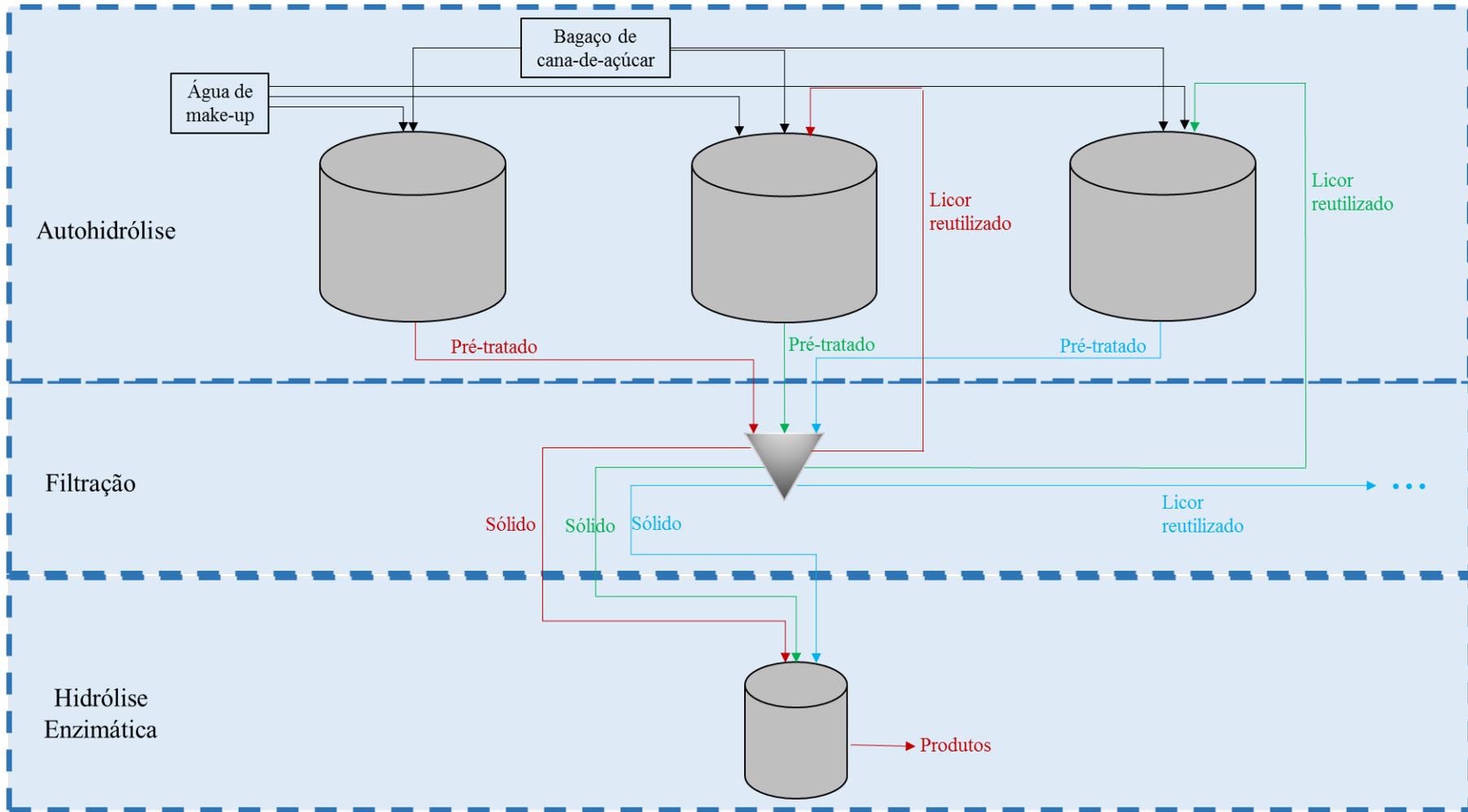


Figura 11 – Processo sugerido de produção de glicose, baseado no reaproveitamento dos licores na etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática em sistema de batelada alimentada.

4.2.3.3. Consumo de água

A estratégia idealizada, do reaproveitamento de água na autohidrólise sem alterar o rendimento de glicose da hidrólise, foi provada novamente efetiva, dessa vez para as condições ótimas obtidas através do planejamento fatorial anterior.

O consumo de água limpa foi reduzido para apenas 1,11 L, num universo de 3 L de líquido utilizado para as reações de autohidrólise. Quando comparada ao processo de autohidrólise tradicional (5 bateladas de autohidrólise independentes), esse volume representa 63% de redução, similar ao resultado obtido anteriormente, sem prejudicar o rendimento em glicose.

Essa redução é significativa e, numa escala maior, pode representar a diferença entre a viabilidade ou não de um processo, ainda mais se considerado o cenário futuro, onde a água se torna um bem cada vez mais valioso.

5. Conclusão

A autohidrólise é um processo de pré-tratamento que apresenta, dentre outras vantagens, a ausência de reagentes químicos, já que utiliza apenas água sob pressão e temperatura elevadas para a realização do fracionamento parcial da biomassa. O principal efeito da autohidrólise é a retirada da hemicelulose e rearranjo da lignina na celulignina resultante do processo, permitindo maior acesso à celulose.

Através de planejamento fatorial realizado, foi possível estabelecer que as condições de temperatura e tempo de reação (fatores estudados) para a autohidrólise que fornecem maior concentração de glicose após hidrólise enzimática do sólido pré-tratado são 192 °C e 38 minutos, respectivamente.

Essa condição foi utilizada para a realização de reações de autohidrólise sequenciais, onde o licor resultante da batelada anterior era recuperado e utilizado na reação seguinte. O volume adicional de líquido necessário para manter uma razão líquido:sólido constante entre as reações, denominado de água de *make-up*, antes de ser acrescentado ao licor, era utilizado para a lavagem do sólido resultante da autohidrólise anterior, antes que este fosse encaminhado para a hidrólise enzimática.

Embora os licores reutilizados apresentassem concentrações crescente de inibidores, como furfural, HMF e ácido acético (aproximadamente 10, 2 e 16 g/L ao final da quinta reação), essa estratégia permitiu obter concentrações de glicose na faixa de 36g/L, com rendimento em g de glicose/100g de celulose de 62% em todas as hidrólises, independente do reuso de água.

Esse resultado mostrou um grande potencial e abriu um leque de possibilidade para eventuais arranjos industriais (ressalvado o fato de que o conceito deve ser provado em escalas piloto e demonstrativa). Considerando a redução no consumo de água obtida, de aproximadamente 63%, que implica diretamente na redução do volume de efluentes a serem tratados e no tamanho/quantidade/capacidade de reatores, bombas e demais instrumentações industriais, essa estratégia de reuso de água pode contribuir para a viabilidade técnico-econômica do processo, sem contar o grande ganho do ponto de vista ambiental, que é uma preocupação cada vez maior para o setor produtivo de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

O horizonte é ainda mais promissor se analisarmos que o reuso de água pode ser atrelado a outras estratégias de redução do consumo de água e concentração do produto final, como a redução da razão líquido:sólido (que pode envolver o desenho de reatores mais apropriados para o trabalho com alta carga de sólidos, tanto nos pré-tratamentos quanto na hidrólise enzimática) e a utilização de sistemas de reação diferentes da batelada, como batelada alimentada e contínuo.

Essas estratégias não foram alvo desse estudo, mas, em conjunto com a reutilização dos licores de pré-tratamento, são tópicos interessantes e promissores para trabalhos futuros.

Outro cenário que pode ser explorado, dentro do próprio conjunto de dados obtidos e aproveitando uma das outras vantagens do pré-tratamento por autohidrólise, é a modulação das condições experimentais para a obtenção de outros produtos.

Enquanto comparando dados obtidos a 192 e 180 °C, foi possível perceber que, sob a última temperatura, o acúmulo de xilose no licor obtido é significativamente maior. Muitos grupos de pesquisa estudam a utilização desse monômero como fonte de carbono para a produção de produtos de interesse, como por exemplo o etanol.^{64,65,66} O estudo de uma condição que forneça grande quantidade de xilose, portanto, também pode ser de grande interesse.

Essa versatilidade do pré-tratamento por autohidrólise, combinado com estratégias que reduzam custos, como o reuso de água, pode ser a saída para a viabilização de uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, que, nos moldes da refinaria de petróleo, consiga entregar uma série de produtos custo-competitivos no mercado.

6. Referências Bibliográficas

-
- 1 BURUIANA, C. T.; VIZIREANU, C.; GARROTE, G.; PARAJÓ, J. C.; Optimization of corn stover biorefinery for coproduction of oligomers and second generation bioethanol using non-isothermal autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 32–39, 2014.
 - 2 FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions, 1st ed., Walter de Gruyter: Berlin, 1989.
 - 3 RAMOS, L. P.; The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.
 - 4 PULS, J. Chemistry And Biochemistry Of Hemicelluloses: Relationship Between Hemicellulose Structure And Enzymes Required For Hydrolysis. **Macromolecular Symposia**, v. 120, p. 183-196, 1997.
 - 5 CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.
 - 6 VAN DER POL, E.; BAKKER, R.; VAN ZEELAND, A.; GARCIA, D. S.; PUNT, A.; EGGINK, G. Analysis of by-product formation and sugar monomerization in sugarcane bagasse pretreated at pilot plant scale: Differences between autohydrolysis, alkaline and acid pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 181, p. 114–123, 2015.
 - 7 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, n. 5, 2012.
 - 8 CONAB, 2017. Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana de Açúcar. 01/2017. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 12/01/2018.

-
- 9 CERQUEIRA, D.A., RODRIGUES, G., MEIRELES, C.D.. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrates Polymers**. v. 69, p. 579–582, 2007.
- 10 FERREIRA, V. Produção De B-Glucosidase Em *Saccharomyces Cerevisiae* Recombinante E Avaliação De Seu Emprego No Processo De Hidrólise Enzimática Simultânea À Fermentação Para A Produção De Etanol De Segunda Geração. Tese de Doutorado. **Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro**. Brasil, 2010.
- 11 SILVA, P. H. F. Fracionamento Da Biomassa Lignocelulósica Pelo Processo Organosolv. Dissertação de Mestrado. **Universidade de Brasília**. Brasil, 2017.
- 12 OLIVEIRA, L. L.; NEVES, G. G.; WAITMAN, P. L. Estudo Sobre Cogeração De Energia Elétrica No Setor Sucroalcooleiro. **REGRAD, UNIVEM/Marília-SP**, v. 10, n. 1, p. 354 - 365, 2017.
- 13 EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Balanco energético nacional 2017**. Disponível em: https://ben.epe.gov.br/downloads/Relatorio_Final_BEN_2017.pdf. Acessado em 20/01/2018.
- 14 ZHU, M. Q.; WEN, J. L.; SU, Y. Q.; WEI, Q.; SUN, R. C.; Effect of structural changes of lignin during the autohydrolysis and organosolv pretreatment on *Eucommia ulmoides* Oliver for an effective enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 378-385, 2015.
- 15 VALERY B. AGBORA, NAZIM CICEKA, RICHARD SPARLINGB, ALEX BERLINC, DAVID B. LEVIN. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675-685, 2011.
- 16 CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W. E.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J. N. Substrate pretreatment: the key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p. 67–93, 2007.

-
- 17 A.T. HENDRICKS, G. ZEEMAN. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.
- 18 P.ALVIRAE.TOMÁS-PEJÓM.BALLESTEROSM.J.NEGRO. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- 19 XIAOYUZHANG;HONGBOYU;HUIYANHUANG;YOUXUNLIU. Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 60, p. 159-164, 2007.
- 20 WYMAN, C.E. Handbook on Bioethanol: Production and Utilization. **Taylor Francis, Washington**, p. 417, 1996.
- 21NATHANMOSIERACHARLESWYMANBBRUCEDALECRICHARDELAND ERDY.Y.LEEEMARKHOLTZAPPLEFMICHAELLADISCHA. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 96, p. 673-686, 2005.
- 22 B.C. SAHA, L.B. ITEN, M.A. COTTA, Y.V. WU. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to etanol. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3693-3700, 2005.
- 23 C. CARA, E. RUIZ, J.M. OLIVA, F. SÁEZ, E. CASTRO. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1869-1876, 2008.
- 24 V.S. CHANG, M.T. HOLTZAPPLE. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84, p. 5-37, 2000.
- 25 F. CARVALHEIRO, L.C. DUARTE, F.M. GÍRIO. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 849-864, 2008.

-
- 26 S. KIM, M.T. HOLTZAPPLE. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 778-785, 2006.
- 27 W.G. GLASSER, R.S. WRIGHT. Steam-assisted biomass fractionation II: fractionation behavior of various biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, p. 219-235, 1998.
- 28 X. PAN, D. XIE, N. GILKES, D.J. GREGG, J.N. SADDLER. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology – Part A Enzyme Eng. Biotechnol.**, v. 124, p. 1069-1079, 2005.
- 29 H.H. BROWNELL, E.K.C. YU, J.N. SADDLER. Steam explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content, and pressure drop. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 792-801, 1986.
- 30 X. ZHAO, K. CHENG, D. LIU. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 815-827, 2009.
- 31 DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste to fuel ethanol. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.
- 32 GÜTSCH, J. S.; NOUSIAINEN, T.; SIXTA, H.; Comparative evaluation of autohydrolysis and acid-catalyzed hydrolysis of Eucalyptus globulus wood. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 77–85, 2012.
- 33 RUIZ, H. A.; RODRÍGUEZ-JASSO, R. M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 21, p. 35–51, 2013.
- 34 VALLEJOS, M. E.; ZAMBON, M. D.; AREA, M. C.; CURVELO, A. A. S.; Low liquid–solid ratio (LSR) hot water pretreatment of sugarcane bagasse. **Green Chemistry**, v. 14, p. 1982-1989, 2012.

-
- 35 MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E.; Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.
- 36 KIM, S. M.; DIEN, B. S.; TUMBLESON, M. E.; RAUSCH, K. D.; SINGH, V.; Improvement of sugar yields from corn stover using sequential hot water pretreatment and disk milling. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 706-713, 2016.
- 37 VALLEJOS, M. E.; ZAMBON, M. D.; AREA, M. C.; CURVELO, A. A. S.; Low liquid-solid ratio fractionation of sugarcane bagasse by hot water autohydrolysis and organosolv delignification. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 349-353, 2015.
- 38 VARGAS, F.; DOMÍNGUEZ, E.; VILA, C.; RODRÍGUEZ, A.; GARROTE, G.; Agricultural residue valorization using a hydrothermal process for second generation bioethanol and oligosaccharides production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 263–270, 2015.
- 39 HONGDAN, Z.; SHAOHUA, X.; SHUBIN, W.; Enhancement of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse by liquid hot water pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 391–396, 2013.
- 40 YU, Q.; ZHUANG, X.; LV, S.; HE, M.; ZHANG, Y.; YUAN, Z.; QI, W.; WANG, Q.; WANG, W.; TAN, X.; Liquid hot water pretreatment of sugarcane bagasse and its comparison with chemical pretreatment methods for the sugar recovery and structural changes. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 592–598., 2013.
- 41 GAO, Y.; XU, J.; ZHANG, Y.; YU, Q.; YUAN, Z.; LIU, Y.; Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 396-400, 2013.
- 42 SAKAKI T.; SHIBATA M.; SUMI T.; YASUDA S.; Saccharification of Cellulose Using a Hot-Compressed Water-Flow Reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 661-665, 2002.
- 43 ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C.; Bioethanol production from hydrothermally pretreated Eucalyptus globulus wood. **BioresourceTechnology**, v. 101, p. 8706–8712, 2010.

44 MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E.; The Use of High-Solids Loadings in Biomass Pretreatment—A Review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, p. 1430-1442, 2012.

45 LARSEN J.; PETERSEN M. O.; THIRUP L.; LI H. W.; IVERSEN F. K.; The IBUS process – Lignocellulosic Bioethanol Close to a Commercial Reality. **Chemical Engineering and Technology**, v. 31, p. 765–772, 2008.

46 MICHELIN, M.; TEIXEIRA, J. A. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 862–869, 2016.

47 MARTINS, L. H. S.; RABELO, S. C.; COSTA, A. C.; Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 312-321, 2015.

48 TOMÁS-PEJÓ, E., OLIVA, J.M., GONZÁLEZ, A., BALLESTEROS, I., BALLESTEROS, M. Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. **Fuel**, v. 88, p. 2142–2147, 2009.

49 BOMMARIUS A. S.; KATONA A.; CHEBEN S. E.; PATEL A. S.; RAGAUSKAS A. J.; KNUDSON K.; PU, Y. Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment. **Metabolic Engineering**, v. 10, p. 370-381, 2008.

50 LARSSON M, GALBE M, ZACCHI G. Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. **Bioresource Technology**, v. 60, p. 143–151, 1997.

51 MOHAGHEGHI A.; SCHELL D. J. Impact of Recycling Stillage on Conversion of Dilute Sulfuric Acid Pretreated Corn Stover to Ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 105, p. 992–996, 2010.

52 STENBERG K.; TENGBORG C.; GALBE M.; ZACCHI G.; PALMQVIST E.; HAHN-HAGERDAL, B.; Recycling of Process Streams in Ethanol Production from

Softwoods Based on Enzymatic Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70–72, p. 697–708, 1998.

53 - HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Preparation of Samples for Compositional Analysis. 2008. In: NREL/TP-510-42620 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP)**. Disponível em <<http://www.nrel.gov/publications/>> Acesso em 15/04/2017.

54 SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples. 2008. In: NREL/TP-510-42621 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP)**. Disponível em <<http://www.nrel.gov/publications/>> Acesso em 15/04/2017.

55 SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Ash in Biomass. 2008. In: NREL/TP-510-42622 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP)**. Disponível em <<http://www.nrel.gov/publications/>> Acesso em 15/04/2017.

56 SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass. 2008. In: NREL/TP-510-42619 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP)**. Disponível em <<http://www.nrel.gov/publications/>> Acesso em 15/04/2017.

57 SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. 2012. In: NREL/TP-510-42618 - NREL - National Renewable Energy Laboratory. **Technical Report. Laboratory Analytical Procedures (LAP)**. Disponível em <<http://www.nrel.gov/publications/>> Acesso em 15/04/2017.

58 SASAKI, M., ADSCHIRI, T., ARAI, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Technology**, v. 86, p. 301-304, 2003.

-
- 59 CANILHA, L., VICTOR T. O. SANTOSGEORGE J. M. ROCHAJOÃO B. ALMEIDA E SILVAMARCO GIULIETTISILVIO S. SILVAMARIA G. A. FELIPEANDRÉ FERRAZADRIANE M. F. MILAGRESWALTER CARVALHO. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.
- 60 - C. LIU, S. WU, From biomass waste to biofuels and biomaterial building blocks. **Renewable Energy**, v. 96, p. 1056-1062, 2016.
- 61 - X. TANG, J. WEI, N. DING, Y. SUN, X. ZENG, L. HU, S. LIU, T. LEI, L. LIN, Chemoselective hydrogenation of biomass derived 5-hydroxymethylfurfural to diols: Key intermediates for sustainable chemicals, materials and fuels, **Renewable and Sustainable Energy Review**, v. 77 , p. 287-296, 2017.
- 62 - M. T. ASHRAF, M. H. THOMSEN, J. E. SCHMIDT, Hydrothermal pretreatment and enzymatic hydrolysis of mixed green and woody lignocellulosics from arid regions, **Bioresource Technology**, v. 238, p. 369-378, 2017.
- 63 - B. CHEN, B. ZHAO, M. LI, Q. LIU, R. SUN, Fractionation of rapeseed straw by hydrothermal/dilute acid pretreatment combined with alkali post-treatment for improving its enzymatic hydrolysis, **Bioresource Technology**, v. 225, p. 127-133, 2017.
- 64 NAMBU-NISHIDA, Y.; SAKIHAMA, Y.; ISHII, J.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Selection of yeast *Saccharomyces cerevisiae* promoters available for xylose cultivation and fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, p. 76-86, 2018.
- 65 KHUNNONKWAO, P.; JANTAMA, S. S.; KANCHANATAWEE, S.; JANTAMA, K. Re-engineering *Escherichia coli* KJ122 to enhance the utilization of xylose and xylose/glucose mixture for efficient succinate production in mineral salt medium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 127-141, 2018.
- 66 CORTIVO, P. R. D.; HICKERT, L. R.; HECTOR, R.; AYUB, M. A. Z. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by

recombinant industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, v. 113, p. 10-18, 2018.

67 GAO, Y.; XU, J. YU, Z. Y.; YUNYUN, Z.; LIANG , L.C. Optimization of fed-batch enzymatic hydrolysis from alkali-pretreated sugarcane bagasse for high-concentration sugar production. **Bioresource Technology**. v. 167, p. 41-45, 2014.