



PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXTRUSÃO  
COM DUPLA-ROSCA

Mariana Kuster Moro

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Príamo Albuquerque Melo Jr.

Argimiro Resende Secchi

Elba Pinto da Silva Bon

Rio de Janeiro

Março de 2015

PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXTRUSÃO  
COM DUPLA-ROSCA

Mariana Kuster Moro

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Elba Pinto da Silva Bon, D.Sc.

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Prof. Nei Pereira Junior, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2015

Moro, Mariana Kuster

Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-rosca/ Mariana Kuster Moro. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2015.

XII, 107 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Príamo Albuquerque Melo Jr.

Argimiro Resende Secchi

Elba Pinto da Silva Bon

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2015.

Referências Bibliográficas: p. 95-107.

1. Pré-tratamento 2. Biomassa de cana-de-açúcar 3. Extrusão I. Melo Jr., Príamo Albuquerque *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por essa conquista que fecha mais uma etapa da minha vida e por iluminar o meu caminho e me guiar em todas as decisões.

Agradeço aos professores Argimiro R. Secchi, Elba P. S. Bon e Príamo A. Melo Jr. pela orientação e prontidão na ajuda e pela confiança depositada.

Agradeço ao Prof. Ricardo Sposina Sobral Teixeira pela orientação, acompanhamento, dedicação e contribuição durante todo o percurso deste trabalho e por guiar meus passos dentro do laboratório.

Um agradecimento especial a Maristela Duarte Fujimoto que esteve comigo em todos os momentos do trabalho experimental, fornecendo ajuda, companheirismo e aprendizado.

Agradeço a Prof<sup>ª</sup>. Elba por abrir as portas do Laboratório Bioetanol, fornecendo a infraestrutura necessária para a realização deste estudo e aos pesquisadores do Laboratório Bioetanol, Daniel Santos Pereira, Marcelo Martins Torquato de Carvalho da área analítica e Pedro Lima Sampaio da área de fermentação pela ajuda nas análises e condução de experimentos.

Agradeço aos amigos do Laboratório Bioetanol pelo convívio diário e aprendizado. Aos queridos amigos da pós-graduação que me acompanharam nessa caminhada dividindo momentos de tristeza e alegria. Aos professores do Programa de Engenharia da COPPE por compartilharem o conhecimento conosco.

As Usinas Itarumã e Catanduva por terem fornecido as matérias-primas para a realização dos experimentos.

Ao CNPq, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro.

Ao Marcelo Zanotti da Silva pelo apoio e suporte nos momentos difíceis e, em especial, a minha família, alicerce de todos os meus passos e que sempre apoiou e incentivou em todas as minhas decisões.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR EXTRUSÃO COM DUPLA-ROSCA

Mariana Kuster Moro

Março/2015

Orientadores: Príamo Albuquerque Melo Jr.

Argimiro Resende Secchi

Elba Pinto da Silva Bon

Programa: Engenharia Química

Na produção de etanol de segunda geração, o pré-tratamento tem a função de alterar as interações nativas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina e, em muitos casos, modificar quimicamente estes componentes da biomassa, de forma a tornar a celulose mais acessível à etapa de hidrólise enzimática. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho do pré-tratamento da biomassa usando uma extrusora com dupla-roscas em função de condições operacionais do processo. Experimentos preliminares indicaram que a mistura biomassa-água deu bons resultados em relação à eficiência do processo de extrusão. Entretanto o glicerol foi adotado, como aditivo, para a continuação do trabalho, devido ao seu alto ponto de ebulição, favorecendo os estudos do efeito da temperatura. Foi observado que um alto teor de glicerol, por facilitar o transporte da biomassa reduz o cisalhamento durante a extrusão, diminuindo a eficiência do pré-tratamento. Ciclos de extrusão mostraram pequenos incrementos nos rendimentos da hidrólise até o terceiro ciclo para o bagaço e até o sétimo ciclo para a palha. Os ciclos subsequentes não forneceram melhoras significativas nos rendimentos. Os resultados do planejamento experimental para o bagaço mostram que a velocidade de rotação e a temperatura do cilindro apresentam influência no rendimento em 24 horas de hidrólise da celulose, porém essa influência é pequena. A inserção de um elemento reverso na configuração dos parafusos resultou em um aumento substancial dos rendimentos de hidrólise, chegando a 68,5% em 72 horas.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

## SUGARCANE BIOMASS PRETREATMENT USING A TWIN SCREW EXTRUDER

Mariana Kuster Moro

March/2015

Advisors: Príamo Albuquerque Melo Jr.

Argimiro Resende Secchi

Elba Pinto da Silva Bon

Department: Chemical Engineering

The production of second generation ethanol includes biomass pretreatment, aiming to decrease the biomass native recalcitrance due to the interactions amongst cellulose, hemicellulose and lignin, allowing the enzymatic hydrolysis of cellulose. This study evaluated sugarcane biomass pretreatment using a twin screw extruder in different operating conditions regarding temperature, speed and configuration of the screws, the type and load of a selected additive and number of extrusion cycles. Nevertheless, preliminary experiments showed that the mixture biomass-water was a better option regarding the extrusion process the biomass-glycerol mixture was used in the continuation of the work for the high boiling point of this additive that allowed a better evaluation of the effect of the temperature on the pretreatment process. It was observed that a high additive content acted as a lubricant reducing the shear forces in the equipment, thus reducing the efficiency of the pretreatment. The extrusions in cycles showed small and continuous increments in hydrolysis yields until the third cycle for bagasse and the seventh cycle, for straw. Subsequent cycles did not provide significant improvements in glucose yields. The results for the bagasse pretreatment experimental design showed that the rotation speed and the barrel temperature affected the pretreatment efficiency for the 24 hours enzymatic hydrolysis yield; nevertheless this influence was not very expressive. The insertion of a reverse element in the configuration of the screws resulted in a substantial increase in the 72 hours hydrolysis yield, reaching 68.5%.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	05
2.1 A Biorrefinaria e o Etanol.....	05
2.2 Biomassas.....	06
2.3 Bioetanol de Segunda Geração.....	09
2.4 Processo de Produção.....	10
2.5 Tipos de Pre-tratamento.....	17
<b>2.5.1 Físicos</b> .....	17
<b>2.5.2 Químicos</b> .....	19
<b>2.5.3 Físico-químicos</b> .....	22
<b>2.5.4 Biológicos</b> .....	24
2.6 Hidrólise Enzimática.....	27
2.7 O Pré-tratamento de Extrusão.....	29
<b>2.7.1 Aspectos Gerais da Extrusão da Biomassa</b> .....	32
<b>3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	42
3.1 Preparo da Biomassa.....	42
3.2 Caracterização da Biomassa.....	42
3.3 Extrusão.....	43
3.4 Ensaio Preliminares.....	46
<b>3.4.1 Influência dos Aditivos</b> .....	46
<b>3.4.2 Influência do Teor de Aditivo</b> .....	47
<b>3.4.3 Efeito dos Ciclos de Extrusão</b> .....	47
3.5 Planejamento Experimental.....	48
3.6 Efeito da Configuração dos Parafusos.....	50
3.7 Hidrólise Enzimática.....	52
3.8 Determinação da Atividade de FPase.....	54
3.9 Fermentação do Hidrolisado.....	55
3.10 Determinação do Consumo Energético.....	56
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	58
4.1 Preparação e Caracterização Química da Biomassa <i>in natura</i> .....	58

4.2 Ensaaios Preliminares.....	60
<b>4.2.1 Aditivos.....</b>	<b>60</b>
<b>4.2.2 Carga de Aditivo.....</b>	<b>63</b>
<b>4.2.3 Ciclos.....</b>	<b>66</b>
4.3 Ensaaios de Extrusão do Planejamento Experimental.....	69
4.4 Hidrólise Enzimática do Planejamento Experimental.....	70
4.5 Análise do Consumo Energético.....	75
4.6 Influência da Configuração dos Parafusos.....	78
4.7 Fermentação do Hidrolisado.....	83
4.8 Caracterização Estrutural.....	85
<b>4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....</b>	<b>85</b>
<b>4.8.2 Índice de Cristalinidade.....</b>	<b>89</b>
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>91</b>
5.1 Conclusões.....	91
5.2 Sugestões.....	93
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura simplificada de uma biorrefinaria integrada (adaptado de FERNANDO <i>et al.</i> , 2006).....	11
Figura 2.2: Diagrama de blocos do processo de produção de etanol de primeira e segunda geração a partir da cana-de-açúcar (adaptado de DEMIRBAS, 2009).....	14
Figura 2.3: Formação dos componentes inibidores (adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).....	21
Figura 2.4: Classificação da extrusora quanto à posição dos parafusos: (a) intercalada, (b) não intercalada tangencial e (c) não intercalada separada.....	33
Figura 2.5: Expansão e compressão dos discos (TODD, 1997).....	34
Figura 3.1: Sistemas RheoDrive 7 OS e Rheomex PTW 16/25 OS.....	44
Figura 3.2: Zonas de aquecimento, alimentação e saída.....	45
Figura 3.3: Zonas de mistura e transporte dos parafusos.....	45
Figura 3.4: Descrição da configuração dos parafusos.....	46
Figura 3.5: Mudança da angulação da segunda zona de mistura dos parafusos.....	51
Figura 3.6: Inserção do elemento reverso ao final da terceira zona de mistura.....	51
Figura 3.7: Hidrólise enzimática.....	53
Figura 4.1: Bagaço antes (a) e após (b) a moagem e após o pré-tratamento (c) e palha antes (d) e após (e) moagem e após o pré-tratamento (f).....	59
Figura 4.2: Influência dos diferentes aditivos para o bagaço (a) e palha de cana (b).....	61
Figura 4.3: Influência dos aditivos na hidrólise enzimática.....	62
Figura 4.4: Influência do teor de glicerol na extrusão do bagaço (a) e da palha de cana-de-açúcar (b).....	64

Figura 4.5: Rendimento versus quantidade de ciclos para o bagaço (a) e a palha de cana-de-açúcar (b).....	68
Figura 4.6: Gráfico de Pareto para 24 horas de hidrólise enzimática do bagaço.....	72
Figura 4.7: Curva de nível gerada a partir do modelo de determinação do rendimento de glicose para 24 horas.....	73
Figura 4.8: Gráfico de Pareto para 24 horas de hidrólise enzimática da palha.....	75
Figura 4.9: Comparação dos rendimentos em 72 horas de hidrólise das amostras processadas nas diferentes configurações de parafusos.....	79
Figura 4.10: Perfil de hidrólise das amostras processadas com elemento reverso.....	81
Figura 4.11: Comparação da cor da palha <i>in natura</i> e tratada do primeiro ao terceiro ciclo utilizando os parafusos com elemento reverso.....	82
Figura 4.12: Rendimento de etanol ao longo do tempo de fermentação.....	84
Figura 4.13: Imagens de MEV do bagaço sem tratamento (esquerda) e pré-tratado (direita), com aumentos de 500, 2.000 e 10.000 x. ....	87
Figura 4.14: Imagens de MEV da palha sem tratamento (esquerda) e pré-tratada (direita), com aumentos de 1.000, 5.000 e 20.000 x. ....	88
Figura 4.15: Cristalinidade das amostras tratadas em ciclos.....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Diferentes pré-tratamentos para o bagaço de cana-de-açúcar.....	25
Tabela 2.2: Diferentes pré-tratamentos para a palha de cana-de-açúcar.....	26
Tabela 2.3: Preço médio de exportação no ano de 2013. Fonte: Aliceweb (2014).....	32
Tabela 2.4: Rendimentos em glicose de pré-tratamentos por extrusão.....	40
Tabela 3.1: Definição das variáveis e seus níveis.....	48
Tabela 3.2: Planejamento fatorial completo.....	49
Tabela 3.3: Vazões de entrada no 1º ciclo dos ensaios experimentais.....	49
Tabela 3.4: Condições utilizadas nas extrusões com as novas configurações de parafusos.....	52
Tabela 4.1: Caracterização química das biomassas.....	58
Tabela 4.2: Aumento do rendimento de hidrólise de um ciclo para outro em %.....	67
Tabela 4.3: Tempo de residência dos ensaios experimentais.....	69
Tabela 4.4: Rendimento de glicose em % ao longo do tempo de hidrólise das amostras de bagaço tratadas no planejamento experimental.....	70
Tabela 4.5: Rendimento de glicose em % ao longo do tempo de hidrólise das amostras de palha tratadas no planejamento experimental.....	71
Tabela 4.6: Análise de variância para rendimento em glicose em 24 horas.....	72
Tabela 4.7: Resultados experimentais e gerados pelo modelo.....	74
Tabela 4.8: Consumo energético dos pontos selecionado.....	76
Tabela 4.9: Concentração dos principais inibidores.....	82
Tabela 4.10: Concentração de açúcares e glicerol no início da fermentação.....	83

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>1G</b>	Primeira geração
<b>2G</b>	Segunda geração
<b>AFEX</b>	<i>Amonia fiber explosion</i>
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CBH</b>	Celobihidrolases
<b>DCCR</b>	Delineamento composto central rotacional
<b>DMSO</b>	Dimetil sufxido
<b>DNS</b>	cido 3,5-dinitro salicílico
<b>EG</b>	Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases
<b>FPU</b>	<i>Filter paper unit</i>
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>LHW</b>	<i>Lquid hot water</i>
<b>LIs</b>	Líquidos iônicos
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>NUCAT</b>	Núcleo de Catálise
<b>WDM</b>	<i>Wet Disk Milling</i>

# 1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis vêm ganhando destaque, à medida que cresce a preocupação com as mudanças climáticas e se tornam escassas as fontes energéticas fósseis. A participação dos biocombustíveis na matriz energética de um país diminui sua dependência em relação ao petróleo. Isso promove uma maior segurança energética, visto que a oferta de combustíveis fósseis é limitada e a demanda é cada vez maior (VAZ JUNIOR, 2011).

As mudanças climáticas mostram a necessidade de reduzir as emissões de gases poluentes, sobretudo aqueles causadores do efeito estufa. A queima de combustíveis fósseis é a responsável por 73% da emissão de CO<sub>2</sub> na atmosfera, intensificando o efeito estufa e o aquecimento global (BALAT *et al.*, 2008). Sabendo disso, os biocombustíveis aparecem como uma alternativa ao combate desses problemas ambientais, pois sua combustão é mais limpa, evitando que toneladas de poluentes sejam emitidas (LIEW *et al.*, 2013).

Entretanto, o amplo potencial de produção de energia que a biomassa proporciona ainda não foi completamente explorado. O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos tem sido uma alternativa bastante promissora para o aumento da eficiência energética do processo e o aproveitamento do potencial energético da biomassa (LEE *et al.*, 2010a). Isso proporciona uma maior quantidade de combustível produzido por área de biomassa plantada, aumentando a sustentabilidade do processo.

Entre outras vantagens, a produção de etanol de segunda geração não compete com a produção de alimentos e com o cultivo de terras agrícolas. Além disso, os resíduos lignocelulósicos estão disponíveis, na maioria dos casos, de forma abundante e barata e necessitam de uma destinação. O aproveitamento desses resíduos impede que ocorra uma expansão desmedida das áreas de cultivo à medida que cresce a demanda por etanol (LIEW *et al.*, 2013).

De forma abrangente, o processo produtivo de etanol de segunda geração necessita de duas etapas adicionais ao processo convencional, são elas, pré-tratamento e hidrólise. Essas etapas são necessárias, pois a biomassa lignocelulósica não dispõe de

açúcares livres em sua estrutura para os microrganismos da fermentação, como no caso das matérias-primas do etanol de primeira geração (1G). A estrutura lignocelulósica é composta majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo que as duas primeiras representam os substratos que podem ser utilizados para produção de açúcares fermentescíveis. Assim sendo, a etapa de hidrólise tem a função de converter a celulose e a hemicelulose presentes na estrutura da biomassa em açúcares, principalmente glicose e xilose, que serão posteriormente fermentados pelos microrganismos (RABELO *et al.*, 2011).

Todavia, os materiais lignocelulósicos possuem uma estrutura rígida e ordenada, de forma que a celulose e a hemicelulose estão fortemente associadas à lignina que age como uma barreira protetora contra agentes externos. Isso dificulta o acesso das enzimas ao substrato o que resulta em rendimentos muito baixos de açúcares na hidrólise enzimática. Dessa forma, a etapa de pré-tratamento tem a função de desordenar a rígida estrutura da biomassa e tornar a celulose e a hemicelulose mais acessíveis às enzimas (DIAS *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2000, LAGAERT *et al.*, 2009). O pré-tratamento é uma etapa crucial, pois exerce uma grande influência nas etapas subsequentes e no custo total do processo (BALAT *et al.*, 2008).

Pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos estão sendo estudados como forma de melhorar a sacarificação enzimática da biomassa. A extrusão, classificada como tratamento físico, apresenta uma série de vantagens que a torna promissora frente aos demais tratamentos (ALVIRA *et al.*, 2010). Suas vantagens incluem baixo tempo de residência, não necessidade de substâncias químicas, ausência de inibidores, não necessidade de lavagem, não formação de efluentes e, principalmente, possibilidade de operação contínua (MOOD *et al.*, 2013).

A extrusão promove a mistura e o cisalhamento da biomassa levando a alterações físicas de sua estrutura como redução da cristalinidade, redução do tamanho das partículas e aumento da área superficial. Isso torna a celulose mais acessível e aumenta a conversão da hidrólise enzimática (MOOD *et al.*, 2013).

No atual momento, existe muito pouca informação na literatura a respeito do pré-tratamento de biomassas exclusivamente por extrusão, pois a maioria dos trabalhos aborda a extrusão associada a outros pré-tratamentos. Mais especificamente, não existem publicações sobre a extrusão da biomassa de cana-de-açúcar como pré-tratamento para produção de bioetanol.

Considerando a importância do pré-tratamento no processo produtivo de etanol de segunda geração, aliada à ausência de informações acerca da extrusão da biomassa de cana-de-açúcar, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o desempenho do pré-tratamento físico da biomassa da cana-de-açúcar, bagaço e palha, em uma extrusora de dupla-rosca, em função das condições operacionais do processo, utilizando como parâmetro as características da biomassa pré-tratada e seus rendimentos de hidrólise.

Os objetivos específicos deste estudo são:

- ✓ Avaliar as substâncias água, glicerol, Tween 80 e etilenoglicol como aditivos do processo de extrusão da biomassa da cana-de-açúcar;
- ✓ Avaliar a influência do teor de aditivo na eficiência do pré-tratamento, assim como a sua capacidade de auxiliar o transporte da biomassa através do cilindro;
- ✓ Avaliar o efeito do número de extrusões em ciclos na eficiência do pré-tratamento da biomassa da cana-de-açúcar por extrusão;
- ✓ Otimizar o processo de pré-tratamento de bagaço e palha da cana-de-açúcar por extrusão através de um delineamento composto central rotacional  $2^2$ , estudando os parâmetros velocidade de rotação e temperatura do pré-tratamento como fatores independentes;
- ✓ Verificar a influência da configuração dos parafusos na eficiência do pré-tratamento.

A dissertação está estruturada em 6 capítulos. Inicia-se com o presente capítulo com uma introdução ao assunto abordado e os objetivos gerais e específicos desta pesquisa.

No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica que mostra os principais aspectos acerca da extrusão da biomassa e destaca os principais trabalhos na área.

O capítulo seguinte descreve de forma detalhada a metodologia experimental empregada, apresentando os materiais e métodos, bem como os critérios utilizados para a escolha das condições de operação em cada etapa.

Os resultados dos experimentos são apresentados e discutidos no Capítulo 4. Neste capítulo são mostrados os resultados obtidos nos experimentos preliminares, assim como os resultados do planejamento experimental. São mostradas também as

mudanças estruturais da biomassa, o gasto energético da extrusão e, por fim, os resultados obtidos com a mudança de configuração dos parafusos.

No Capítulo 5 apresentam-se as principais conclusões decorrentes dos resultados obtidos e fazem-se algumas sugestões para trabalhos futuros.

Finalmente, no Capítulo 6 se encontra a bibliografia consultada.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo aborda uma breve revisão bibliográfica sobre os processos que envolvem a produção de bioetanol de segunda geração, com foco na etapa de pré-tratamento por meio da extrusão. Apresenta também uma fundamentação teórica dos mecanismos de funcionamento da extrusora e suas variáveis mais importantes.

### 2.1 A Biorrefinaria e o Etanol

O conceito de biorrefinaria está embasado principalmente no fato da utilização de fontes de matérias-primas renováveis em seus processos. Assim como em uma refinaria, a biorrefinaria pode ser considerada um complexo que integra diferentes processos para produção de combustíveis, eletricidade, produtos químicos, entre outros produtos (RABELO *et al.*, 2011).

Dentre todos, os principais produtos deste setor são o açúcar e o bioetanol. O Brasil foi o pioneiro na inserção do etanol em sua matriz energética que, com a criação do Proálcool, intensificou a produção de etanol para substituir a gasolina durante a crise mundial do petróleo (VAZ JUNIOR, 2011). Atualmente, o Brasil e os Estados Unidos são os maiores produtores mundiais de etanol, produzindo juntos 60% de todo o etanol mundial (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010a), utilizando como principais fontes de matérias-primas o caldo da cana de açúcar e o amido de milho, respectivamente (DIAS *et al.*, 2009).

Comparativamente à gasolina, o etanol possibilita uma combustão mais limpa e melhor desempenho dos motores devido a sua maior resistência a auto-detonação (octanagem) e maior massa específica que garante maior potência ao motor. Sua combustão produz menores emissões de poluentes, como monóxido de carbono e óxidos de enxofre e, como aditivo da gasolina, o etanol melhora sua octanagem (BNDES, 2008).

O etanol pode ser utilizado misturado à gasolina ou como etanol puro. Os motores que utilizam uma mistura entre os dois combustíveis não precisam de qualquer modificação em sua estrutura, por esse motivo, essa é a forma mais rápida e fácil de uso do etanol como combustível. Os motores movidos a etanol puro hidratado, atualmente, possuem um desempenho tão bom quanto àqueles movidos à gasolina. Além disso, existem no mercado veículos flexíveis capazes de utilizar gasolina, etanol puro, ou uma mistura entre eles (BNDES, 2008).

O etanol produzido nas biorrefinarias pode ser classificado nas três categorias seguintes: primeira geração, em que são fabricados a partir de culturas agrícolas que sejam fontes de açúcar ou amido como, por exemplo, beterraba, trigo, milho e cana-de-açúcar; segunda geração, produzidos a partir da celulose presente em fibras vegetais; e terceira geração, produzidos a partir de micro e macro algas (LIEW *et al.*, 2013).

Cada uma dessas vias de produção enfrentam barreiras tanto tecnológicas quanto econômicas que, muitas vezes, prejudicam a eficiência e a viabilidade do processo. Sendo assim, vários estudos têm sido realizados para melhorar a eficiência de produção com o objetivo de torná-la sustentável e, com isso, assegurar o abastecimento de combustível e reduzir os impactos da poluição sobre o meio ambiente, atribuída aos combustíveis fósseis (LIEW *et al.*, 2013).

## 2.2 Biomassas

Pode-se definir como biomassa os recursos naturais que possuem uma forma de energia acumulada, chamada de bioenergia. A bioenergia pode ser transformada em formas de energia mais convenientes que são mais bem aproveitadas, como, por exemplo, os biocombustíveis (BNDES, 2008).

A biomassa é a matéria-prima da biorrefinaria, porém para produzir o bioetanol, a biomassa deve conter uma quantidade suficiente de sacarose, amido ou lignocelulose. Como exemplos de biomassas pode-se citar a cana-de-açúcar e a beterraba com elevadas quantidades de sacarose, o milho e o trigo com elevadas quantidades de amido e o bagaço e a palha da cana-de-açúcar com grandes quantidades de material lignocelulósico em suas estruturas (BNDES, 2008 e DIAS *et al.*, 2009). A biomassa

lignocelulósica pode vir de diversos setores da sociedade como agrícola, industrial, domiciliar e florestal, que geralmente apresentam alto teor de material lignocelulósico (PERLACK, 2005).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é mais atrativa em relação às demais alternativas de matérias-primas, visto que, suas vantagens energéticas e ambientais são superiores. Para explicar as vantagens da cana frente às outras culturas, pode-se citar a demanda de quantidades inferiores de fertilizantes, o baixo uso de nitrogênio sintético em suas culturas e a autossuficiência em energia na produção de etanol devido à queima do bagaço e/ou da palha (BNDES, 2008).

É muito importante que se faça um balanço energético com o intuito de verificar a quantidade de energia produzida e consumida durante o processo. No Brasil, as indústrias de etanol já são, praticamente, autossuficientes em energia e, muitas vezes, conseguem exportar o excedente de energia produzida com a queima do bagaço (POPPE e CORTEZ, 2012). Ao contrário disso, para o caso do milho, toda energia necessária advém de fontes fósseis. Apesar do cultivo de milho também produzir palha com coproduto, uma parte dela deve permanecer nas lavouras para preservar a qualidade do solo (BNDES, 2008).

Uma forma de comparar as biomassas quanto aos seus ganhos ambientais é calcular as emissões evitadas quando se substitui a gasolina pelo etanol. As emissões evitadas para a cana é de 89% e para os resíduos lignocelulósicos é de 66 a 73%, enquanto que, para biomassas como milho, trigo e a beterraba, são de 30 a 38%, 19 a 47% e 35 a 56%, respectivamente. Outra forma de comparar as biomassas é através de sua relação de energia que representa a energia renovável produzida dividida pela energia não renovável consumida no processo produtivo. Enquanto que a cana e os resíduos lignocelulósicos apresentam relações de energia de 9,3 e 8,3, o milho, o trigo e a beterraba apresentam relações bastante inferiores de 0,6 a 2, 0,97 a 1,11 e 1,2 a 1,8, respectivamente (BNDES, 2008).

Dessa forma, a cana-de-açúcar é a matéria-prima mais favorável e, portanto, a mais competitiva para produção de bioetanol (DIAS *et al.*, 2009). O Brasil está em uma posição favorável em relação a este aspecto, pois é um grande produtor de biomassa, principalmente de cana-de-açúcar. O clima tropical do país e a grande disponibilidade de terras para agricultura favorece a plantação da matéria-prima para a biorrefinaria (VAZ JUNIOR, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e apresenta o clima ideal para o cultivo da planta, diferentemente dos países em regiões equatoriais úmidas. A estimativa da safra de 2014/2015 é de 580 milhões de toneladas de produção de cana-de-açúcar e de 25,875 bilhões de litros de etanol. Atualmente, 56,44% do caldo da cana, no país, são empregados para produção de etanol e o restante para produção de açúcar (ÚNICA, 2014). Cerca de uma tonelada de caldo produzido, gera 280 kg de bagaço que atualmente é aproveitado para geração de energia elétrica, visando atender a demanda energética das próprias usinas. A palha produzida nos campos também pode ser utilizada para produção de energia, mas uma parte deve ficar nos campos para evitar a erosão, manter a umidade do solo e reciclar nutrientes (VAZ JUNIOR, 2011).

O clima ideal para o cultivo da cana-de-açúcar é aquele que apresenta estações quentes e úmidas seguidas de frias e secas. Dessa forma a plantação da cana-de-açúcar não é viável em algumas regiões do planeta como, por exemplo, no hemisfério norte, onde o clima não é favorável. Algumas outras opções de biomassa são o milho, a beterraba, a mandioca e o trigo, entretanto, como visto anteriormente, estas não são opções tão atrativas quanto a cana-de-açúcar, pois proporcionam ganhos energéticos e ambientais precários.

Os Estados Unidos são grandes produtores de bioetanol utilizando majoritariamente o milho como biomassa. Entretanto, a produção de etanol a partir do milho apresenta problemas ambientais, como a erosão do solo e a necessidade de grandes quantidades de nitrogênio como fertilizante nas plantações (BALAT *et al.*, 2008).

Dessa forma, países do hemisfério norte vêm buscando desenvolver tecnologias para viabilizar de forma econômica e ambiental a produção de etanol por meio de matérias-primas lignocelulósicas que estão presentes em abundância em todo o mundo, além de proporcionar um combustível de qualidade com altos índices de emissões evitadas e altas relações de energia (BNDES, 2008).

Apesar das matérias-primas lignocelulósicas se constituírem como um resíduo e por isso, apresentarem baixo custo (BNDES, 2008) isso não acontece em todos os casos. O bagaço de cana, por exemplo, por ser muito utilizado como gerador de bioeletricidade nas usinas de biocombustível passou a ser visto como uma matéria-prima importante. Por esse motivo, o bagaço possui cotação no Brasil até mesmo maior

que a própria cana-de-açúcar, sendo comercializado a R\$ 100-120 por tonelada enquanto que a cana é vendida a R\$ 50-70 por tonelada.

## 2.3 Bioetanol de Segunda Geração

O processo produtivo de bioetanol 1G já está maduro e consolidado no país. Hoje, o principal desafio é aproveitar todo potencial energético fornecido pela biomassa permitindo que se produza uma quantidade maior de combustível por área plantada (VAZ JUNIOR, 2011).

Para isso, os estudos atuais estão focados no desenvolvimento de tecnologias para produção do etanol utilizando como matéria-prima resíduos de biomassa como, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar, bagaço do milho, resíduos agrícolas e resíduos florestais (LEE *et al.*, 2010a). O etanol produzido a partir desses resíduos é chamado de etanol de segunda geração. Seu objetivo é se integrar ao processo convencional e, deste modo, complementar à produção do etanol 1G. Além disso, sua produção também é motivada pela crescente demanda por etanol (VAZ JUNIOR, 2011).

Um dos problemas enfrentados para produção de etanol de primeira geração é a disponibilidade da biomassa que muitas vezes está sujeita à sazonalidade e seu consequente aumento de preço. O mesmo não ocorre com a biomassa lignocelulósica, uma vez que esta está disponível em grandes quantidades e a baixo custo no mercado (BALAT *et al.* 2008).

Diferentemente do caso da produção de etanol 1G, a utilização de materiais lignocelulósicos tem a grande vantagem de não competir com a produção de alimentos que, além de apresentar um fim mais nobre, possui um mercado mais bem remunerado (BNDES, 2008). A utilização desses resíduos como matéria-prima tem como principal vantagem o fato de que estes são os materiais mais abundantes do planeta, além de baratos e renováveis, ao contrário dos materiais fósseis (MOOD *et al.*, 2013). Além disso, o processo agrega valor aos resíduos, pois produz combustíveis e produtos químicos de alto valor (AGUILAR *et al.*, 2002).

Também é importante destacar que o emprego da biomassa lignocelulósica para fabricação de etanol de segunda geração fornece uma destinação a estes resíduos,

mitigando os impactos ambientais causados pela geração dos mesmos (AGUILAR *et al.*, 2002). Outra vantagem importante é que os custos com a biomassa correspondem a cerca de 40-70% do custo total do processo e com o uso dos resíduos este custo cairia para zero ou próximo de zero (BNDES, 2008; CARDONA *et al.*, 2010).

No Brasil, foram criadas recentemente duas plantas de etanol de segunda geração em escala industrial, uma no estado de São Paulo e outra no estado de Alagoas. Ambas produzem etanol a partir do bagaço e palha da cana-de-açúcar (RAÍZEN, 2014 e GRANBIO, 2014). A primeira que já produzia 80 milhões de litros de etanol por safra passou a ter o potencial de ofertar mais 40 milhões, devido à instalação da planta de etanol 2G, ou seja, aumentou sua capacidade de oferta em 50%, sem aumentar a área de cultivo. A companhia tem como meta a construção de mais 7 plantas até 2024 com a expectativa de uma produtividade total de 1,5 bilhão de litros de etanol 2G por safra (RAÍZEN, 2014).

Todavia, o custo de produção do etanol de segunda geração ainda é muito alto devido, principalmente, à complexidade da estrutura do material lignocelulósico que torna sua degradação complicada e, muitas vezes, com alta demanda energética (CARDONA *et al.*, 2010). Dessa forma, para se atingir o potencial desejado de aproveitamento energético da biomassa, ainda é preciso investir em pesquisa e desenvolvimento para alcançar técnicas que tornem o processo viável (PANDEY *et al.*, 2000).

## 2.4 Processo de Produção

Existem diversas rotas tecnológicas para produção de bioenergia a partir da biomassa. As duas rotas mais promissoras são a bioquímica e a termoquímica que se diferenciam entre si na maneira pela qual é realizada a quebra da estrutura da biomassa. Enquanto a primeira utiliza enzimas ou substâncias químicas para efetuar a quebra, a segunda o faz por meio de energia térmica. Dessa forma, a plataforma termoquímica se baseia na gaseificação da biomassa, produzindo o gás de síntese, ou na pirólise da biomassa, produzindo o bio-óleo. Ambos os produtos podem ser utilizados para

sintetizar combustíveis ou produtos químicos de maior valor agregado (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

A rota bioquímica tem o foco principal na conversão da biomassa em açúcares ou outras substâncias fermentáveis por meio de processos químicos ou enzimas. Posteriormente, os açúcares são convertidos a etanol, similarmente ao processo de produção do etanol 1G. Os açúcares produzidos também podem ser convertidos em uma gama de produtos químicos de maior valor agregado (CARVALHEIRO *et al.*, 2008).

A Figura 2.1 apresenta um diagrama de blocos dos processos que compõem uma biorrefinaria que combina as tecnologias de conversão de ambas as plataformas, termoquímica e bioquímica. O processo permite a produção de, não somente biocombustíveis, mas também de bioprodutos e energia elétrica.

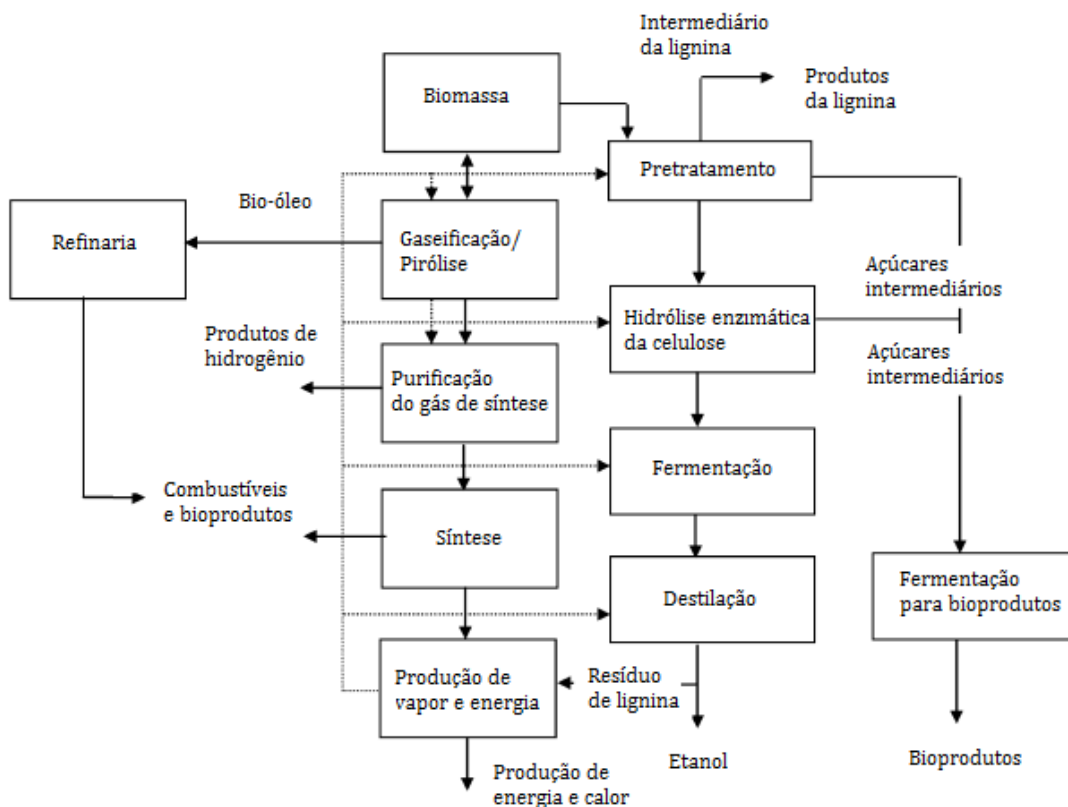


Figura 2.1: Estrutura simplificada de uma biorrefinaria integrada (adaptado de FERNANDO *et al.*, 2006).

Para elucidar os aspectos referentes ao processo de produção de etanol 2G por meio da rota bioquímica, será inicialmente explanado o processo de etanol 1G por rota bioquímica a partir da cana-de-açúcar, matéria-prima utilizada neste trabalho.

A rota bioquímica de produção de etanol 1G a partir da cana-de-açúcar envolve, basicamente, as seguintes etapas: limpeza da cana e extração do caldo, tratamento do caldo, concentração e esterilização do caldo, fermentação, destilação e desidratação (POPPE e CORTEZ, 2012).

A primeira etapa consiste na remoção da maior parte das impurezas presentes na cana que vem dos campos. Após a limpeza, o caldo que contém a sacarose é extraído através de moendas e, então, passa por um pré-tratamento em que é peneirado e tratado quimicamente para eliminação das impurezas através de decantação. A torta de filtro gerada nesta etapa pode ser empregada com adubo nos campos e o bagaço, com aproximadamente 50% de umidade, pode ser queimado em caldeiras para geração de energia ou ser utilizado como matéria-prima para produção de etanol de segunda geração (DIAS *et al.*, 2009).

Após o tratamento, o caldo é evaporado para ajustar sua concentração de açúcares (DIAS *et al.*, 2009), esterilizado para evitar contaminação e fermentado por meio das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, que convertem a sacarose em frutose e glicose que são posteriormente convertidas em etanol e dióxido de carbono, de acordo com a equação que segue (RABELO *et al.*, 2011).



A temperatura da fermentação representa um parâmetro importante, pois influencia fortemente a atuação das leveduras. Geralmente, a temperatura utilizada nas indústrias é de 34 °C (DIAS *et al.*, 2009). Após a fermentação, as leveduras podem ser recuperadas por meio de centrifugação, podendo ser recicladas. O meio fermentado é enviado para as colunas de destilação para a recuperação do etanol que se encontra a uma concentração de 7 a 10% (VAZ JUNIOR, 2011). No topo da coluna de destilação é produzido o etanol hidratado e, no fundo, um resíduo chamado vinhaça que pode ser aplicado nos campos reduzindo a necessidade de irrigação e fertilizantes (BNDES, 2008).



O etanol hidratado, com um teor de água entre 6,2% e 7,4% em massa, pode ser desidratado em uma coluna de desidratação por adição de cicloexano, por exemplo, e dar origem ao etanol anidro (VAZ JUNIOR, 2011) que, de acordo com a Resolução ANP n° 7, de 21/02/2013, deve apresentar um teor de no máximo 0,4% de água para ser utilizado como combustível.

A rota bioquímica de produção de etanol 2G a partir do bagaço e da palha de cana aproveita parte da tecnologia e infraestrutura utilizadas para produção do etanol 1G. Na realidade, são necessárias mais duas etapas adicionais ao processo convencional de forma que, a solução de açúcares produzida na hidrólise da biomassa pode ser misturada ao caldo de cana e seguir para a fermentação, como ilustra a Figura 2.2 (DIAS *et al.*, 2009).

De forma geral, as biomassas lignocelulósicas possuem sua estrutura formada por 35 a 50% de celulose  $(C_6H_{10}O_5)_x$ , 20 a 35% de hemicelulose  $(C_5H_8O_4)_m$  e 15 a 20% de lignina  $[C_9H_{10}O_3 \cdot (OCH_3)_{0.9-1.7}]_n$  (MOOD *et al.*, 2013). A celulose é um polímero linear formado por duas glicoses como unidades básicas de repetição chamadas de celobiose. A hemicelulose é uma macromolécula altamente ramificada, formada por várias moléculas de açúcares como glicoses, galactoses, manoses, arabinoses e xiloses sendo, esta última, presente em maior quantidade (BALAT *et al.*, 2008). A lignina é um polímero complexo, com estrutura predominantemente aromática, amorfo e de alta massa molar, cuja função é manter a estrutura da biomassa unida, conferindo-lhe rigidez e resistência a ataques externos. O alto poder calorífico da lignina lhe confere potencial para ser utilizada como fonte de energia (PEREIRA Jr *et al.*, 2008).

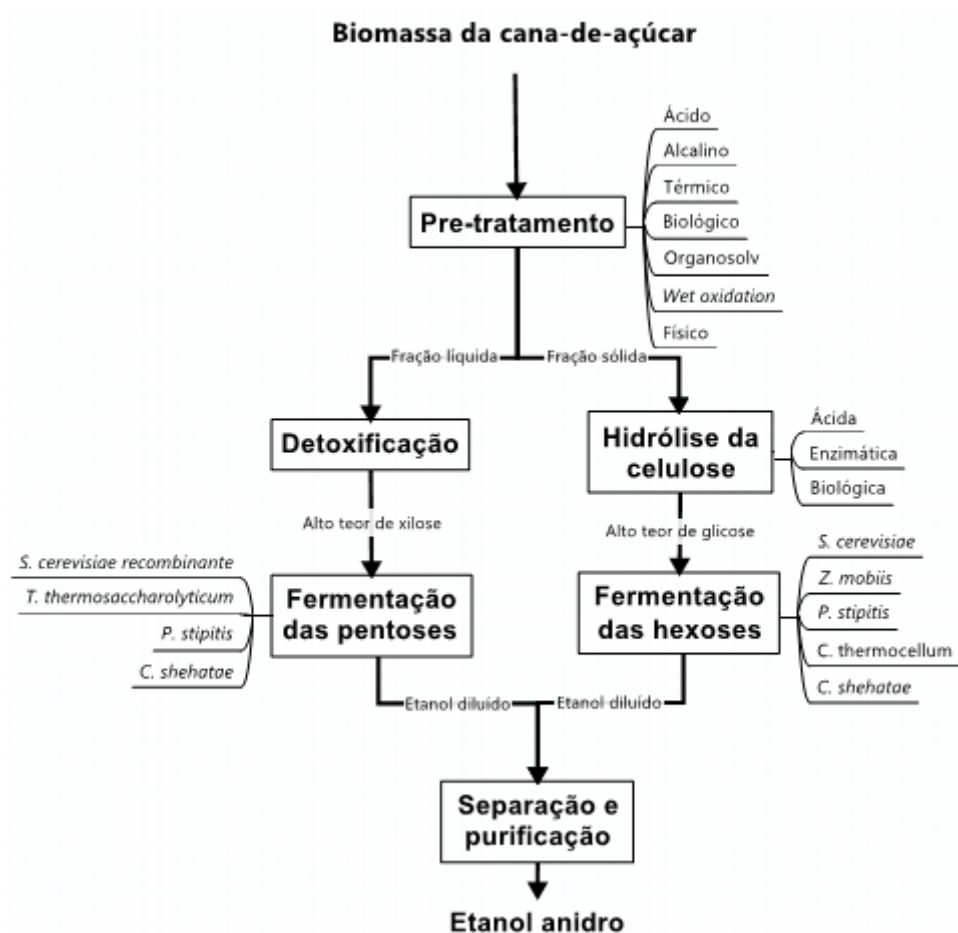


Figura 2.2: Diagrama de blocos do processo de produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa de cana-de-açúcar (adaptado de CARDONA *et al.*, 2010).

A celulose se encontra ordenada em vários agregados com regiões cristalinas e amorfas chamados de microfibrilas (LAGAERT *et al.*, 2009). As microfibrilas constituem a unidade fundamental da parede celular das plantas e estão orientadas em diferentes ângulos com espessuras distintas. Com cerca de 10 a 25 nanômetros de diâmetro, as microfibrilas se reúnem em feixes maiores, formando as fibrilas cujas principais funções são conferir sustentabilidade, rigidez e flexibilidade a planta (ALBERSHEIM *et al.*, 2011).

A parede celular, de forma geral, pode ser dividida nas três regiões distintas: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é a camada mais externa da parede e corresponde à região de interseção entre as células da planta sendo responsável por mantê-las unidas. A parede primária é composta pelas microfibrilas de

celulose e outros polissacarídeos. As microfibrilas são estruturas longas e finas, ligadas por pontes de hidrogênio. A parede secundária constitui a camada mais interna da parede celular e pode ser subdividida nas três camadas distintas: externa, média e interna (S1, S1 e S3), que se diferenciam entre si pela espessura e orientação das fibrilas de celulose (ALBERSHEIM *et al.*, 2011).

Como a estrutura da biomassa lignocelulósica não apresenta açúcares disponíveis prontos para serem fermentados, é necessária a etapa de hidrólise que consiste na transformação da celulose e hemicelulose em monômeros de açúcares, por meio de via ácida ou enzimática. A hidrólise das frações celulósica e hemicelulósica geram, principalmente, os açúcares glicose e xilose, respectivamente (AGUILAR *et al.*, 2002). Existem diversos fatores relacionados à biomassa que afetam a hidrólise enzimática, como a cristalinidade, porosidade, o grau de polimerização, o tamanho da área superficial, entre outros (RABELO, 2010).

Após essa etapa, os açúcares são fermentados a etanol. A fermentação da glicose por meio da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, usada na indústria para produção em larga escala, é um processo bem conhecido e consolidado. Entretanto, isso não acontece para o caso das pentoses, uma vez que esta levedura não é capaz de fermentar a xilose em etanol. Dessa forma, estudos vêm sendo conduzidos para tentar desenvolver geneticamente as leveduras *Sacharomyces cerevisiae* para que sejam capazes de fermentar as pentoses com desempenhos satisfatórios (HO *et al.*, 1999).

O uso da fração de lignina, que é uma macromolécula complexa de natureza aromática, para a produção de etanol não é viável. Ela geralmente é utilizada como matéria-prima para produção de energia elétrica tornando, muitas vezes, a usina autossuficiente em energia. Dessa forma, o bagaço que no processo de primeira geração é levado às caldeiras para geração de energia pode ser substituído pela lignina que é um subproduto da tecnologia de segunda geração, sem comprometer a produção de energia (BNDES, 2008).

A biomassa quando hidrolisada na sua forma natural apresenta rendimentos muito baixos, menores que 20% (MOOD *et al.*, 2013). Isso ocorre porque a biomassa possui uma estrutura celular rígida, complexa e recalcitrante à decomposição devido às características estruturais dos tecidos vegetais e às interações de natureza físico-químicas estabelecidas entre a celulose, a hemicelulose e a lignina. Assim, o pré-

tratamento visa alterar a estrutura da biomassa permitindo que a celulose se torne mais acessível à etapa subsequente que é a hidrólise enzimática (MOOD *et al.*, 2013).

Os principais objetivos do pré-tratamento são: alterar o complexo lignina-hemicelulose - celulose, reduzir a cristalinidade e aumentar sua porosidade e área superficial, tornando-a, dessa forma, mais acessível à reação de hidrólise enzimática. Além disso, um bom pré-tratamento deve preservar as pentoses para aumentar os rendimentos de etanol e evitar a formação de inibidores da fermentação (CARDONA *et al.*, 2010).

A celulose é constituída por regiões cristalinas e amorfas cujas proporções variam de um material para outro. A intensidade de frações cristalinas presentes na amostra pode ser representada pelo índice de cristalinidade. Essa característica influencia no comportamento físico e na reatividade do material, sendo que as regiões amorfas são mais susceptíveis à hidrólise enzimática devido ao arranjo mais desorganizado das moléculas e a maior distância entre as fibras, em comparação com as regiões cristalinas. Em geral, o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos é alto, sendo interessante o uso de pré-tratamentos que diminuam o índice de cristalinidade da celulose (LYND *et al.*, 2002).

A celulose é formada por centenas de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas, cujo tamanho da cadeia é representado pelo grau de polimerização. Quando maior o grau de polimerização da cadeia menor é a sua solubilidade. A hidrólise da celulose é efetuada pelas enzimas exoglucanases e endoglucanases que atuam nas extremidades e nas porções interiores da cadeia, respectivamente. A redução do grau de polimerização aumenta a quantidade de substrato para ação enzimática da exoglucanase e aumenta a solubilidade da celulose proporcionando maiores rendimentos de hidrólise (LYND *et al.*, 2002).

Grandes esforços estão sendo focados no pré-tratamento, já que esta é uma das etapas mais caras do processamento da biomassa e sua eficiência influencia fortemente os rendimentos da reação de hidrólise enzimática e, conseqüentemente, a fermentação dos xaropes de biomassa (BNDES, 2008). Neste contexto, avanços nos diferentes tipos de pré-tratamento são fundamentais. (RABELO *et al.*, 2011; KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010a).

## 2.5 Tipos de Pré-tratamentos

Existem diversos pré-tratamentos com diferentes efeitos e rendimentos e a escolha do mais adequado depende da biomassa empregada. Estes podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (MOOD *et al.*, 2013).

Cada pré-tratamento altera de forma diferente a estrutura da biomassa. Os pré-tratamentos físicos, como a moagem e a extrusão não alteram a composição da biomassa, mas alteram a sua estrutura por meio do aumento da área superficial e redução da cristalinidade. Já os tratamentos alcalinos, oxidativos, biológicos e o AFEX (*Ammonia fiber explosion*) removem, principalmente, a fração da lignina, logo a biomassa será composta majoritariamente por hemicelulose e celulose ao final do processo. O tratamento ácido, explosão a vapor e LHW (*Liquid Hot Water*) removem a hemicelulose para a corrente líquida e forma uma corrente sólida rica em celulose e lignina. Como se pode ver, o pré-tratamento escolhido define a composição da biomassa que será levada para a hidrólise (SILVA *et al.*, 2013b).

A eficiência do pré-tratamento é avaliada baseada no desempenho da hidrólise. Em geral, um bom pré-tratamento proporciona altos rendimentos e taxas de hidrólise, não gera inibidores da fermentação, tem baixo custo, não apresenta perda de carboidratos ou degradação da biomassa, possibilita a recuperação da lignina e consome pouca energia (BALAT *et al.*, 2008; SILVA *et al.* 2013b).

### 2.5.1 Físicos

Os pré-tratamentos físicos aumentam a acessibilidade das enzimas à celulose por meio de mudanças na estrutura da biomassa como o aumento da área superficial, desfibrilação e algumas vezes a redução do grau de polimerização e da cristalização, sem alterar sua composição química (ALVIRA *et al.*, 2010). Alguns pré-tratamentos físicos incluem extrusão, moagem de discos, moagem de bolas, micro-ondas e *freeze pretreatment* (MOOD *et al.*, 2013).

A moagem de bolas, um dos principais tipos de pré-tratamento físico, consiste em um tambor rotatório preenchido com biomassa e várias esferas em um meio úmido ou seco. O cisalhamento gerado entre as esferas devido à rotação do tambor é responsável pela redução do tamanho das partículas e da cristalinidade, aumentando a sacarificação da celulose (SILVA *et al.*, 2013b). Alguns autores vêm reportando elevados rendimentos de glicose, como 89,4% para palha de arroz (HIDENO *et al.*, 2009), 91% para algodão e 90% para a conífera *Douglas fir* (MILLETT *et al.*, 1979).

As principais vantagens da moagem em moinho de bolas referem-se à uma considerável redução da cristalinidade da biomassa e a não formação de inibidores. Adicionalmente não existe necessidade de lavar o material pré-tratado, diferentemente de outros processos que geram efluentes que precisam ser tratados. Entretanto, este processo tem como principal desvantagem o alto consumo energético que torna, até agora, o processo inviável economicamente (SILVA *et al.*, 2013b).

A moagem úmida com discos (WDM – *wet disk milling*) utiliza discos que giram em sentidos opostos para cisalhar e triturar a biomassa, reduzindo o tamanho das partículas e desfibrilando a biomassa. A eficiência do pré-tratamento varia de acordo com a distância entre os discos e a velocidade de rotação (SILVA *et al.*, 2013b). Apesar de apresentam rendimentos menores que a moagem em moinho de bolas, a moagem de discos apresenta menor consumo energético dentre as demais modalidades de moagem (MOOD *et al.*, 2013). No trabalho de HIDENO *et al.* (2009) a moagem de discos se mostrou promissora no pré-tratamento de palha de arroz que alcançou rendimentos, na etapa de hidrólise enzimática de 78,5 e 41,5% de glicose e xilose, respectivamente, após 10 ciclos de operação a um custo energético 20 vezes menor que o mesmo tratamento no moinho de bolas.

A extrusora que é comumente utilizada nas indústrias de polímeros e alimentos pode ser utilizada no pré-tratamento físico da biomassa (ZHANG *et al.*, 2012). A extrusora consiste em um cilindro com um ou dois parafusos giratórios em seu interior. O cisalhamento gerado entre os parafusos e as paredes do cilindro proporciona uma tensão suficiente para triturar e moer a biomassa (HJORTH *et al.*, 2011).

Apesar dos trabalhos reportados na literatura geralmente apresentarem baixos rendimentos de açúcares, como 48,3% (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2011a) e 48,79% de glicose (ZHANG *et al.*, 2011) a extrusão apresenta diversas vantagens como a não produção de efluentes, não necessidade de lavagem após o

tratamento e não produção de inibidores e, principalmente, a possibilidade de operar de forma contínua, o que é muito apropriado em escala industrial. Já os trabalhos reportados que utilizam a extrusão associada a reagentes químicos apresentam bons rendimentos de glicose, chegando a 97,5% (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2009b), 86,8% (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2011d), 86,8% (ZHANG *et al.*, 2012), 94,8% (YOO, 2011) e 89,9% (DUQUE *et al.*, 2013). Além disso, permitem empregar uma quantidade menor de reagentes químicos em relação aos tratamentos químicos convencionais, devido à boa capacidade de mistura da extrusora (SILVA *et al.*, 2013b).

## 2.5.2 Químicos

O pré-tratamento ácido também é chamado de pré-hidrólise, pois promove a hidrólise da hemicelulose e outros polissacarídeos a monossacarídeos, como xilose, manose, galactose, glicose, entre outros. Como a hemicelulose é constituída principalmente de xilana, o principal produto do tratamento ácido é a xilose (CHEN *et al.*, 2011). A remoção da fração hemicelulósica torna a celulose mais acessível às enzimas da hidrólise (BALAT *et al.*, 2008, BEHERA *et al.*, 2014) o que, geralmente, resulta em elevados rendimentos de hidrólise para este pré-tratamento (SINGH *et al.*, 2015).

Pré-tratamentos com ácido sulfúrico têm sido um dos mais utilizados devido a sua alta eficiência (CARDONA *et al.*, 2010), mas também os ácidos nítrico, clorídrico, fosfórico (BEHERA *et al.*, 2014), peracético e oxálico são opções comumente reportadas na literatura (SINGH *et al.*, 2015).

O pré-tratamento ácido pode ser conduzido em duas condições diferentes. A primeira que utiliza ácido concentrado não é tão atrativa quanto a segunda que utiliza ácido diluído, pois apresenta diversos problemas como formação de inibidores, toxicidade, corrosão e necessidade de equipamentos resistentes (SINGH *et al.*, 2015). Já o tratamento com ácido diluído, em geral com concentração de ácido entre 0,1 e 2% (m.v<sup>-1</sup>), costuma ser mais efetivo pois apresenta menor degradação de açúcares e com isso menor formação de inibidores (BEHERA *et al.*, 2014).

De forma geral, o pré-tratamento ácido apresenta alguns problemas, como formação de inibidores, corrosão dos equipamentos, alto custo de operação e manutenção (BEHERA *et al.*, 2014). Além das desvantagens já citadas, os tratamentos ácidos requerem uma etapa adicional para neutralizar a biomassa ao final do pré-tratamento e eliminar os inibidores formados. Essa etapa acrescenta custos ao processo e gera uma corrente de efluente líquida (SILVA *et al.*, 2013b).

A formação de inibidores da fermentação ocorre, principalmente, em casos de condições severas, como elevada acidez e alta temperatura (YOO, 2011). Os inibidores são formados a partir da degradação dos açúcares ou da lignina gerando produtos que podem ser classificados em três grupos: ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos. Quando isso ocorre, é preciso desintoxicar a biomassa para reduzir a concentração de inibidores, para que não haja prejuízos à fermentação (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000). A Figura 2.3 ilustra a formação de inibidores a partir da degradação dos açúcares e dos próprios constituintes da biomassa.

O pré-tratamento básico aumenta a acessibilidade da celulose principalmente através da remoção da lignina (MOOD *et al.*, 2013; BALAT *et al.*, 2008). As bases, por meio da destruição da rígida estrutura da lignina, aumentam a porosidade da celulose e reduzem seu grau de polimerização e cristalinidade (ZHANG *et al.*, 2012).

As bases mais empregadas são hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia e uréia, sendo o hidróxido de cálcio diluído o mais utilizado e o mais vantajoso devido a sua fácil manipulação e baixo custo (CHANG *et al.*, 1998). Além disso, o hidróxido de sódio apresenta um resultado mais eficiente em biomassas com teor baixo de lignina de 10 a 18% (ZHANG *et al.*, 2012).

O tratamento básico tem a vantagem de requerer condições de temperatura e pressão amenas e a degradação dos açúcares é menos intensa comparada com o tratamento ácido (ZHANG *et al.*, 2012). Entretanto, demandam um longo tempo de residência de horas e até dias (BALAT *et al.*, 2008, MOOD *et al.*, 2013) e necessitam de neutralização da lama formada ao final do processo (MOOD *et al.*, 2013).



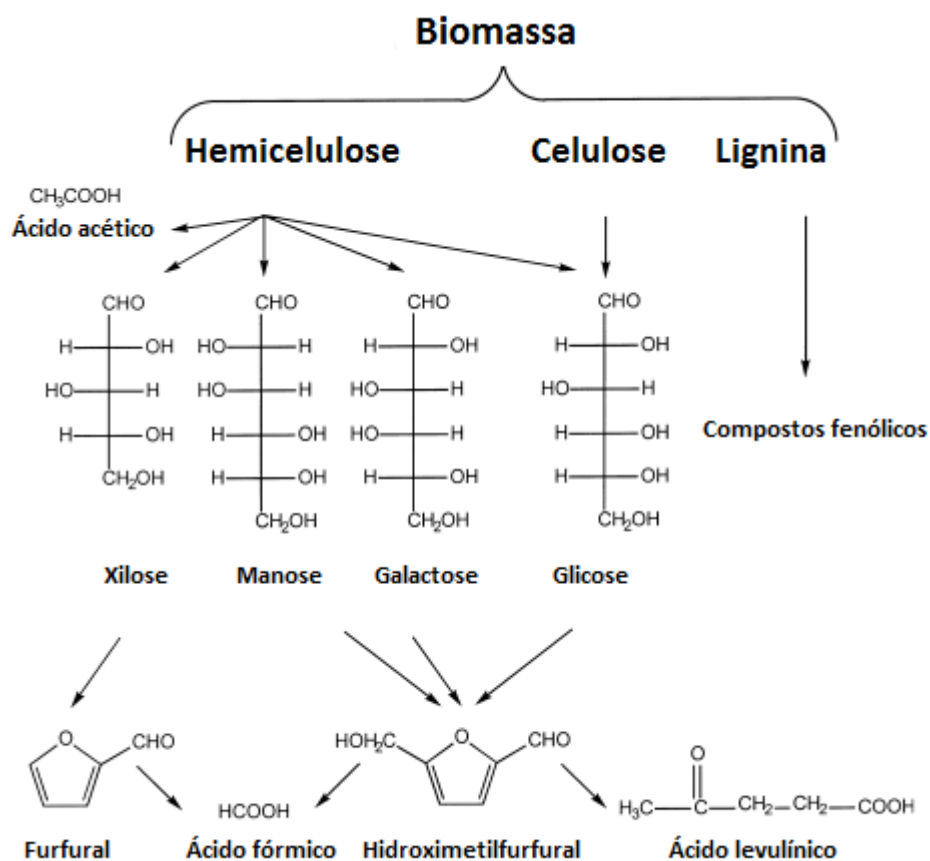


Figura 2.3: Formação dos componentes inibidores (adaptado de PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000).

Outro pré-tratamento que tem se mostrado bastante eficiente é o pré-tratamento com líquidos iônicos. Líquidos iônicos (LIs) são sais orgânicos formados por ânions inorgânicos e cátions orgânicos e são muito utilizados como solventes, pois se fundem em temperaturas relativamente baixas e possuem baixa pressão de vapor (ALVIRA *et al.*, 2010). Em comparação com os métodos mais comuns, os LIs têm apresentado resultados mais satisfatórios, devido a sua habilidade de causar mudanças significativas na estrutura cristalina da biomassa (SILVA *et al.*, 2013a) como a remoção da lignina, a redução da cristalinidade e o aumento da área superficial (SILVA *et al.*, 2013b). Alguns dos pontos positivos do seu uso no pré-tratamento são as condições de operação amenas e a fácil recuperação dos líquidos iônicos (MOOD *et al.*, 2013). Por outro lado, para obter um tratamento eficiente, é preciso uma carga de LIs por grama de sólido muito alta, geralmente 95% de solvente. Dessa forma, a utilização de LIs em larga escala não é viável devido ao seu alto custo e a necessidade de grande quantidade do solvente por

massa de substrato (SILVA *et al.*, 2013a). Além disso, pode-se citar também como desvantagem o alto gasto energético demandado para recuperação do solvente (MOOD *et al.*, 2013).

Organosolv é outro método que tem se mostrado bastante promissor no tratamento da biomassa (ALVIRA *et al.*, 2010). Este utiliza solventes orgânicos para solubilizar e remover a lignina e parte da hemicelulose. A biomassa em contato com o solvente orgânico aquoso é aquecida, podendo ainda ser utilizado um catalisador ácido ou básico (MOOD *et al.*, 2013). Podem ser utilizados solventes como metanol, etanol, acetona, etilenoglicol e álcool tetrahidrofurfuril (ALVIRA *et al.*, 2010 e MOOD *et al.*, 2013). No quesito econômico, os solventes de menor massa molecular são preferíveis devido ao seu menor custo. Os solventes devem ser recuperados para reduzir os custos e não prejudicar a fermentação. Uma das maiores vantagens é a fácil recuperação da lignina pura como coproduto do processo (ALVIRA *et al.*, 2010).

### 2.5.3 Físico-Químicos

O pré-tratamento Líquido com Água Quente (LHW – *Liquid Hot Water*) é um tipo de tratamento hidrotérmico baseado na remoção da fração hemicelulósica. O processo consiste na adição de água à biomassa a alta temperatura e alta pressão, para manter a água no estado líquido. A água pressurizada penetra na estrutura da biomassa, desintegra a matriz lignocelulósica e, devido à acidez da água a elevadas temperaturas, solubiliza e remove grande parte da hemicelulose. A acidez da água se dá em parte em decorrência dos ácidos orgânicos, principalmente ácido acético, que são liberados da estrutura da biomassa nas elevadas temperaturas e agem como catalisadores na hidrólise da hemicelulose. Ao mesmo tempo, os açúcares formados podem ser parcialmente degradados a compostos furânicos prejudicando a fermentabilidade do material gerado. Sendo assim, dependendo das condições do processo, podem ser formados inibidores como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético (MOSIER *et al.*, 2005). Ao final do processo, forma-se uma corrente sólida rica em celulose e outra líquida rica em açúcares derivados da hemicelulose. Como o pré-tratamento não utiliza reagentes químicos ou catalisadores, elimina a necessidade de se trabalhar com reatores resistentes à corrosão e de neutralizar a biomassa tratada (SILVA *et al.*, 2013b). Sua maior

vantagem é a pouca ou nenhuma produção de inibidores, porém consome grandes quantidades de água.

Outro tipo de tratamento hidrotérmico é o tratamento a vapor que é muito semelhante ao LHW exceto pelo fato de que a biomassa entra em contato com uma corrente de vapor de água. Isso torna possível empregar uma carga maior de biomassa no reator reduzindo o consumo de água, entretanto o tratamento LHW proporciona uma maior remoção de hemicelulose e menor formação de inibidores (SILVA *et al.*, 2013b).

Um dos principais pré-tratamentos para materiais lignocelulósicos é a explosão a vapor. A biomassa na presença de água é pressurizada e aquecida durante alguns minutos e, logo em seguida, sofre uma rápida descompressão. Essa mudança brusca causa uma “explosão” que rompe as ligações do material reduzindo o tamanho das partículas e aumentando sua porosidade. A explosão a vapor é também chamada de auto-hidrólise devido a sua capacidade de hidrolisar a hemicelulose e produzir açúcares. A fração líquida formada ao final do processo é rica em açúcares da hemicelulose enquanto que a fração sólida é rica em celulose e lignina. Assim como no tratamento hidrotérmico, dependendo das condições empregadas, a explosão a vapor pode formar inibidores como compostos fenólicos, furfural e HMF a partir da degradação de lignina, pentoses e hexoses, respectivamente. O processo pode ocorrer sem a presença de catalisadores químicos que geralmente resulta em um rendimento de hidrólise baixo (<65%) (BALAT *et al.*, 2008). A presença de catalisadores como CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode melhorar a sacarificação da biomassa, entretanto pode haver produção de inibidores e a necessidade de uma etapa de neutralização após o tratamento. Tem como vantagens bons rendimentos de açúcares, não necessidade de moagem prévia da biomassa (SILVA *et al.*, 2013b), baixo consumo energético e ausência de custos com tratamento de efluentes (BALAT *et al.*, 2008). Apresenta como principal desvantagem a geração de inibidores da fermentação (ALVIRA *et al.*, 2010).

A explosão da fibra com amônia (AFEX - *Ammonia fiber explosion*) tem o conceito muito parecido com a explosão a vapor. A biomassa é posta em contato com amônia a uma alta pressão, em torno de 1,72 a 2,06 MPa, e temperatura moderada, em torno de 60 a 120 °C, durante um intervalo de tempo de geralmente 30 minutos, seguido por uma rápida descompressão. Apesar de não produzir diretamente açúcares, o processo cliva as ligações entre a lignina e o complexo tornando a celulose e a hemicelulose mais acessíveis às enzimas da hidrólise (MOOD *et al.*, 2013). Tem como

desvantagem o próprio uso da amônia e a necessidade de sua recuperação, devido ao seu alto custo, bem como, por questões ambientais (SILVA *et al.*, 2013b). Tem como vantagens o baixo consumo de energia, a geração mínima de inibidores e a fácil recuperação da amônia (BALAT *et al.*, 2008).

## 2.5.4 Biológicos

O pré-tratamento biológico utiliza microorganismos, principalmente fungos, para solubilizar a lignina e removê-la da biomassa através da secreção de enzimas, sem necessidade de adição de produtos químicos ou altas temperaturas (MOOD *et al.*, 2013). A remoção da lignina torna a celulose mais acessível, favorecendo a etapa de hidrólise. Apesar de consumir pouca energia, o pré-tratamento biológico requer um tempo elevado para desconstrução da biomassa e apresenta custo elevado (MOOD *et al.*, 2013; BALAT *et al.*, 2008).

De forma geral, os pré-tratamentos descritos acima e diversos outros não citados podem ser empregados combinados uns com os outros. Essa alternativa tem o propósito de aproveitar as vantagens de ambos os pré-tratamentos e reduzir ou eliminar os problemas associados a cada um (MOOD *et al.*, 2013).

As Tabelas 2.1 e 2.2 apresentam diversos pré-tratamentos realizados sob determinadas condições específicas para o bagaço e a palha da cana-de-açúcar que são as duas biomassas utilizadas neste trabalho. As tabelas mostram também os respectivos rendimentos de glicose ( $\eta$ ) na etapa de hidrólise enzimática que dá uma indicação da eficiência do pré-tratamento.

Apesar de muitos dos pré-tratamentos apresentados nas tabelas fornecerem altos rendimentos de hidrólise, vários deles apresentam uma série de desvantagens, como produção de inibidores da fermentação, geração de efluentes ou alto gasto energético.

Tabela 2.1: Diferentes pré-tratamentos para o bagaço de cana-de-açúcar

Tipo de pré-tratamento	Reagente	Condições	$\eta$ glicose (%)	Referência
<b>Explosão a vapor</b>	SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min	86,3 (72h)	Sendelius, 2005
<b>Alcalino</b>	NaOH	10% NaOH, 90 °C, 1 h	56,23 (120h)	Zhao <i>et al.</i> , 2009
<b>AFEX</b>	amônia	120 °C, 30 min, 2:1 amônia: biomassa	70 (72h)	Krishnan <i>et al.</i> , 2010
<b>Ácido diluído</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	130 °C, 15 min, 0,5% (wt)	41,5 (72h)	Rueda <i>et al.</i> , 2010
<b>Steam-pretreated</b>	SO <sub>2</sub> / sem reagente	190 °C, 5 min / 200 °C, 10 min	80 (24h) 45 (24h)	Carrasco <i>et al.</i> , 2010
<b>Explosão a vapor</b>	CO <sub>2</sub>	205 °C, 15 min	86,6 (96h)	Ferreira-Leitão <i>et al.</i> , 2010
	SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min	79,7 (96h)	
<b>Peróxido de hidrogênio</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2% de peróxido, 60 °C e 16 h	63 (?h)	Monte <i>et al.</i> , 2011
<b>Ácido diluído e Organosolv</b>	NaOH	30% (v/v) etanol, NaOH, 195 °C, 60 min	43,2 (24h)	Mesa <i>et al.</i> , 2011
<b>Ácido diluído</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1 kg:10 L (sólido:líquido)	76 (72h)	Rocha <i>et al.</i> , 2011
	[Emim][Ac]	120 °C, 120 min, 5% sólido	98,2 (48h)	Silva <i>et al.</i> , 2011
<b>Líquidos Iônicos</b>	[Bmim][Cl]	120 °C, 120 min, 5% sólido	38,6 (48h)	
	[Amim][Cl]	120 °C, 120 min, 5% sólido	43,3 (48h)	
	[Mmim][DEP]	120 °C, 120 min, 5% sólido	61,9 (48h)	
	[Emim][Ac]	120 °C, 120 min, 5% sólido	61,9 (48h)	
<b>Líquidos Iônicos</b>	[Emim][Ac]	145 °C, 14 min, 14% sólido	69,7(total) (?h)	Yoon <i>et al.</i> , 2012

Tabela 2.1: Diferentes pré-tratamentos para o bagaço de cana-de-açúcar - Continuação

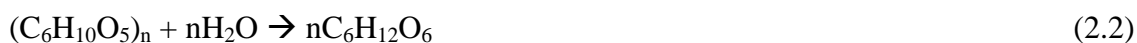
Tipo de pré-tratamento	Reagente	Condições	$\eta$ glicose (%)	Referência
Moinho de bolas	-	400 rpm, 60 min	78,7 (72h)	Silva <i>et al.</i> , 2010
WDM	-	1800 rpm, 20 ciclos	49,3 (72h)	Silva <i>et al.</i> , 2010
Ozonólise	ozônio		41,79 (24h)	Travaini <i>et al.</i> , 2013
Ozonólise + WDM	ozônio	60 min de ozonólise, 4 ciclos e 1,2 min.g <sup>-1</sup> de WDM	89,67 (72h)	Barros <i>et al.</i> , 2013
WDM + Ozonólise	ozônio	4 ciclos, 0,2 min.g <sup>-1</sup> de WDM e 60 min de ozonólise	81,1 (72h)	
LHW	-	190 °C, 18,41 min, 12,5% (v/v)	100 (72h)	Santos <i>et al.</i> , 2014

Tabela 2.2: Diferentes pré-tratamentos para a palha de cana-de-açúcar

Tipo de pré-tratamento	Reagente	Condições	$\eta$ glicose (%)	Referência
Ácido diluído	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	195 °C, 10 min, 1% (wt)	72,4 (72h)	Oliveira <i>et al.</i> , 2010
Explosão a vapor	CO <sub>2</sub>	220 °C, 5 min	97,2 (96h)	Ferreira-Leitão <i>et al.</i> , 2010
	SO <sub>2</sub>	190 °C, 5 min	91,9 (96h)	
Moinho de bolas	-	400 rpm, 90 min	77,6 (72h)	Silva <i>et al.</i> , 2012
WDM + ozonólise	ozônio	4 ciclos, 0,2 min.g <sup>-1</sup> de WDM e 60 min de ozonólise	92,4 (72h)	Barros <i>et al.</i> , 2013
Ozonólise + WDM	ozônio	60 min de ozonólise, 4 ciclos e 0,8 min.g <sup>-1</sup> de WDM	63,1 (72h)	

## 2.6 Hidrólise Enzimática

Após o pré-tratamento, a biomassa segue para a etapa de hidrólise em que suas cadeias são quebradas em açúcares fermentescíveis. A hemicelulose é convertida em pentoses, predominantemente xiloses, e a celulose é convertida em glicose (CHEN *et al.*, 2011). A reação utiliza o auxílio de um catalisador ácido ou enzimático, de acordo com a equação abaixo (BALAT *et al.*, 2008).



Existem três formas diferentes de conduzir a hidrólise: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácido diluído e hidrólise enzimática. As duas primeiras utilizam um ácido como ácido sulfúrico ou ácido clorídrico, para quebrar as cadeias de celulose e hemicelulose. (BALAT *et al.*, 2008). A hidrólise ácida, além de mais rápida que a hidrólise enzimática, não necessita de pré-tratamento (LENIHAN *et al.*, 2010).

A hidrólise com ácido concentrado alcança altas conversões e altas taxas de hidrólise (WIJAYA, *et al.*, 2014), entretanto a elevada acidez do meio provoca degradação dos carboidratos formados, produzindo furfural e HMF a partir das pentoses e hexoses, respectivamente (LENIHAN *et al.*, 2010). Como a hemicelulose se hidrolisa mais rapidamente que a celulose, seus açúcares ficam expostos no meio por mais tempo, por esse motivo, a degradação ocorre principalmente nos derivados da hemicelulose. Outras desvantagens incluem toxicidade, corrosividade, necessidade de equipamentos resistentes (WIJAYA, *et al.*, 2014) e a necessidade de recuperação e concentração do ácido para viabilidade econômica do processo (BALAT *et al.*, 2008).

A hidrólise com ácido diluído ocorre em dois estágios, sendo que no primeiro, sob condições mais amenas, o ácido diluído hidrolisa primeiramente a hemicelulose. No segundo estágio, em condições mais severas, ocorre a hidrólise da fração celulolítica da biomassa. Suas vantagens incluem alta velocidade de hidrólise e possibilidade de processo contínuo. Apesar de apresentar menor rendimento de hidrólise em relação à hidrólise com ácido concentrado, (WIJAYA, *et al.*, 2014), não necessita da etapa de

recuperação do ácido ao final do processo (ROMERO *et al.*, 2010). Uma vez que a utilização de ácido diluído requer altas temperaturas (200 a 240 °C), a formação de produtos indesejados como HMF a partir da degradação dos carboidratos é inevitável (CARDONA *et al.*, 2010).

A opção pela hidrólise enzimática ultimamente tem sido mais adotada que a hidrólise com ácidos concentrados ou diluídos (ZHU *et al.*, 2009), isso porque a hidrólise ácida apresenta alguns problemas como a corrosão causada pelo ácido concentrado, necessidade de equipamentos altamente resistentes, necessidade de correção do pH para a etapa de fermentação e produção de inibidores da fermentação (TAHERZADEH *et al.*, 2007a; SOARES *et al.*, 2011). Além disso, a hidrólise enzimática pode ser conduzida em condições amenas, apresenta menores custos com equipamentos e geralmente possui maiores conversões que a hidrólise ácida (BALAT *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2011).

Na hidrólise enzimática a reação é catalisada por um grupo de enzimas, chamadas celulasas, que agem em sinergismo para quebrar as cadeias de celulose. A reação apresenta elevados rendimentos e é conduzida em condições mais brandas se comparada ao processo de hidrólise ácida além de não apresentar problemas de corrosão. A principal desvantagem dessa técnica é o elevado custo das enzimas e o longo tempo de residência (TAHERZADEH e KARIMI, 2007b).

Existem pelo menos, três enzimas que fazem parte do complexo celulolítico atuando sinergicamente na quebra da celulose. Elas são classificadas com base na sua especificidade em relação ao substrato: 1) endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases (EG) que atacam preferencialmente as ligações internas da estrutura, produzindo oligossacarídeos de vários comprimentos, o que aumenta a quantidade de extremidades da cadeia e reduz a viscosidade do meio; 2) exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases ou celobihidrolases (CBH) que clivam os segmentos pelas extremidades reductoras e não reductoras das cadeias, liberando celobiose como produto principal e 3)  $\beta$ -glicosidase responsáveis por hidrolisar a celobiose em glicose (ANDERSEN, 2007; SOARES *et al.*, 2011).

O processo consiste basicamente de três etapas: adsorção da celulase na superfície da celulose, biodegradação da celulose em açúcares fermentescíveis e desorção da celulase (TAHERZADEH e KARIMI, 2007b).



Caso a hemicelulose se mantenha na estrutura da biomassa mesmo após o pré-tratamento, são empregadas enzimas mais complexas e específicas para sua hidrólise, chamadas hemicelulases (TAHERZADEH e KARIMI, 2007b). A xilana é o principal constituinte da hemicelulose e é hidrolisada pelas enzimas xilanases que fazem parte do complexo hemicelulolítico (BEG *et al.*, 2001).

A atividade das enzimas diminui com o tempo em parte devido à adsorção irreversível das celulasas na superfície da celulose. Além disso, a ação das enzimas EG e CBH sofre inibição com o aumento da concentração de glicose e principalmente de celobiose, por esse motivo, a  $\beta$ -glicosidase, responsável pela remoção de celobiose, tem um papel fundamental na degradação de materiais lignocelulósicos (ISAACS, 1984).

Comumente, a reação é caracterizada por uma alta taxa de hidrólise no início do processo devido à degradação da celulose que se encontra mais acessível às enzimas. Após algumas horas de reação, à medida que o acesso à celulose se torna mais difícil, a taxa de reação cai rapidamente até atingir um patamar onde toda biomassa acessível às enzimas foi consumida (BALAT *et al.*, 2008).

São vários os fatores que influenciam no rendimento da reação como, por exemplo, concentração de substrato, atividade das enzimas, características do substrato (cristalinidade, área superficial), condições da reação (temperatura, pH, velocidade de rotação, entre outras) (McMILLAN, 2004) e composição dos blends, ou seja, balanceamento das diferentes atividades que fazem parte do *pool* celulósico (ANDERSEN, 2007). Dessa forma, faz-se necessário a otimização do processo para alcançar os melhores rendimentos (McMILLAN, 2004).

## 2.7 O Pré-tratamento por Extrusão

A extrusão é considerada um pré-tratamento termo-físico que promove mudanças físicas na biomassa. As mudanças são causadas devido aos processos de cisalhamento, mistura e aquecimento a que a biomassa está sujeita durante a passagem pela extrusora. Esses efeitos causam a destruição da rígida estrutura da biomassa, o que acarreta em uma maior exposição da superfície da celulose, diminui sua cristalinidade e

umenta a porosidade, favorecendo a conversão na etapa de hidrólise (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2011b e MOOD *et al.*, 2013).

A extrusão apresenta um conjunto de vantagens que nenhum outro pré-tratamento oferece (MOOD *et al.*, 2013). É um processo contínuo que, por esse motivo, possui alta capacidade de processamento e possibilita a obtenção de um produto mais uniforme em comparação com os processos em batelada (YOO, 2011). Essas vantagens favorecem a produção de bioetanol em larga escala (LEE *et al.*, 2010b).

Outra grande vantagem é a não formação de inibidores da fermentação. Os trabalhos encontrados na literatura reportam ausência de inibidores no produto extrusado (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010a e 2011a), exceto para casos em que a extrusão é realizada em associação a outro pré-tratamento, dependendo também da temperatura utilizada (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2009b e 2011d).

As demais vantagens incluem curto tempo de residência, temperatura moderada e fácil adaptabilidade às mudanças no processo (LEE *et al.*, 2010b). Além disso, não existe necessidade de lavar o material pré-tratado, desde que o aditivo empregado não prejudique as etapas subsequentes. Com isso, não há formação de efluentes eliminando os custos com o tratamento e a disposição dos mesmos (MOOD *et al.*, 2013) Para a extrusão de materiais lignocelulósicos faz-se necessário o uso de um aditivo com o objetivo de melhorar as propriedades de fluidez do material, facilitando seu transporte. Caso contrário, podem ocorrer entupimento e degradação da biomassa, principalmente na zona de mistura (SILVA *et al.*, 2013a). Segundo SILVA *et al.* (2013b), aditivos que possuem afinidade com a celulose como, por exemplo, o glicerol, o etilenoglicol e o dimetil sulfoxido (DMSO) são boas opções, pois desfibrilam eficientemente as paredes celulósicas da biomassa facilitando seu transporte.

LEE *et al.* (2009) testaram aditivos com afinidade pela celulose na extrusão da conífera *Douglas fir*. Dentre os aditivos testados, etilenoglicol, glicerol e dimetil sulfoxido (DMSO), o que obteve maior eficiência na desfibrilação da biomassa foi o etilenoglicol com um rendimento máximo na hidrólise de 62,4% de glicose, contra rendimentos de 36,1% e 35,7% para dimetil sulfoxido e glicerol, respectivamente. Foi observado que o etilenoglicol proporcionou um produto com tamanho das fibras menor que os produtos tratados com os demais aditivos. Segundo o autor, o etilenoglicol se

intercala entre as fibras da celulose, prevenindo que as mesmas se agreguem novamente. O resultado máximo alcançado foi 6 vezes maior que o rendimento da biomassa sem tratamento. Segundo LEE *et al.* (2009) estes aditivos não apresentaram inibição às enzimas da hidrólise e por isso não causam prejuízo para esta etapa.

Outro aditivo promissor é o Tween 80, que possui ação surfactante devido a sua capacidade de alterar as propriedades superficiais dos líquidos e, por isso, geralmente utilizado para emulsificar óleo em água. A adição de Tween 80 ao pré-tratamento pode melhorar a eficiência devido a sua ação surfactante (ZHENG *et al.*, 2008). Muitos estudos indicam que a utilização de um surfactante e outros tensoativos, como o etilenoglicol, na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, melhoram sua eficiência por meio das três atuações: sua estrutura interage com a lignina formando uma barreira e impedindo que as enzimas sejam adsorvidas na lignina, formam micelas sobre as celulasas protegendo-as da desnaturação, removem parte da lignina aumentando a acessibilidade à celulose; além de ajudar na distribuição das enzimas dentre as fibras da biomassa (LEE *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2008). Segundo LI *et al.* (2012), o etilenoglicol também atua reduzindo a adsorção não produtiva de celulasas não somente na lignina, mas também na celulose.

Alguns pesquisadores realizaram a extrusão associada a tratamento químico (SILVA *et al.*, 2013a; KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2009b, 2011c, 2011d; CHEN *et al.*, 2011). Dessa forma, o uso de aditivos não foi necessário, pois o próprio solvente químico atou facilitando o transporte da biomassa. Outros pesquisadores utilizaram a água como aditivo da extrusão (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2010a, 2011b, 2011a; LAMSAL *et al.*, 2010; LEE *et al.* 2010a), entretanto o uso da água restringe a operação a temperaturas mais baixas para evitar sua evaporação.

YOO (2011) utilizou como aditivo o amido de milho, pois ele forma uma massa viscosa fundida que facilita o transporte da biomassa, durante a extrusão. Realizou também a extrusão de amostras sem o amido de milho. Para essas amostras a água substituiu o amido como aditivo, sendo assim, foi necessário aumentar a umidade da biomassa para teores que variaram de 40 a 50%. Até 80 °C a extrusão das amostras sem amido aconteceu com facilidade, entretanto nas temperaturas de 110 e 140 °C o autor relata a ocorrência de bloqueios no transporte e até mesmo a combustão da biomassa.

LEE *et al.* (2009) também realizaram a extrusão da conífera *Douglas fir* na temperatura de 40 °C, utilizando apenas água como aditivo, entretanto, o torque do equipamento excedeu sua capacidade máxima, mostrando que a água apresentou menor capacidade de transportar a biomassa que os demais aditivos.

Outro fator importante que norteia a escolha do aditivo é o seu preço no mercado. Levando-se em conta o aspecto econômico, o glicerol é vantajoso frente aos demais aditivos por se tratar de um subproduto da produção de biodiesel e, com isso, apresentar baixo custo, como mostra a Tabela 2.3, que apresenta o preço médio de exportação dos aditivos utilizados neste trabalho no ano de 2013.

Tabela 2.3: Preço médio de exportação no ano de 2013

<b>Aditivo</b>	<b>Preço médio (U\$\$ FOB/ton)</b>
Glicerol bruto	356,0
Etilenoglicol	1054,5
Tween 80	≈ 3000,0

Fonte: Aliceweb (2014)

### 2.7.1 Aspectos Gerais da Extrusão da Biomassa

A extrusão é um processo bastante antigo e muito utilizado nas indústrias de alimentos e polímeros (ZHANG *et al.*, 2012). Nesse processo, várias operações unitárias ocorrem simultaneamente, como mistura, aquecimento e corte, provocando transformações físicas e químicas (CHIRUVELLA, 1996).

O equipamento consiste, basicamente, em um cilindro que abriga em seu interior um parafuso (ou rosca) giratório. O parafuso gira por meio de um motor que permite que sua velocidade de rotação seja controlada. A matéria-prima entra por um funil de alimentação que, em geral, apresenta uma seção cilíndrica seguida por uma seção cônica (CUNHA, 1999). Quando atinge o parafuso, a matéria-prima é transportada ao longo do cilindro onde está sujeita à mistura, corte e aquecimento. Isso resulta em um desgaste considerável do material, desordenando sua estrutura rígida (HJORTH *et al.*, 2011).

O transporte ao longo do cilindro até a matriz ocorre por meio da rotação do parafuso. Um aumento na velocidade da rosca influencia no fluxo de avanço

umentando a produção. O cilindro é aquecido, geralmente, por meio de resistências elétricas que permitem que sua temperatura seja controlada. O cilindro, então, fornece calor por condução ao material que é progressivamente aquecido ao longo de sua passagem. Na maioria das vezes, existem sensores de temperatura localizados na matriz e na parede do cilindro ao longo de seu comprimento (CUNHA, 1999). No caso da biomassa, a extrusão é realizada com o material no estado sólido e deve-se tomar o cuidado para que a temperatura de aquecimento seja inferior à temperatura de degradação da biomassa.

As extrusoras podem apresentar uma única rosca ou rosca dupla. Apesar de mais caras, as extrusoras de dupla rosca apresentam maior eficiência no transporte de massa e maior capacidade de evitar a degradação do material devido sua alta eficiência de mistura. As extrusoras de dupla rosca se dividem em dois tipos: corrotantes e contrarrotantes, o primeiro para o caso em que as roscas giram no mesmo sentido, e o segundo quando giram em sentidos opostos (GOGER, 2013). Também podem ser classificadas de acordo com a interação entre as duas roscas em intercalada e não intercalada (tangencial ou separada), como mostra a Figura 2.4 (JIANG, 2008).

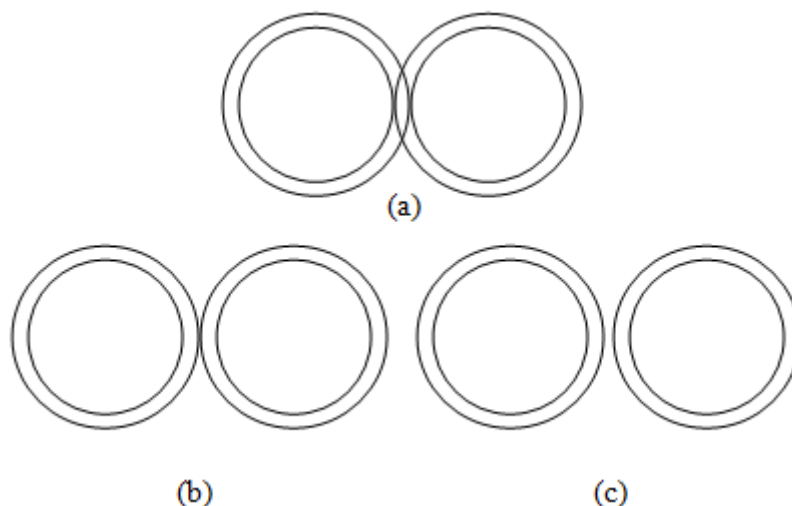


Figura 2.4: Classificação da extrusora quanto à posição dos parafusos: (a) intercalada, (b) não intercalada tangencial e (c) não intercalada separada.

Seus parafusos podem ser montados conectando-se os três tipos de elementos de parafusos: de transporte, de mistura e reverso. A escolha da configuração do parafuso

depende do objetivo da extrusão (SILVA *et al.*, 2013). O primeiro tem a função, principalmente, de transportar o material ao longo do cilindro, o reverso tem a função de transportar o material na direção contrária à saída, aumentando o tempo de residência (HIETALA *et al.*, 2011). Já os elementos de mistura formam a zona de mistura onde o material é intensivamente cisalhado entre a parede do cilindro e os parafusos, tornando-se mais homogêneo. A zona de mistura é composta por sucessivos discos ligados uns aos outros com um ligeiro ângulo de desvio entre os mesmos (ELSEY, 2012). A configuração dos discos promove um efeito de expansão e compressão do material na medida em que os parafusos giram, como é possível ver na Figura 2.5 (TODD, 1997).

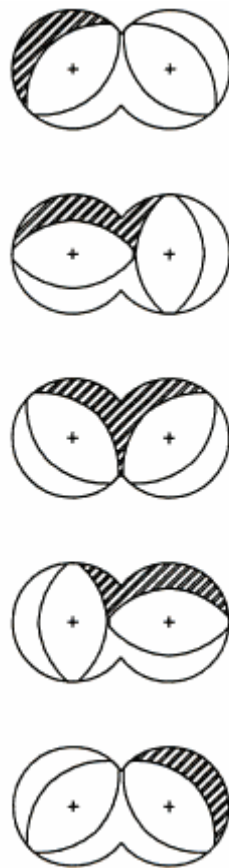


Figura 2.5: Ação dos discos na biomassa durante a rotação dos parafusos (vista de frente) (TODD, 1997).

Os discos de uma mesma zona de mistura podem estar conectados entre si com diferentes angulações. Quando ortogonais entre si não possuem capacidade de transportar material na direção axial. Quando conectados em uma angulação positiva, ou seja, na mesma direção da zona de transporte, apresentam boa capacidade de

transportar material. Já quando conectados em uma angulação negativa, transportam parte do material na direção contrária ao fluxo (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

HIETALA *et al.* (2011) investigaram a influência de diferentes configurações de parafusos na extrusão de lascas de madeira destinadas para produção de compósitos de madeira-polímero. A primeira configuração testada apresentou diversos elementos de transporte e apenas um elemento de mistura e a segunda consistiu na adição de um elemento reverso após o elemento de mistura. Seus resultados mostraram que a configuração contendo o elemento reverso proporcionou uma biomassa mais cominuída com tamanhos de fibras menores devido à maior intensidade de cisalhamento.

A eficiência do pré-tratamento, geralmente medida por meio do rendimento da hidrólise, pode sofrer influência dos parâmetros de extrusão, como a velocidade de rotação do parafuso, a temperatura do cilindro, a geometria da rosca e as condições de alimentação como vazão, solvente utilizado, teor de umidade e tamanho das partículas (KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN, 2009c). Como se pode ver adiante, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de investigar a influência dessas variáveis no desempenho do processo.

KARUPPUCHAMY e MUTHUKUMARAPPAN (2009a) e KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2010b) conseguiram um rendimento máximo de glicose de 62,5, 45,2 e 61,4% na hidrólise enzimática da casca de soja, da planta perene *Panicum virgatum* e da gramínea *Pectinata spartina*, tratadas em uma extrusora de roca única, respectivamente. Foi encontrado o xilitol, ácido acético e o glicerol em algumas amostras.

KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2010a) ao pré-tratar a palha de milho em uma extrusora de rosca única, investigaram a influência da velocidade de rotação do parafuso e da temperatura do cilindro no rendimento da hidrólise utilizando diferentes combinações de enzimas e diferentes razões entre elas. Observou que ambas as variáveis apresentaram efeitos significantes sobre a conversão, com valores ótimos de velocidade e temperatura de 75 rpm e 125°C. Nessas condições foram obtidos 75% de conversão de glicose e 49% de xilose, correspondendo a 1,97 e 1,7 vezes os rendimentos de glicose e xilose da biomassa não tratada. Como já era esperado, não foi constatada a presença de furfural e HMF nos produtos. Com o objetivo de aumentar a digestibilidade da biomassa, KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2009b)

combinaram a extrusão da palha de milho com diferentes concentrações de hidróxido de sódio. A associação dos dois pré-tratamentos se deu em sequência, de forma que, a extrusão foi realizada somente após o tratamento alcalino. A recuperação dos açúcares foi influenciada por todas as variáveis independentes, a saber, temperatura do cilindro, velocidade de rotação, concentração alcalina e tamanho da partícula. O rendimento máximo obtido foi 97,5% de glicose e 95% de xilose na condição de 180 °C, 155 rpm, 2% de NaOH e 8 mm de tamanho de partícula. Segundo os autores, a alta temperatura evaporou parte da umidade contida na biomassa intensificando o atrito; a alta velocidade ocasionou um cisalhamento mais intenso e a alta concentração alcalina proporcionou maior deslignificação. Foi constatada a presença de ácido acético nas amostras tratadas, porém, na condição otimizada, a concentração do inibidor foi muito inferior ao limite em que a inibição começa a ocorrer.

LAMSAL *et al.* (2010) obtiveram, para o farelo de trigo, melhores resultados de hidrólise por meio de extrusão quando comparada com o pré-tratamento em moinho de martelos. O mesmo não ocorreu para a casca de soja que apresentou melhores resultados no moinho de martelos. A adição de uma solução alcalina contendo hidróxido de sódio, ureia e tiourea anterior ao processo de extrusão e uma solução de cloreto de cálcio posterior à mesma não contribuíram para melhores resultados. Mesmo para as amostras tratadas sem a adição de produtos químicos, a lavagem com água após a extrusão aumentou significativamente os rendimentos de açúcares. Isso indica que a lavagem além de remover os solventes químicos, removem também substâncias que causam inibição da hidrólise. Os melhores rendimentos alcançados foram 73 e 36% para o farelo de trigo e a casca de soja, respectivamente.

KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2011b) avaliaram a influência das condições de operação (temperatura do cilindro e velocidade de rotação do parafuso) e de alimentação (tamanho de partícula e teor de umidade) no torque de uma extrusora de rosca única para diferentes tipos de biomassas lignocelulósicas. Segundo os autores, o torque está relacionado com o consumo de energia durante o processo. Os autores observaram que todas as variáveis tiveram influência significativa e negativa sobre o torque e propuseram um modelo quadrático para predição do mesmo que apresentou boa concordância com os dados experimentais. A umidade da biomassa foi o fator que exerceu maior influência no torque, de forma que, a umidade facilitou a passagem da biomassa e reduziu o torque. O aumento da temperatura do cilindro



provocou um “amaciamento” das biomassas, o que facilitou sua passagem e reduziu o torque. Entretanto, para temperaturas muito altas ocorreu a remoção de parte da umidade da biomassa aumentando o torque. Uma vez que a taxa de alimentação foi constante e independente da rotação do parafuso, em altas rotações ocorreu uma redução do fator de preenchimento dentro do cilindro e com isso a redução do torque. Dessa forma, combinações de baixa temperatura e umidade, baixa rotação e pequenos tamanhos de partículas resultaram em maiores torques e maiores rendimentos na etapa de hidrólise.

KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2011c) otimizaram o tratamento alcalino associado com a extrusão de *big bluestem*, utilizando a metodologia de superfície de resposta. A biomassa foi tratada com hidróxido de sódio e logo após, processada em uma extrusora de rosca única. As variáveis investigadas foram concentração alcalina, velocidade de rotação, temperatura do cilindro e tamanho das partículas da biomassa. Os autores propuseram um modelo de segunda ordem para predição do rendimento dos açúcares que apresentou um bom ajuste sobre os dados. Dentre os termos independentes do modelo, somente as duas primeiras variáveis influenciaram significativamente o rendimento de hidrólise, sendo que a concentração alcalina apresentou maior efeito. As demais variáveis tiveram influência nos termos de interação. De acordo com o modelo, um aumento na velocidade de rotação contribuiu positivamente, indicando que a intensidade de cisalhamento (maior em altas velocidades) é mais importante que o tempo de residência (maior em baixas velocidades). O aumento da concentração alcalina também contribuiu de forma positiva, uma vez que a deslignificação foi intensificada. Foi obtida uma recuperação máxima de açúcares de 89,9% para as seguintes condições ótimas: temperatura do cilindro de 90°C, velocidade de rotação de 155 rpm, concentração de NaOH de 2% (w/v) e tamanho de partícula de 4 mm.

KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2011a) realizaram o pré-tratamento da planta *Spartina pectinata* apenas utilizando a extrusão. Verificaram que dentre todos os fatores, apenas o teor de umidade apresentou efeito significativo e nenhum inibidor foi encontrado no produto. A condição otimizada apresentou rendimentos baixos de glicose de 48,3% e rendimentos de xilose de 77,8%. Com objetivo de aumentar esses rendimentos, KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2011d) combinaram a extrusão separadamente com o pré-

tratamento alcalino para a planta e obtiveram um rendimento de 86,8% e 84,5% de glicose e xilose, respectivamente para a seguinte condição otimizada: temperatura do cilindro de 114 °C, velocidade de rotação de 122 rpm, concentração de NaOH de 1,7% e 8 mm de partícula. O único inibidor detectado foi o ácido acético, presente em concentrações abaixo do limite de inibição. A extrusão apresentou um papel fundamental, pois a inclusão desta etapa após o tratamento alcalino praticamente dobrou o rendimento dos açúcares.

CHEN *et al.* (2011) conduziram a extrusão da palha de arroz com adição de ácido sulfúrico diluído seguido de um processo de extração com água quente. A extrusora foi utilizada com o objetivo de melhorar a dispersão e a penetração do ácido na biomassa aumentando assim a concentração de açúcares e o rendimento total da hidrólise. Como o principal objetivo do ácido diluído é solubilizar a hemicelulose e o principal componente desta é a xilana, o pré-tratamento aumentou significativamente a produção de xilose no hidrolisado. Foi constatado que a velocidade de rotação não influenciou significativamente nos rendimentos de hidrólise. A temperatura do cilindro que resultou em maiores conversões e concentração de xilose foi de 120 °C, com um decaimento grande de rendimento para temperatura de 160 °C, devido à evaporação da solução ácida. O máximo rendimento de açúcares totais alcançado foi de 80% na condição otimizada de 40 rpm com 3% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 120 °C para a etapa de extrusão e 130 °C durante 20 minutos para a etapa de extração.

ZHANG *et al.* (2011) trataram palha de milho em uma extrusora de dupla rosca sem adição de reagentes químicos e obtiveram rendimentos de no máximo 48,79 e 24,98% para glicose e xilose, que correspondem a um aumento de 2,2 e 6,6 vezes, respectivamente, em relação a biomassa não tratada. Com o objetivo de aumentar a digestibilidade da biomassa, ZHANG *et al.* (2012) realizaram esse mesmo tratamento combinado com o tratamento alcalino, utilizando diferentes concentrações de hidróxido de sódio. Apesar da velocidade de rotação dos parafusos não apresentar influência significativa no rendimento, a concentração da base apresentou forte influência, de forma que, quanto maior sua concentração, maiores foram os rendimentos de açúcares. A condição otimizada de 0,03 g de hidróxido de sódio/g de biomassa e 80 rpm apresentou rendimentos de 86,8% para glicose e 50,5% para xilose.

YOO (2011) ao comparar a extrusão de casca de soja com os pré-tratamentos químicos com ácido sulfúrico e hidróxido de sódio, observou que o processo de

extrusão forneceu os melhores resultados no rendimento da hidrólise. Também estudou a influência dos parâmetros de extrusão no processo e obteve a conversão máxima de glicose de 94,82% para a velocidade de parafuso de 350 rpm, temperatura do cilindro de 80°C e teor de umidade de 40%, contra rendimentos de 69,24% para o tratamento ácido e 93,27% para o tratamento alcalino. Entretanto, a casca de soja, mesmo sem pré-tratamento, apresentou um rendimento de hidrólise de 40,8%, que pode ser considerado um rendimento alto se comparado com outras biomassas *in natura*, devido ao seu baixo teor de lignina (aproximadamente 2,3%) (DUQUE *et al.*, 2013).

CHOI *et al.* (2012) realizaram o pré-tratamento da palha de arroz em uma extrusora de dupla rosca com adição de ácido sulfúrico diluído e comparou com o pré-tratamento somente com ácido diluído em batelada, sem a utilização da extrusora. O pré-tratamento ácido na extrusora apresentou um rendimento em glicose de 70,9%, correspondendo a 28,8% maior que o pré-tratamento em batelada, devido às tensões de cisalhamento e a capacidade de mistura da extrusora.

DUQUE *et al.* (2013) também realizaram a extrusão associada com o tratamento alcalino, utilizando hidróxido de sódio como reagente químico e palha de cevada como matéria-prima. Para isso, os autores integraram ambos os processos em apenas uma etapa contínua. Foi investigada a influência da temperatura e da razão NaOH/biomassa seca em intervalos de 50 a 100 °C e de 2,5 a 7,5% (w/w), respectivamente. Os resultados mostraram que apenas a razão NaOH/biomassa teve influência significativa nos rendimentos de hidrólise e na composição da biomassa tratada. Da mesma forma que, em baixas concentrações de base, foi observada pouca melhora na digestibilidade da biomassa. A combinação de condições severas de alta temperatura e razão de NaOH provocou um decaimento na digestibilidade enzimática, possivelmente devido a reações de repolimerização na matriz celulósica. A otimização do modelo indicou um ponto ótimo em 68 °C a uma razão de 6% de NaOH que forneceram rendimentos de 89,9% de glicose e 71% de xilose na etapa de hidrólise. Além da vantagem de altos rendimentos, os autores constataram a ausência de inibidores da fermentação no produto extrusado.

Em SILVA *et al.* (2013a) uma extrusora dupla rosca foi utilizada como um reator para o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando líquidos iônicos. Um dos problemas do pré-tratamento com líquidos iônicos é a necessidade de uma carga do solvente elevada (geralmente 5% de biomassa) para se atingir bons rendimentos de açúcares. Entretanto, os autores conseguiram rendimentos em glicose maiores que 90%

para cargas elevadas de biomassa (25%) em decorrência da capacidade da extrusora em promover uma eficiente mistura e aumentar a interação entre o solvente e a biomassa.

Os principais resultados de rendimento de glicose da revisão de literatura reportada neste tópico estão apresentados de forma resumida na Tabela 2.4 a seguir.

Tabela 2.4: Rendimentos em glicose de pré-tratamentos por extrusão

<b>Autores</b>	<b>Biomassa</b>	<b>Tratamento associado</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Karuppuchamy e Muthukumarappan (2009a)</b>	casca de soja		62,5
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2010b)</b>	<i>Panicum virgatum</i> <i>Pectinata spartina</i>		45,2 61,4
<b>Lamsal et al. (2010)</b>	farelo de trigo casca de soja		73,0 36,0
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2010a)</b>	palha de milho		75,0
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2011a)</b>	<i>Pectinata spartina</i>		48,3
<b>Zhang et al. (2011)</b>	palha de milho		48,8
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2009b)</b>	palha de milho	hidróxido de sódio	97,5
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2011c)</b>	<i>Big bluestem</i>	hidróxido de sódio	89,9
<b>Karunanithy e Muthukumarappan (2011d)</b>	<i>Pectinata spartina</i>	hidróxido de sódio	86,8
<b>Chen et al. (2011)</b>	palha de arroz	ácido sulfúrico diluído	80,0
<b>Zhang et al. (2012)</b>	palha de milho	hidróxido de sódio	86,8
<b>Choi et al. (2012)</b>	palha de arroz	ácido sulfúrico diluído	70,9
<b>Duque et al. (2013)</b>	palha de cevada	hidróxido de sódio	89,9
<b>Silva et al. (2013a)</b>	bagaço de cana	líquidos iônicos	92,9

Como se pode ver, a maioria dos trabalhos publicados analisa a extrusão da biomassa associada a outros tipos de pré-tratamento, principalmente o alcalino. Dessa forma, existe uma precariedade de informações a cerca do pré-tratamento da biomassa exclusivamente por extrusão. Além disso, não existem publicações sobre a extrusão dos

resíduos de cana-de-açúcar que é a biomassa mais utilizada para produção de etanol no Brasil e gera grandes quantidades de bagaço e palha. Sendo assim, estudos precisam ser conduzidos para se investigar os fenômenos envolvidos na extrusão da biomassa e conhecer o potencial deste pré-tratamento para a produção de etanol de segunda geração.

## 3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados nos experimentos, bem como, a descrição detalhada dos procedimentos de extrusão, de hidrólise enzimática e de caracterização da biomassa antes e após o pré-tratamento.

### 3.1 Preparo da Biomassa

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi proveniente de um lote cedido pela Usina Catanduva, localizada no estado de São Paulo e a palha proveniente de um lote cedido pela Usina Itarumã, localizada no estado de Goiás. Para reduzir a proliferação de microrganismos que causam a fermentação do material, as biomassas, inicialmente, foram espalhadas sobre uma lona e deixadas secar a temperatura ambiente durante seis dias e em seguida, foram moídas em um moinho de facas (Retsch SM 300, Alemanha) que reduz as partículas para tamanhos menores que 2,0 mm. Para eliminar resíduos de solo e reduzir os efeitos da heterogeneidade no tamanho das partículas, os materiais foram peneirados recuperando-se a fração maior que 0,20 mm e descartando-se as demais. Posteriormente foram armazenadas em bolsas fechadas.

### 3.2 Caracterização da Biomassa

Uma forma de avaliar a eficiência do pré-tratamento foi por meio da caracterização da biomassa antes e após o processo. Para a caracterização, foram realizadas análises de composição química, cristalinidade e microscopia eletrônica de varredura.

A análise de composição química consiste em quantificar o teor de carboidratos (celulose e hemicelulose), lignina e cinzas presentes na estrutura lignocelulósica e foi realizada em triplicata, de acordo com o documento *Determination of Structural*

*Carbohydrates and Lignin in Biomass* (SLUITER *et al.*, 2011). O procedimento utiliza a hidrólise ácida para fracionar a biomassa em formas mais fáceis de mensurar. Os carboidratos são hidrolisados em suas formas manométricas e quantificados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC - *high performance liquid chromatography*) (Thermo Scientific, EUA). A lignina é fracionada em sua forma solúvel e insolúvel em ácido, que são quantificadas por espectroscopia UV-Visível e gravimetria, respectivamente. O teor de cinzas foi determinado pela calcinação de uma pequena amostra de biomassa em um forno mufla.

A cristalinidade foi determinada por um difratômetro de raios-X, empregando um ângulo de  $2\theta$  com varredura de 2 a  $32^\circ$  e velocidade de  $2,00 \text{ graus.min}^{-1}$ . O índice de cristalinidade foi calculado de acordo com o método de SEGAL *et al.* (1959) por meio da Equação 3.1 em que  $I_{c+a}$  é a intensidade máxima de difração e  $I_a$  é intensidade de difração amorfa.

$$\%C = \frac{I_{c+a} - I_a}{I_{c+a}} 100 \quad (3.1)$$

A estrutura das biomassas antes e após o pré-tratamento também foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) realizada no Núcleo de Catálise (NUCAT) da UFRJ, utilizando um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 400 FEG, operando a uma tensão de 5 kV, com aumentos de 100 a 50.000 vezes. Antes de serem submetidas às análises no MEV, as amostras foram tratadas com sucessivas lavagens com água, seguidas de lavagens com álcool t-butílico para troca de solvente e, em seguida, foram liofilizadas. Após essa etapa, as amostras foram revestidas com uma fina camada de ouro para serem observadas no MEV.

### 3.3 Extrusão

Em todos os testes utilizou-se uma extrusora de dupla rosca, intercalada e com corotação formada pelos sistemas RheoDrive 7 OS e Rheomex PTW 16/25 OS (HAAKE PolyLab OS, Thermo Scientific, Alemanha) (Figura 3.1). A extrusora possui

uma razão de comprimento por diâmetro de 25:1, diâmetro do cilindro de 16 mm e 400 mm de comprimento. O cilindro consiste em seis zonas com aquecimento e resfriamento independentes entre si. É possível controlar a temperatura de cada zona, a velocidade de rotação dos parafusos e a vazão de alimentação por meio do software PolySoft OS (Thermo Scientific, Alemanha).



Figura 3.1: Sistemas RheoDrive 7 OS e Rheomex PTW 16/25 OS.

Foram empregadas vazões de alimentação proporcionais à velocidade de rotação para manter o fator de preenchimento do cilindro igual em todos os ensaios. As vazões de alimentação foram as mais altas possíveis para manter a extrusora preenchida durante a passagem, contanto que não houvesse entupimentos e/ou excesso de torque.

A extrusora está dividida em seis zonas de aquecimento ao longo do cilindro, sendo que cada zona possui um sensor de temperatura situado na parede externa do cilindro (Figura 3.2). Além disso, possui sensores que medem a pressão e a temperatura do produto na saída.



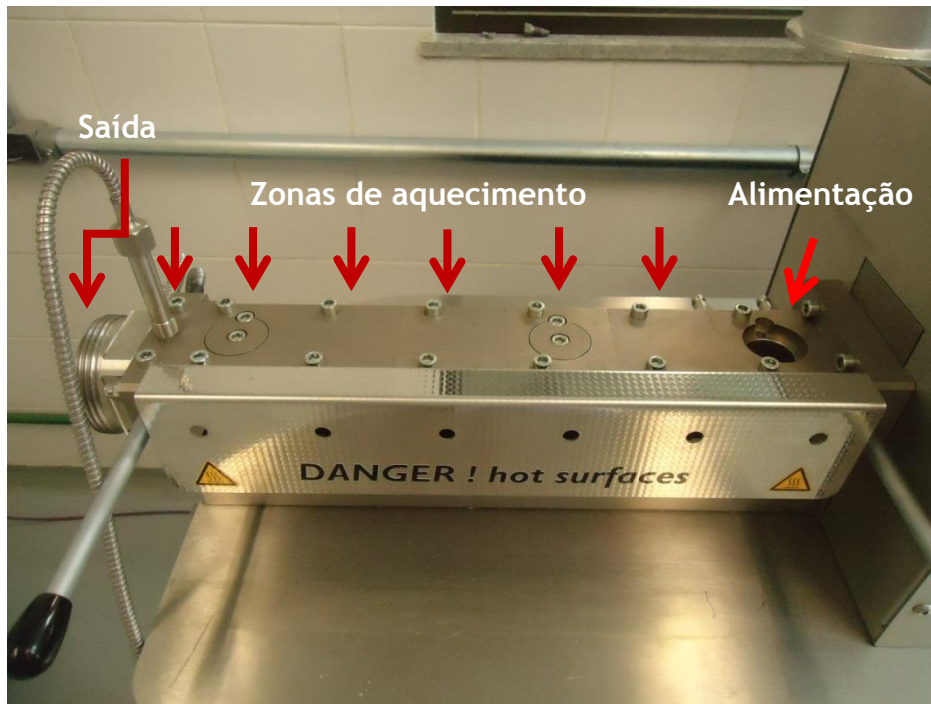


Figura 3.2: Zonas de aquecimento, alimentação e saída.

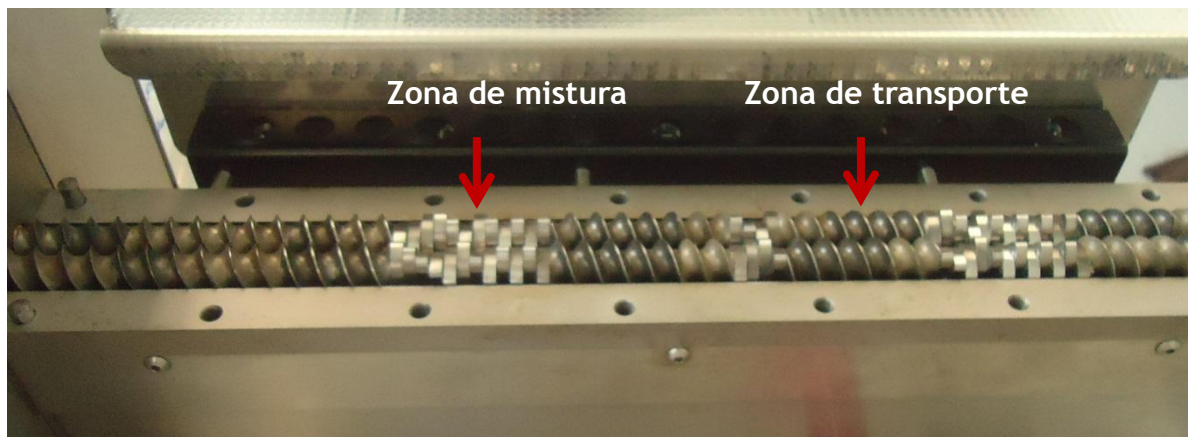


Figura 3.3: Zonas de mistura e transporte dos parafusos.

As roscas, também chamadas de parafusos, foram configuradas com elementos de transporte e de mistura, formando 4 zonas de transporte e 3 de mistura. A Figura 3.3 apresenta uma foto dos parafusos utilizados neste trabalho indicando suas zonas de mistura e transporte e a Figura 3.4 detalha suas zonas com seus respectivos comprimentos. As extrusões foram realizadas sem a utilização da matriz.

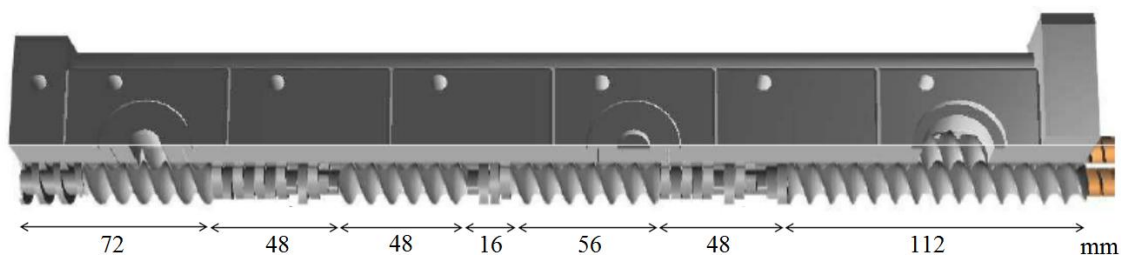


Figura 3.4: Descrição da configuração dos parafusos.

## 3.4 Ensaios Preliminares

Alguns experimentos foram conduzidos com o intuito de observar o comportamento e as características gerais da extrusão da biomassa. Esses experimentos foram importantes para definir os níveis dos fatores apresentados no planejamento experimental.

### 3.4.1 Influência dos Aditivos

Com a finalidade de viabilizar o transporte da biomassa no cilindro, foram testados quatro tipos diferentes de aditivos: água, glicerol, etilenoglicol e Tween 80, cujos pontos de ebulição são 100, 197, 290 e  $>100$  °C, respectivamente. Outro aditivo considerado promissor é o DMSO, mas este não foi utilizado neste trabalho devido a sua elevada toxicidade.

Os aditivos foram misturados com as amostras de biomassa na proporção biomassa:aditivo de 1:0,5 e mantidos 24 horas em câmara fria para permitir sua adsorção. Em seguida foram realizadas extrusões das amostras com os diferentes aditivos com as condições de operação mantidas constantes a uma velocidade de rotação igual a 30 rpm e temperatura do cilindro igual a 50 °C.

Os materiais pré-tratados foram lavados com água, para remoção do aditivo, e secos a temperatura ambiente até umidade constante determinada em um analisador de

umidade com lâmpada halógena. As amostras depois de lavadas e secas foram separadas em duas frações.

Para a primeira fração, foi realizada a hidrólise, de acordo com o procedimento descrito na Seção 3.6, com objetivo de averiguar a eficiência de cada aditivo no pré-tratamento. Aquele que apresentou maior eficiência foi adotado para os experimentos posteriores. A água foi excluída dessa seleção por apresentar baixo ponto de ebulição, sendo inadequada aos testes de extrusão em temperaturas elevadas.

Para a outra fração, também foram realizadas hidrólises, segundo o procedimento descrito na Seção 3.6, exceto pelo fato de que foram adicionados nos frascos de hidrólise os aditivos referentes a cada amostra, com o intuito de verificar se os aditivos causam algum prejuízo à hidrólise. A proporção de aditivo adicionada foi igual à proporção em que foi feita a extrusão (1 biomassa : 0,5 aditivo).

### 3.4.2 Influência do Teor de Aditivo

Para definir a proporção de biomassa/aditivo a ser empregada nos experimentos, foram realizadas extrusões preliminares com as diferentes proporções do aditivo selecionado: 0, 20, 35, 43 e 50%. As demais condições foram mantidas constantes com a velocidade de rotação igual a 30 rpm e temperatura do cilindro igual a 50 °C.

Foi realizada a hidrólise das amostras pré-tratadas, conforme descrito na Seção 3.6, para averiguar a influência do teor de aditivo no pré-tratamento. A proporção de aditivo que apresentou boa capacidade de transporte da biomassa e resultou em maior eficiência na hidrólise foi adotada para os experimentos posteriores.

### 3.4.3 Efeito dos Ciclos de Extrusão

Com o objetivo de se obter uma maior eficiência do processo, foram conduzidos experimentos em ciclos. Um lote de biomassa foi extrusado com 10 ciclos, ou seja, a biomassa na saída da extrusora foi reciclada para a entrada por um total de 10 vezes. As

condições de operação foram temperatura do cilindro a 50 °C e velocidade de rotação de 30 rpm. Para cada ciclo foi reservado uma amostra para a realização da hidrólise, de acordo com a Seção 3.6. Estes experimentos permitem observar a influência dos ciclos na eficiência do pré-tratamento.

### 3.5 Planejamento Experimental

Um planejamento experimental foi elaborado para a realização dos experimentos de extrusão visando quantificar a influência da temperatura e da velocidade de rotação das roscas, bem como a interação entre estas duas variáveis na qualidade do produto final. Assim, o estudo foi realizado por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo  $2^2$  com três repetições no ponto central para o cálculo do erro padrão. Os valores dos níveis das duas variáveis nas extremidades (níveis -1,41 e 1,41) foram baseados em dados da literatura e em experimentos preliminares e encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Definição das variáveis e seus níveis

Variável	-1,41	-1	0	1	1,41
<b>Bagaço</b>					
Velocidade de rotação (rpm)	20	32	60	88	100
Temperatura do cilindro (°C)	30	47	90	133	150
<b>Palha</b>					
Velocidade de rotação (rpm)	20	39	85	131	150
Temperatura do cilindro (°C)	30	46	85	124	140

Foram realizados 4 ensaios fatoriais (-1 e +1), mais 4 axiais (-1,41 e +1,41) e 3 repetições no ponto central (0 e 0), totalizando 11 experimentos, como mostra a Tabela 3.2. Um nível de confiança de 90% foi usado na análise estatística dos resultados devido à grande variabilidade dos bioprocessos que envolvem enzimas.

Tabela 3.2: Planejamento fatorial completo

Ensaio	Bagaço		Palha	
	Velocidade (rpm)	Temperatura (°C)	Velocidade (rpm)	Temperatura (°C)
1	32 <sup>(-1)</sup>	47 <sup>(-1)</sup>	39 <sup>(-1)</sup>	46 <sup>(-1)</sup>
2	88 <sup>(+1)</sup>	47 <sup>(-1)</sup>	131 <sup>(+1)</sup>	46 <sup>(-1)</sup>
3	32 <sup>(-1)</sup>	133 <sup>(+1)</sup>	39 <sup>(-1)</sup>	124 <sup>(+1)</sup>
4	88 <sup>(+1)</sup>	133 <sup>(+1)</sup>	131 <sup>(+1)</sup>	124 <sup>(+1)</sup>
5	20 <sup>(-1,41)</sup>	90 <sup>(0)</sup>	20 <sup>(-1,41)</sup>	85 <sup>(0)</sup>
6	100 <sup>(+1,41)</sup>	90 <sup>(0)</sup>	150 <sup>(+1,41)</sup>	85 <sup>(0)</sup>
7	60 <sup>(0)</sup>	30 <sup>(-1,41)</sup>	85 <sup>(0)</sup>	30 <sup>(-1,41)</sup>
8	60 <sup>(0)</sup>	150 <sup>(+1,41)</sup>	85 <sup>(0)</sup>	140 <sup>(+1,41)</sup>
9	60 <sup>(0)</sup>	90 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>
10	60 <sup>(0)</sup>	90 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>
11	60 <sup>(0)</sup>	90 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>	85 <sup>(0)</sup>

As demais condições experimentais utilizadas no planejamento experimental foram determinadas nos ensaios preliminares, a saber, aditivo, teor de aditivo e número de ciclos. Quanto à vazão de entrada, decidiu-se trabalhar mantendo-se o mesmo fator de preenchimento para todos os experimentos. A vazão empregada para a menor velocidade de rotação utilizada, 20 rpm, foi de 1 g.min<sup>-1</sup> para ambas as biomassas. Dessa forma, para manter o fator de preenchimento igual em todos os experimentos, a vazão de entrada foi proporcional à velocidade de rotação de cada experimento, de acordo com a Tabela 3.3. De um ciclo para outro, foi possível aumentar a vazão de entrada cerca de 50% devido à maior facilidade de transporte da biomassa.

Tabela 3.3: Vazões de entrada no 1º ciclo dos ensaios experimentais

Velocidade de rotação (rpm)	Vazão de entrada (g.min <sup>-1</sup> )
20	1,00
32	1,60
39	1,95
60	3,00
85	4,25
88	4,40
100	5,00
131	6,55
150	7,50

As amostras de bagaço e palha *in natura* e pré-tratadas foram hidrolisadas em triplicata por um período de 72 horas, sendo o rendimento de conversão de celulose em glicose o parâmetro dependente a ser avaliado.

Os resultados de 24 horas de hidrólise enzimática foram analisados no *software* STATISTICA versão 7.0 para regressão e para análise gráfica por meio de superfícies de resposta que permitem visualizar a interação entre as variáveis. Pontos em condições ótimas foram selecionados e realizaram-se a extrusão e ensaios em triplicada de hidrólise, de acordo com a Seção 3.6, para validar os modelo empírico obtido.

O ajuste do modelo estatístico aos dados experimentais foi expresso pelo coeficiente de determinação,  $R^2$ . Para avaliar quais fatores apresentam significância estatística foi realizada a análise de variância (ANOVA) e foram considerados significativos os parâmetros com p-valores menores que 0,1. Por fim, para verificar a adequabilidade do modelo foi realizado o teste F.

### 3.6 Efeito da Configuração dos Parafusos

Além da conformação original dos parafusos, duas novas configurações foram testadas para verificar suas influências na sacarificação das biomassas. Cabe destacar que a segunda alteração foi realizada sem que a alteração anterior fosse desfeita.

A primeira modificação foi realizada alterando-se os ângulos da segunda zona de mistura de forma a simular um elemento reverso (Figura 3.5). Dessa forma, ao chegar a esta zona, parte do material é empurrado na direção contrária ao transporte, ou seja, na direção do alimentador e parte segue na direção do fluxo.

A segunda alteração consistiu em adicionar um elemento reverso ao final da terceira zona de mistura, como ilustra a Figura 3.6. O elemento reverso tem a função de empurrar o material para a direção contrária ao transporte, conduzindo-o novamente para a zona de mistura que se encontra imediatamente anterior a ele.

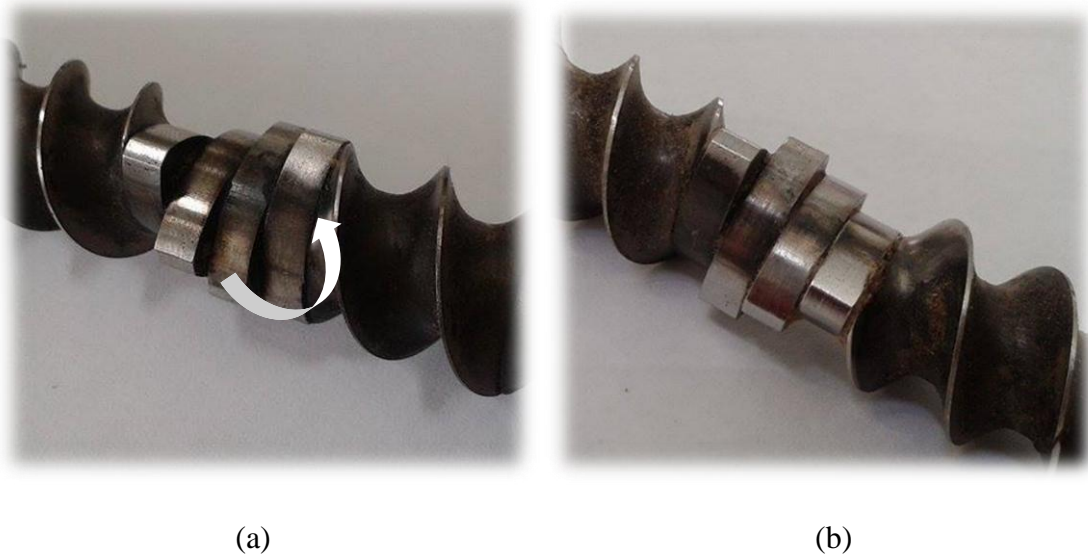


Figura 3.5: (a) Configuração original e (b) mudança da angulação da segunda zona de mistura dos parafusos.

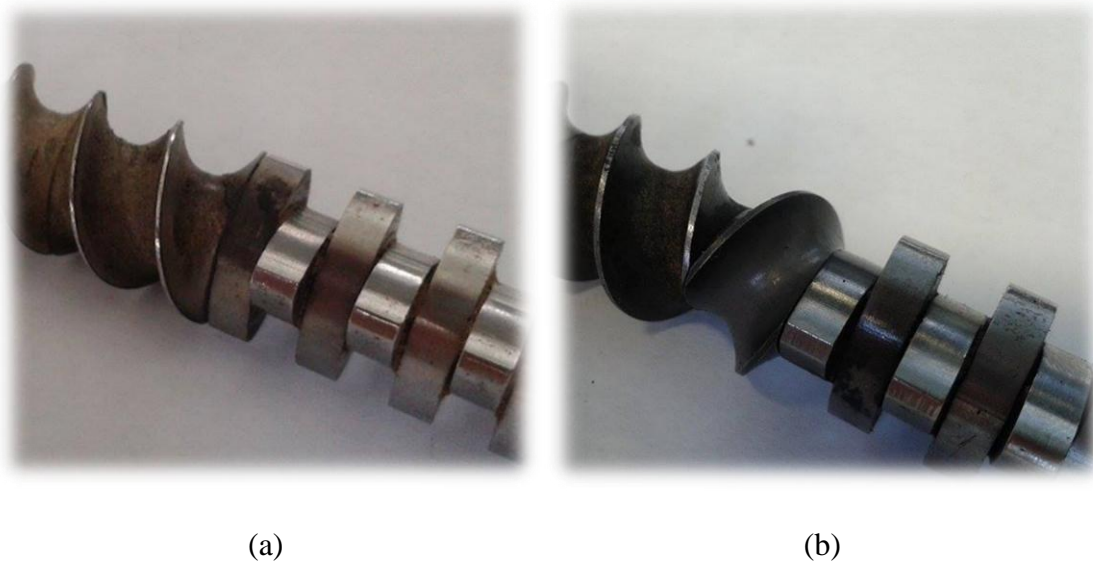


Figura 3.6: (a) Configuração original e (b) inserção do elemento reverso ao final da terceira zona de mistura.

Após cada modificação, foram realizadas extrusões para o bagaço e para a palha em condições escolhidas de acordo com os resultados dos experimentos antecedentes. Foram selecionadas quatro amostras diferentes para realizar as extrusões nas novas configurações. As amostras escolhidas e as condições de cada extrusão estão descritas

na Tabela 3.4. Em seguida, hidrólises dos materiais processados foram conduzidas em triplicata para cada ciclo.

Os sobrenadantes hidrolíticos das amostras de palha e bagaço com glicerol tratadas com a inserção do elemento reverso foram levados para análise de inibidores em HPLC. Estas amostras foram escolhidas, pois apresentaram coloração mais escura que as demais indicando possível degradação dos componentes da biomassa.

Tabela 3.4: Condições utilizadas nas extrusões com as novas configurações de parafusos

<b>Amostra</b>	<b>Condições</b>
<b>Bagaço + glicerol</b>	150 °C, 150 rpm, 43% de glicerol, 3 ciclos
<b>Palha + glicerol</b>	85 °C, 85 rpm, 35% de glicerol, 3 ciclos
<b>Bagaço com alta umidade</b>	50 °C, 30 rpm, 50% de umidade, 3 ciclos
<b>Palha com alta umidade</b>	50 °C, 30 rpm, 50% de umidade, 3 ciclos

### 3.7 Hidrólise Enzimática

Após a extrusão, as amostras, tanto dos ensaios preliminares quanto do planejamento experimental, foram lavadas com água para retirada de aditivo e secas a temperatura ambiente. Apesar da presença dos aditivos não representar risco às enzimas da hidrólise (LEE *et al.*, 2009), a retirada dos aditivos por meio da lavagem foi importante, pois caso contrário, não seria possível pesar com exatidão a massa seca de biomassa. Isso porque não se sabia ao certo a quantidade de aditivo presente nas amostras extrudadas, pois após a extrusão uma parcela de aditivo poderia ter se perdido nas paredes do cilindro e do parafuso, ou então, a biomassa poderia não estar com uma quantidade de aditivo uniforme em toda sua massa.

Após secas, as amostras foram submetidas à hidrólise enzimática (Figura 3.7) em triplicata, utilizando uma concentração de 5% de biomassa seca. Essa baixa carga de sólidos foi empregada com objetivo de eliminar problemas de transferência de massa que podem prejudicar a eficiência da hidrólise quando a concentração sólido:líquido é alta.



Uma vez que a hidrólise enzimática da celulose ocorre entre 45 e 55 °C e com pH entre 4 e 5 (SADDLER e GREGG, 1998), as condições de temperatura e pH utilizadas em todos os experimentos foram 50 °C e pH 4,8. A agitação e o tempo total de reação foram 200 rpm e 72 horas e para regular o pH do meio foi utilizado um tampão de citrato de sódio de 100 mM. Também foi adicionada azida de sódio para inibir o crescimento de micro-organismos e evitar contaminação.



Figura 3.7: Hidrólise enzimática.

A uma proporção de 15 FPU (*Filter Paper Unit*, baseado no ensaio de FPase descrito na Seção 3.7) por grama de biomassa, foi empregada a enzima comercial *Acremonium Cellulase* derivada do *Acremonium cellulolyticus* (Meiji Seika Co, Japão) que é capaz de produzir celobihidrolase,  $\beta$ -glicosidade, endoglucanase e pequenas quantidades de xilanase (PARK *et al.*, 2011).

A concentração de açúcar no meio reacional foi medida ao longo do tempo de reação. Para isso, foram retiradas alíquotas em 3, 6, 9, 24, 48 e 72 horas que foram imediatamente aquecidas em água fervente durante 5 minutos para inativar as enzimas e finalizar a reação. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas e no sobrenadante foi feita a leitura de glicose em Bioanalizador (YSI 2700 SELECT™ Biochemistry Analyzer). O método analítico do bioanalizador utiliza uma enzima chamada glicose oxidase imobilizada em membrana que é responsável por catalisar a reação de oxidação

da glicose presente na amostra com oxigênio atmosférico. A concentração da glicose é, então, calculada estequiometricamente por meio da quantificação, por método eletroquímico, do peróxido de hidrogênio formado durante a reação.

Para eliminar a possível interferência de açúcares presentes na biomassa ou na carga de enzimas, foram realizados ensaios de controle de substrato e de enzima. Estes ensaios são idênticos aos ensaios de hidrólise, exceto pelo fato de que no primeiro está ausente a carga de enzima e no segundo está ausente a carga de substrato. O volume da carga ausente de enzima foi substituído pelo volume equivalente de tampão.

O rendimento da reação ao longo das 72 horas foi calculado, de acordo com a Equação 4.2, utilizando como base as concentrações de açúcares presentes na biomassa *in natura* que foram determinadas na caracterização.

$$\eta = \frac{C_{\text{açúcar}} \times f_{\text{açúcar}}}{C_{\text{biomassa in natura}} \times \% \text{ de celulose na biomassa in natura}} \times 100 \quad (3.2)$$

em que  $\eta$  é o rendimento de glicose,  $C_{\text{açúcar}}$  é a concentração de glicose absoluta obtida após a hidrólise enzimática,  $f_{\text{açúcar}}$  é o fator de conversão da celulose em glicose (0,9) calculado através da estequiometria da reação,  $C_{\text{biomassa in natura}}$  é a concentração de biomassa *in natura* e X% é a porcentagem de celulose na biomassa *in natura* determinada na etapa de caracterização da biomassa.

### 3.8 Determinação da Atividade de FPase

A atividade de FPase, expressa em FPU/mL, foi determinada de acordo com as recomendações da IUPAC (GHOSE, 1987). O método utiliza tiras de papel de filtro como substrato e mede a concentração dos açúcares redutores liberados durante a sua degradação.

Uma mistura reacional contendo o extrato enzimático e uma tira de papel de filtro Whatman n°1 tamponados em pH 4,8 com tampão citrato de sódio foi incubada a 50 °C. Após uma hora, a reação foi interrompida pela adição do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) e então fervida por 5 minutos e resfriada em um banho de gelo. A

concentração dos açúcares ao final da reação foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm, utilizando uma curva padrão de glicose.

### 3.9 Fermentação do Hidrolisado

A fermentação do xarope de hidrolisado enzimático de biomassa foi realizada com objetivo de verificar se o glicerol na concentração empregada é capaz de prejudicar o rendimento de etanol nessa etapa.

O glicerol, conhecido como osmoprotetor, em situações de grande pressão osmótica causada por concentrações elevadas de algum componente do meio de fermentação, é sintetizado e secretado pelas células como forma de proteção do estresse osmótico. Dessa forma, a célula deixa de produzir etanol como produto principal, passando a produzir preferencialmente glicerol. Segundo YOO *et al.* (2012), o glicerol é não é diretamente tóxico aos fungos da fermentação, mas em altas concentrações é capaz de gerar um estresse osmótico das células e prejudicar a produtividade de etanol na fermentação, entretanto, segundo o autor, isso foi observado somente em concentrações maiores que 100 g.L<sup>-1</sup>. Sabendo disso, foram realizados testes para avaliar se as concentrações de glicerol encontradas no hidrolisado (aproximadamente 21 g.L<sup>-1</sup>) seriam capazes de provocar inibição.

Dessa forma, foram conduzidos ensaios utilizando três substratos distintos:

- Xaropes de biomassa obtidos a partir da palha tratada nas condições da Seção 3.6, utilizando água como aditivo;
- Xaropes de biomassa obtidos a partir da palha tratada nas condições da Seção 3.6, utilizando água como aditivo e com adição de glicerol antes da hidrólise, na proporção de 43% de gramas de glicerol por grama de biomassa.
- *Condição controle:* glicose industrial e adição de glicerol a uma concentração de aproximadamente 21 g.L<sup>-1</sup>.

Por comparação entre os resultados de rendimento de etanol a partir do primeiro e segundo substratos citados é possível avaliar se o glicerol, na concentração empregada, é capaz de inibir a fermentação.

Inicialmente, os xaropes de biomassa, com e sem glicerol, continham uma concentração de glicose de aproximadamente 13 g.L<sup>-1</sup>. Estas soluções foram concentradas adicionando-se melão até atingir 4% (40 g.L<sup>-1</sup>) de açúcares (sacarose + frutose + glicose) na solução fermentativa. Para a condição controle, o meio foi composto por glicose industrial + sacarose, na mesma proporção.

A cepa industrial CAT-1 (*Sacharomyces cerevisiae*) pré-inoculada por um período de 10 a 12 horas foi utilizada nos testes de fermentação. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 25 mL com 12,5 mL (50%) de meio fermentativo contendo 0,4%  $KH_2PO_4$ , 0,4%  $(NH_4)_2SO_4$ , 4% açúcar (sacarose + glicose). Os frascos foram tampados com algodão envolvido com gaze e a fermentação foi conduzida por 24 horas em estufa a 30 °C.

Alíquotas da solução nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8 e 24 horas foram coletadas para quantificação de etanol, açúcares (celobiose, glicose, xilose, galactose e arabinose) e inibidores (glicerol, xilitol, ácido acético, ácido láctico, etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural) em HPLC. O rendimento da fermentação foi calculado de acordo com a Equação 3.3,

$$R\% = \frac{C_{etanol} \times f_{etanol}}{C_{glicose}} \times 100 \quad (3.3)$$

em que  $C_{etanol}$  é a concentração de etanol após a fermentação,  $C_{glicose}$  é a concentração inicial de glicose e  $f_{etanol}$  é o fator de conversão da glicose em etanol (1,95) determinado por meio da estequiometria da reação.

### 3.10 Determinação do Consumo Energético

Com o intuito de avaliar o gasto energético da extrusora, como indicador da viabilidade do processo, a energia mecânica específica consumida durante as extrusões foi calculadas de acordo com as equações que seguem.

$$P(W) = 220V \times I(A) \times \sqrt{3} \quad (3.4)$$

$$EME_b \left( \frac{kJ}{g} \right) = \frac{P(kW)}{\dot{m} \left( \frac{g}{s} \right)} \quad (3.5)$$

$$EME_g \left( \frac{kJ}{g} \right) = \frac{P(kW) \times fa\acute{c}ucar}{\dot{m} \left( \frac{g}{s} \right) \times \% \text{ de celulose na biomassa in natura} \times \eta} \quad (3.6)$$

em que P é a potência, I é a corrente,  $\dot{m}$  é a vazão mássica,  $EME_b$  e  $EME_g$  é a energia mecânica por grama de biomassa processada e glicose produzida, respectivamente.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados e a análise dos mesmos acerca da extrusão do bagaço e da palha de cana-de-açúcar. Mostra-se a influência das principais variáveis de operação e da geometria do sistema sobre a eficiência do pré-tratamento.

### 4.1 Preparação e Caracterização Química da Biomassa *in natura*

Antes de iniciar os experimentos, o bagaço e a palha foram expostos dentro do laboratório à temperatura ambiente para secagem. Com seis dias de secagem, as biomassas atingiram um teor de umidade estável de  $10,40 \pm 0,37\%$  para o bagaço e  $12,05 \pm 0,36\%$  para a palha. Após esta etapa, seguiram para o moinho de facas que reduziu as partículas para tamanhos menores que 2,0 mm e utilizando-se uma peneira, recuperou-se a fração maior que 0,20 mm. A Figura 4.1 ilustra as biomassas antes e após a moagem.

Realizou-se também a caracterização química do bagaço e da palha de cana-de-açúcar *in natura*, conforme descrito na Seção 3.2, com o objetivo de quantificar seus teores de celulose, hemicelulose e lignina e os resultados são apresentados na Tabela 4.1. Os valores representam a média e o desvio padrão dos ensaios em triplicata.

Tabela 4.1: Caracterização química das biomassas

Componente	Composição (% base seca)	
	Bagaço	Palha
Celulose	$39,9 \pm 0,587$	$39,53 \pm 0,084$
Hemicelulose	$28,34 \pm 0,012$	$29,40 \pm 0,019$
Lignina	$20,39 \pm 0,124$	$20,74 \pm 0,906$
Cinzas	$3,39 \pm 0,410$	$3,17 \pm 0,014$
Outros	7,98	7,48

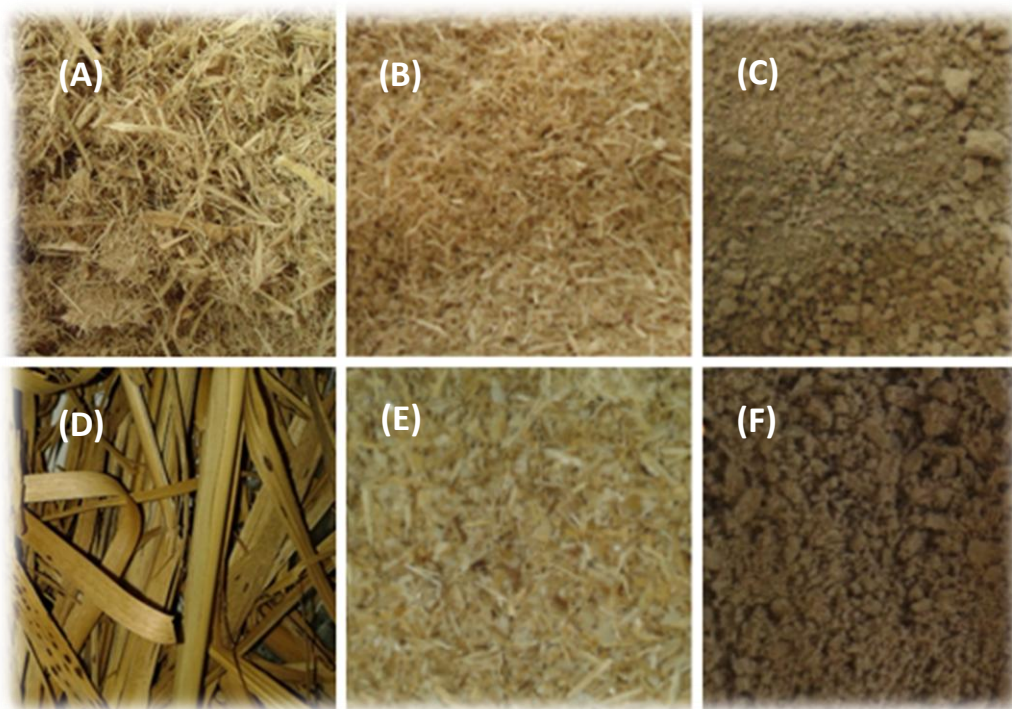


Figura 4.1: Bagaço antes (a) e após (b) a moagem e após o pré-tratamento (c) e palha antes (d) e após (e) moagem e após o pré-tratamento (f).

Apesar de constituírem dois materiais diferentes e advindos de usinas distintas, o bagaço e a palha apresentaram uma composição química muito semelhante. Dados da literatura mostram que o bagaço de cana produzido no Brasil apresenta de 38,4 a 45,5% de celulose, 22,7 a 27% de hemicelulose e 19,1 a 32,4% de lignina e a palha de cana produzida no Brasil apresenta de 33,3 a 36,1% de celulose, 18,4 a 28,9% de hemicelulose e 25,8 a 40,7% de lignina (CANILHA *et al.*, 2012). O resultado da caracterização mostra que o bagaço utilizado neste trabalho possui uma composição dentro da faixa de valores encontrada na literatura. Já a palha apresenta teores de celulose e hemicelulose um pouco elevados e o teor de lignina abaixo da faixa de valores encontrada na literatura. Entretanto, sabe-se que a composição das biomassas varia segundo diversos fatores como, por exemplo, localização, tempo de estocagem, estação do ano e maturidade da planta.

De acordo com a Tabela 4.1, 68,24 e 68,93% da composição do bagaço e da palha, respectivamente, constituem matéria-prima (celulose e hemicelulose) para produção de açúcares fermentáveis, o que indica seu grande potencial para produção de etanol.

## 4.2 Ensaios Preliminares

Os ensaios preliminares foram importantes, pois permitiram definir com maior confiança os níveis do planejamento experimental e as melhores condições a serem adotadas para a extrusão.

Para os ensaios preliminares optou-se por considerar apenas o açúcar fermentescível glicose como produto da hidrólise para avaliar a eficiência do pré-tratamento por meio do cálculo de seu rendimento, desconsiderando-se assim os demais açúcares produzidos.

Os ensaios preliminares constituíram-se de experimentos que avaliaram a influência de diferentes tipos de aditivos, diferentes teores de aditivos e extrusões em ciclos e seus resultados estão descritos nos tópicos que seguem.

### 4.2.1 Aditivos

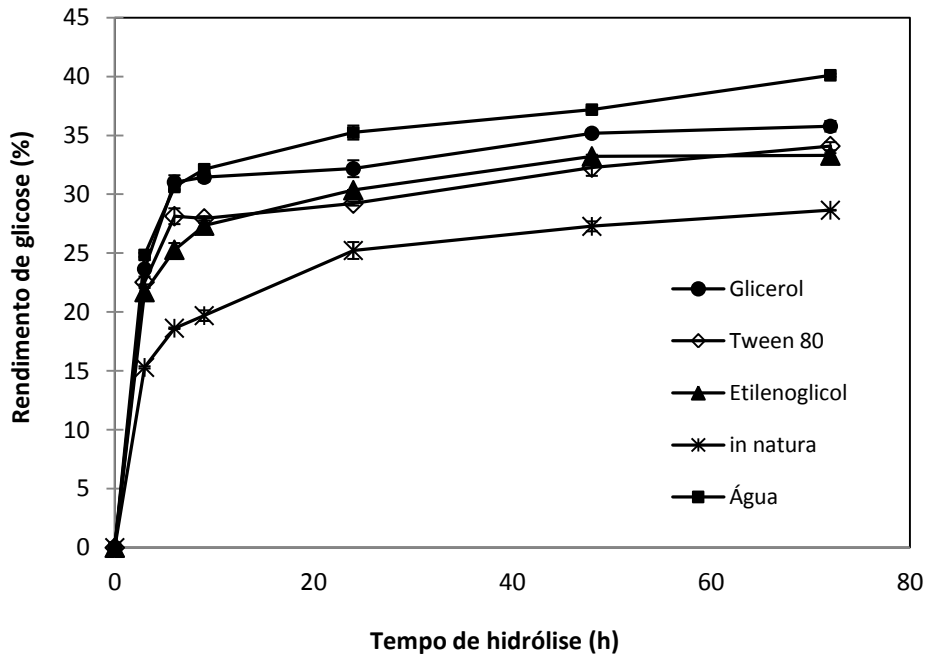
Os resultados a seguir mostram o rendimento de glicose para hidrólises com 72 horas de reação de amostras de bagaço e palha pré-tratadas na extrusora com quatro aditivos distintos, água, glicerol, Tween 80 e etilenoglicol, na proporção biomassa:aditivo de 1:0,5 (m:m).

De acordo com a Figura 4.2, a água se mostrou mais eficiente como aditivo do bagaço, alcançando, para 72 horas de reação, um rendimento de 40,1% contra rendimentos de 35,7, 34,0 e 33,2 % para o glicerol, Tween 80 e etilenoglicol, respectivamente. Apesar disso, adotou-se o glicerol como aditivo, pois este apresenta alto ponto de ebulição, o que é indispensável para as extrusões posteriores que fazem uso de temperaturas elevadas.

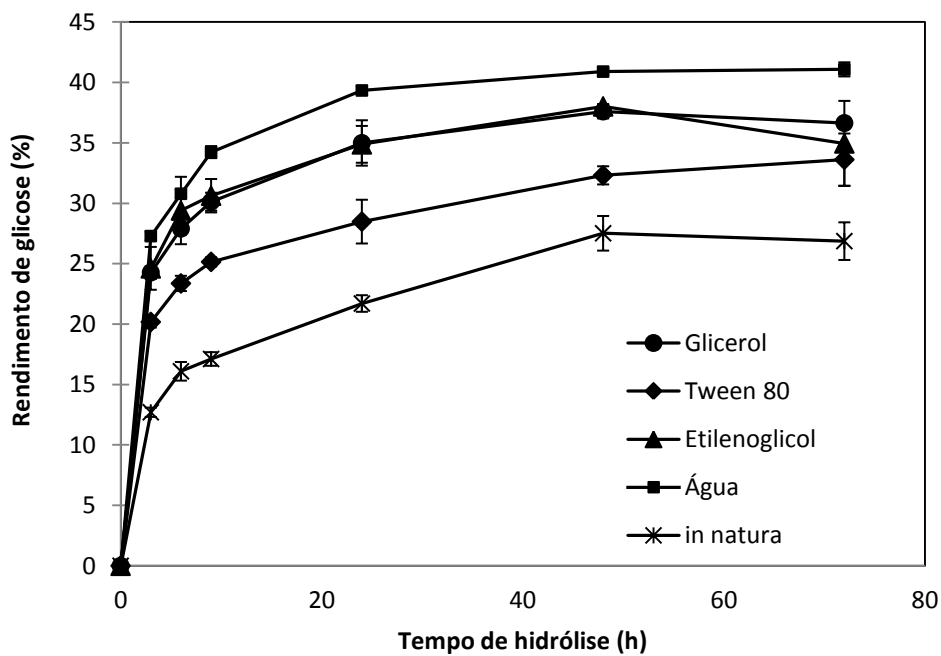
No caso da palha, o glicerol e o etilenoglicol apresentaram rendimentos muito semelhantes até 48 horas de hidrólise, chegando a 37,6 e 38,1 %, respectivamente. A partir de 48 horas o rendimento da amostra tratada com etilenoglicol caiu, possivelmente devido a alguma contaminação que consumiu a glicose presente no meio. Apesar de o etilenoglicol apresentar um rendimento ligeiramente superior em 48 horas,



optou-se por utilizar o glicerol, devido ao seu baixo preço frente ao Tween 80 e ao etilenoglicol, uma vez que este pode ser obtido como subproduto da fabricação de biodiesel.



(a)



(b)

Figura 4.2: Influência dos diferentes aditivos para o bagaço (a) e palha de cana (b).

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, a extrusão de *Douglas fir* em LEE *et al.* (2009) se mostrou muito mais eficiente com etilenoglicol em comparação com o glicerol, com rendimento 1,7 vezes maior para o primeiro em relação ao segundo. Isso mostra que cada biomassa apresenta um comportamento característico para cada pré-tratamento, portanto não é possível generalizar um resultado para todas as biomassas.

Apesar de haver relatos que mostram que os aditivos utilizados não prejudicam a hidrólise enzimática (LEE *et al.*, 2009; ZHENG *et al.*, 2008), decidiu-se realizar a hidrólise das amostras lavadas com e sem a presença dos mesmos com o finalidade de verificar suas influências na etapa de hidrólise enzimática. O volume da carga ausente de aditivo foi substituído pelo volume equivalente de tampão. A Figura 4.3 mostra os rendimentos destas hidrólises no tempo de 72 horas.

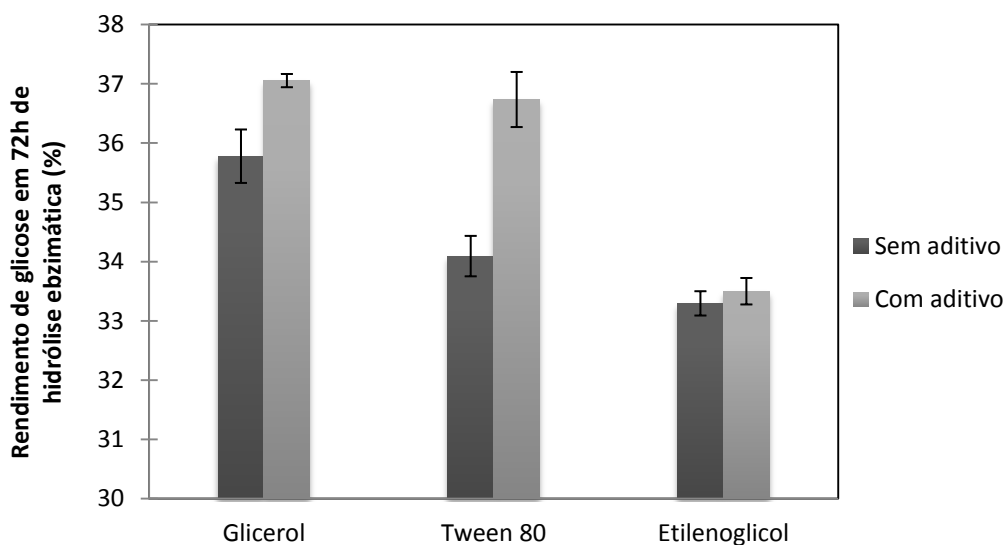


Figura 4.3: Influência dos aditivos na hidrólise enzimática.

Observa-se que a presença de glicerol e Tween 80 provocou uma melhoria do rendimento de glicose. O Tween 80 foi o que apresentou melhor atuação sobre a hidrólise, aumentando o rendimento de glicose 7,7% com relação à sua amostra sem aditivo. Apesar disso, as hidrólises das amostras com a presença dos aditivos glicerol e Tween 80 apresentaram rendimentos iguais, considerando o erro experimental.

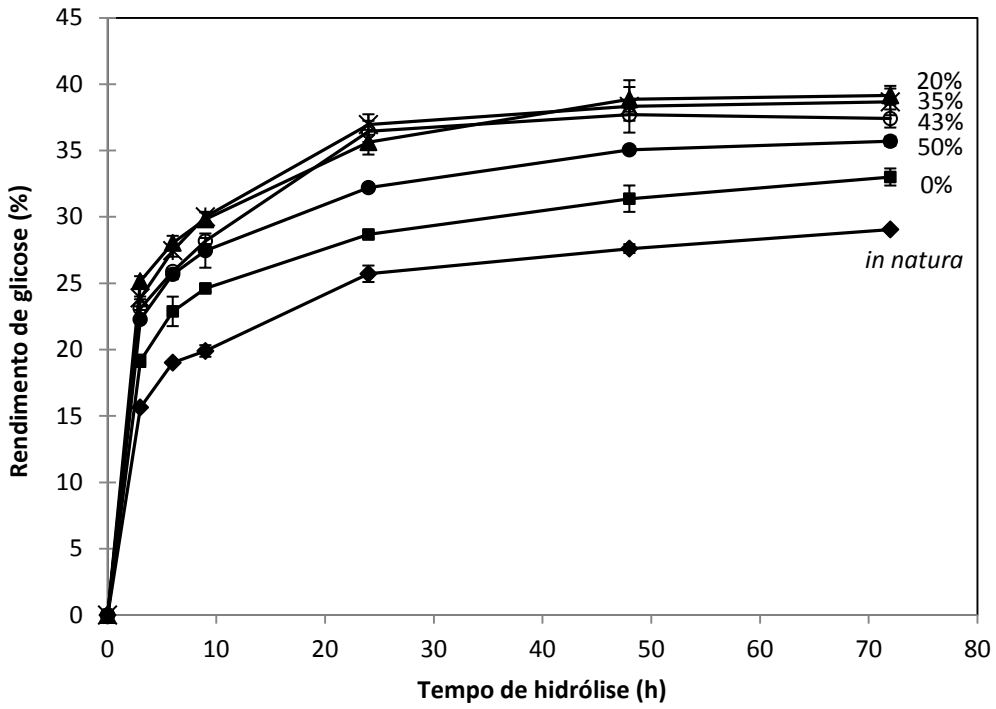
Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de ZHENG *et al.* (2008) que obtiveram aumentos de 8 a 14% no rendimento da hidrólise enzimática na presença dos aditivos Tween 20 e Tween 80. Além disso, verificaram que a conversão da celulose aumenta linearmente com o aumento o teor de Tween 20 de 0 a 0,1 (g Tween).(g biomassa seca)<sup>-1</sup> na hidrólise enzimática e que, a partir dessa concentração, aumentos pouco significantes são obtidos. Segundo os autores, os aditivos atuam prevenindo a adsorção não produtiva de enzimas na superfície de biomassas lignocelulósicas, o que impede o decaimento da atividade enzimática devido a esse fator.

A concentração de Tween 80 utilizada neste trabalho foi bem maior que a concentração utilizada pelos autores, 0,5 (g Tween).(g biomassa seca)<sup>-1</sup>, uma vez que essa maior concentração foi necessária para facilitar a passagem da biomassa pela extrusora.

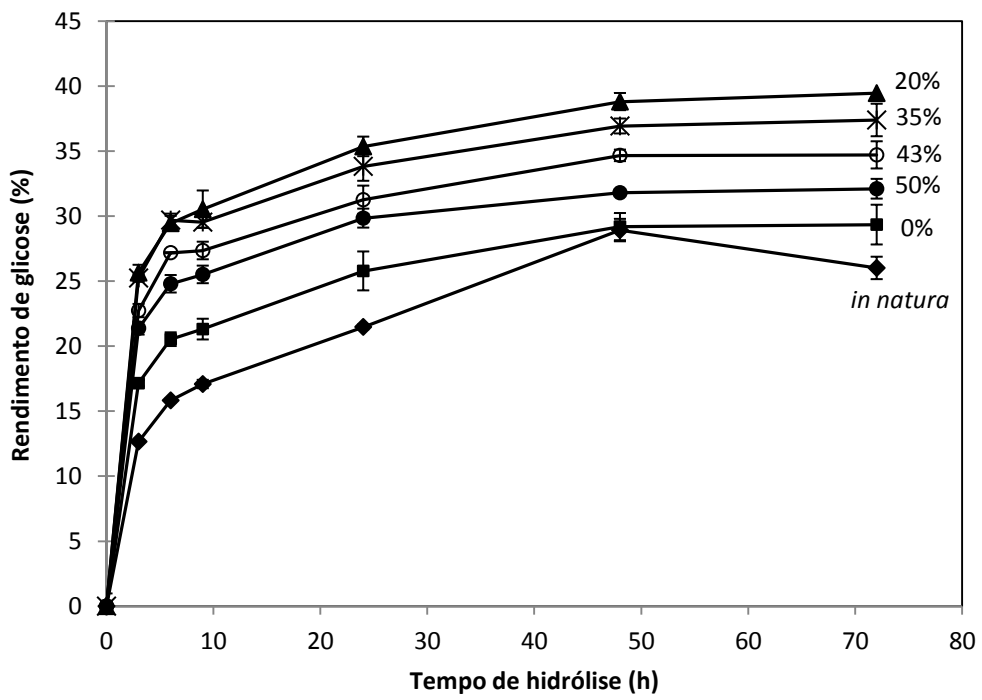
O etilenoglicol, por sua vez, não interferiu no rendimento de glicose. O mesmo não ocorreu no trabalho de LI *et al.* (2012) que no lugar de etilenoglicol utilizaram polietilenoglicol e obtiveram bons resultados. Os autores investigaram a adsorção de celulasas em substratos celulósicos, durante a hidrólise enzimática, e sua atividade enzimática na presença de polietilenoglicol em diferentes proporções (0; 0,5; 1 e 2%). Na proporção de 2%, os autores constataram um aumento de 51% da conversão de celulose em comparação com a amostra sem polietilenoglicol. Para efeito de comparação, cabe destacar que a proporção de etilenoglicol utilizada neste trabalho foi semelhante à utilizada pelo autor, em torno de 2,3%.

#### 4.2.2 Carga de Aditivo

Uma vez escolhido o glicerol como aditivo para os próximos experimentos, foram testados diferentes porcentagens de glicerol nas biomassas para verificar sua influência no processo. A Figura 4.4 mostra os resultados das hidrólises de amostras de biomassa pré-tratadas na extrusora com diferentes porcentagens de glicerol.



(a)



(b)

Figura 4.4: Influência do teor de glicerol na extrusão do bagaço (a) e da palha de cana-de-açúcar (b).

Os resultados mostram que tanto uma quantidade muito grande de glicerol quanto uma quantidade muito pequena influenciam negativamente na eficiência do pré-tratamento.

Com 50% de glicerol, as biomassas apresentaram dificuldade de serem alimentadas, pois a alta carga de glicerol reduziu o atrito entre as biomassas e os parafusos. Com isso o "arraste" das biomassas pelos parafusos na zona de alimentação ficou prejudicado, dificultando a alimentação das mesmas. Esse baixo atrito, provocado pelo aumento da quantidade de glicerol, além de dificultar a alimentação também reduziu os efeitos de cisalhamento dentro da extrusora, prejudicando o pré-tratamento. Dessa forma, observa-se um decaimento do rendimento à medida que se aumenta o teor de glicerol de 20 para 50%. Conclusões semelhantes são encontradas no trabalho de KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2009b) e KARUNANITHY e MUTHUKUMARAPPAN (2011b) que observaram uma redução significativa na eficiência do pré-tratamento com o aumento da umidade das biomassas que utilizou em seu trabalho.

O mesmo comportamento não ocorre quando se reduz a quantidade de glicerol de 20% para zero. Baixos rendimentos foram encontrados para extrusões das biomassas secas, ou seja, sem a presença de glicerol. Uma possível explicação pode estar no fato de que extrusões com pouca ou nenhuma quantidade de glicerol estão sujeitas a entupimentos, por esse motivo devem ser empregadas vazões de alimentação extremamente baixas para evitar tais entupimentos. Ao diminuir a vazão de entrada, mantendo a velocidade de rotação do parafuso constante, ocorre a redução do fator de preenchimento da extrusora. Um baixo fator de preenchimento diminui os efeitos de cisalhamento que ocorrem nas zonas de mistura reduzindo, portanto, a eficiência do pré-tratamento.

As extrusões da biomassa com quantidades iguais ou inferiores a 35% de glicerol teve o processo interrompido diversas vezes devido à pobre fluidez do material, acarretando em entupimentos, o que pode danificar o equipamento com o passar do tempo. Dessa forma, apesar do teor de 20% de glicerol apresentar o melhor rendimento, optou-se por utilizar o bagaço com 43% de glicerol nos testes posteriores, uma vez que a diferença entre seus rendimentos é muito pequena (39,1 contra 37,4%) e a extrusora apresenta problemas de entupimentos com porcentagens de glicerol inferiores a 43%.

Para a palha optou-se por utilizar 35% de glicerol nos experimentos posteriores pelos mesmos motivos.

A Figura 4.4 também mostra que, para algumas amostras, a partir de 48 horas de hidrólise, a concentração de glicose se manteve constante indicando que a sacarificação chegou ao seu máximo. Já para outras amostras, a sacarificação enzimática não chega ao máximo em 48 horas de reação, possivelmente devido à presença de algumas partes com acesso mais difícil às enzimas, tornando a hidrólise mais lenta.

### 4.2.3 Ciclos

Com somente um passe pela extrusora os rendimentos obtidos são de apenas 36,5 e 38,0% na hidrólise do bagaço e da palha, respectivamente. Estes rendimentos são baixos se comparados aos resultados obtidos em diversos trabalhos, citados na Seção 2.7.1 que utilizaram a extrusão como forma de pré-tratamento. Deste modo, decidiu-se realizar extrusões em ciclos com o propósito de aumentar a quantidade de açúcares obtida na sacarificação.

Uma vez escolhido o glicerol como aditivo mais vantajoso e as porcentagens de 43 e 35% para o bagaço e a palha, respectivamente, as biomassas foram submetidas às extrusões em ciclos. Para cada ciclo foi coletado uma amostra de biomassa destinada à hidrólise e o restante foi submetido a um novo ciclo. Os resultados para 72 horas de hidrólise estão exibidos na Figura 4.5 e a Tabela 4.2 mostra o aumento percentual do rendimento de hidrólise de um ciclo para outro.

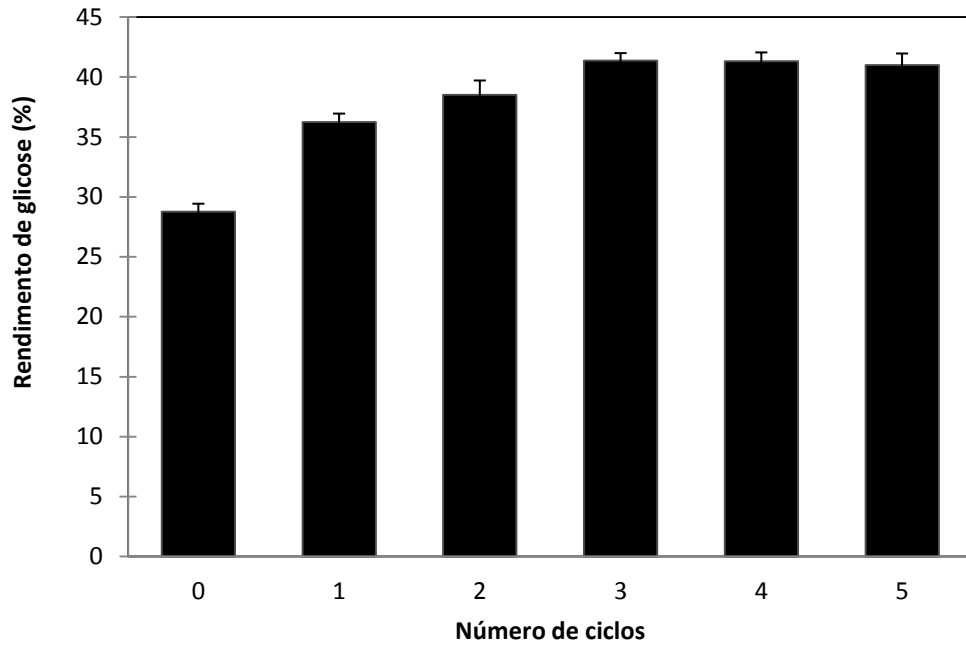
Os resultados mostram que, para o bagaço, existe um aumento no rendimento da hidrólise de 36,2 para 41,4% quando se aumenta de um para três ciclos e, a partir destes três ciclos, nenhum aumento adicional ocorre. Já para a palha, como o rendimento apresentou crescimento contínuo do primeiro ao quinto ciclo, foram realizados mais cinco ciclos com objetivo de observar em que ponto o rendimento se torna constante. De acordo com a Figura 4.5, o rendimento continua a aumentar até o sétimo ciclo com um total de 54% contra 38,5% para somente um ciclo.

Tabela 4.2: Aumento no rendimento de hidrólise de um ciclo para outro, em %

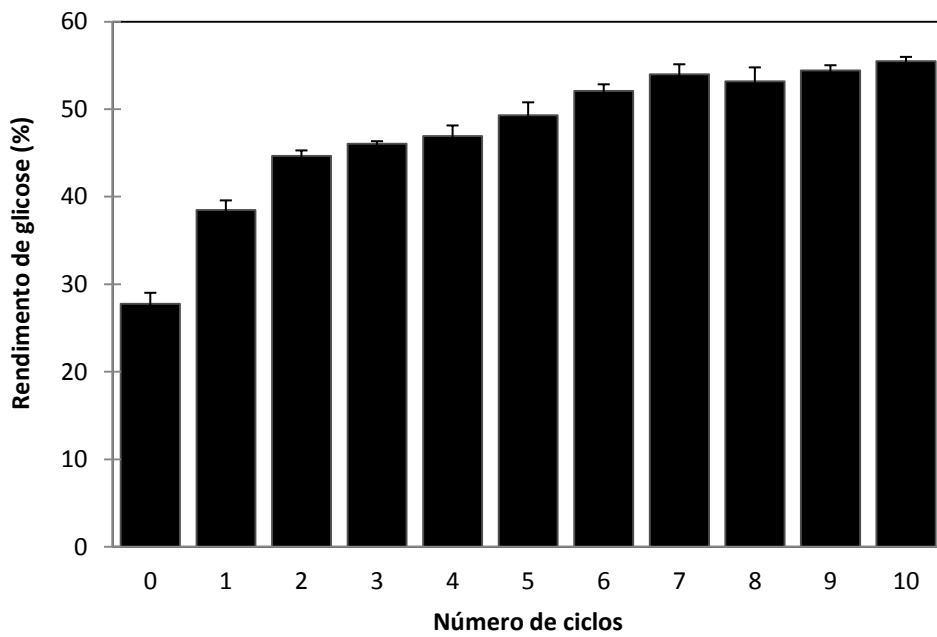
Ciclo\Tempo de hidrólise	Bagaço		Palha	
	48 h	72 h	48 h	72 h
<b>1</b>	28,5	26,0	50,8	38,6
<b>2</b>	5,4	6,3	11,0	16,1
<b>3</b>	7,2	7,4	6,5	3,1
<b>4</b>	0,07	-0,2	5,2	1,2
<b>5</b>	-1,5	-0,8	3,4	5,1
<b>6</b>	-	-	1,5	5,6
<b>7</b>	-	-	3,1	3,7
<b>8</b>	-	-	-0,7	-1,5
<b>9</b>	-	-	1,1	2,3
<b>10</b>	-	-	2,4	2,0

Os ciclos aumentam a eficiência do pré-tratamento, pois aumentam o tempo de residência da biomassa dentro da extrusora, ou seja, um número maior de ciclos é equivalente a um extrusora de maior comprimento. Dessa forma, o material é processado diversas vezes sofrendo os efeitos da extrusão especialmente na zona de mistura. Isso provoca uma maior cominuição da biomassa, tornando a celulose mais acessível. Entretanto, a hidrólise enzimática é controlada por barreiras físicas e químicas e a extrusão que tem a função de remover essa barreira física atinge um limite, após certo número de ciclos.

Estes resultados permitem descobrir o comprimento ideal da extrusora, ou seja, seu comprimento mínimo para atingir a máxima eficiência possível de pré-tratamento. Determinar o comprimento ideal do cilindro também evita gastos desnecessários para casos de extrusoras mais longas que o necessário. No caso em questão, o comprimento ideal seria três e sete vezes o tamanho da extrusora, totalizando 1,2 e 3,8 m, respectivamente para a extrusão do bagaço e da palha.



(a)



(b)

Figura 4.5: Rendimento em 72 horas de hidrólise enzimática versus quantidade de ciclos para o bagaço (a) e a palha de cana-de-açúcar (b).



### 4.3 Ensaios de Extrusão do Planejamento Experimental

Os ensaios de extrusão foram conduzidos variando a temperatura do cilindro e a velocidade de rotação dos parafusos, utilizando bagaço e palha de cana *in natura*, com adição de glicerol. A Figura 4.1 ilustra as biomassas antes e após o pré-tratamento.

Foi observado que o transporte da biomassa se torna mais fácil quanto maior é a temperatura do cilindro. Em baixas temperaturas usualmente ocorrem entupimentos, além de um intenso barulho. Dessa forma, temperaturas mais altas permitem empregar vazões de entrada maiores, caso desejado.

O tempo de residência da biomassa na extrusora varia conforme a geometria dos parafusos (quantidade de zonas de mistura e elementos reversos), o comprimento do cilindro e a velocidade de rotação dos parafusos. Como, nos ensaios do planejamento experimental a geometria dos parafusos foi mantida constante, o tempo de residência variou de forma inversamente proporcional à velocidade de rotação dos parafusos, como mostra a Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Tempo de residência dos ensaios experimentais

Ensaio	Bagaço		Palha	
	v (rpm)	$\tau$ (min)	v (rpm)	$\tau$ (min)
1	32	3,84	39	2,76
2	88	1,15	131	0,60
3	32	3,27	39	3,00
4	88	1,26	131	0,66
5	20	5,80	20	3,21
6	100	0,90	150	0,75
7	60	1,93	85	1,21
8	60	1,88	85	1,20
9	60	1,97	85	1,25
10	60	2,05	85	1,16
11	60	2,02	85	1,20

As condições de extrusão utilizadas no planejamento experimental foram escolhidas baseadas nos resultados dos ensaios preliminares. Sendo assim, empregou-se glicerol como aditivo a uma concentração de 43 e 34% em massa, respectivamente para extrusões do bagaço e da palha e cada ensaio foi realizado 3 ciclos de extrusão.

#### 4.4 Hidrólise Enzimática do Planejamento Experimental

Os resultados de 24 horas de hidrólise enzimática das amostras de bagaço e palha tratadas no planejamento experimental foram inseridos no *software* STATISTICA com o objetivo de verificar a influência da temperatura do cilindro e da velocidade de rotação dos parafusos no rendimento de glicose. As médias dos rendimentos de glicose ao longo do tempo de hidrólise de cada ensaio experimental para o bagaço e para a palha estão apresentadas na Tabela 4.4 e 4.5, respectivamente.

Tabela 4.4: Rendimento de glicose em % ao longo do tempo de hidrólise das amostras de bagaço tratadas no planejamento experimental

<b>Ensaio/Tempo</b>	<b>3 horas</b>	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
<b>1</b>	29,3	32,8	32,7	39,9	42,2	44,9
<b>2</b>	27,2	30,8	32,6	35,8	41,9	40,6
<b>3</b>	29,5	33,2	34,6	39,5	41,8	42,1
<b>4</b>	28,8	30,2	32,7	38,6	42,1	43,4
<b>5</b>	27,7	31,1	32,2	37,2	40,7	42,0
<b>6</b>	27,5	30,5	33,2	36,5	39,7	40,7
<b>7</b>	30,4	33,7	37,2	39,8	43,3	45,4
<b>8</b>	27,2	30,1	32,7	41,6	41,2	42,0
<b>9</b>	27,0	28,9	33,8	36,6	39,8	41,4
<b>10</b>	27,2	29,9	32,9	36,5	39,1	40,6
<b>11</b>	27,3	29,8	31,3	36,5	37,9	38,7

Tabela 4.5: Rendimento de glicose em % ao longo do tempo de hidrólise das amostras de palha tratadas no planejamento experimental

<b>Ensaio/Tempo</b>	<b>3 horas</b>	<b>6 horas</b>	<b>9 horas</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
<b>1</b>	31,7	33,2	37,2	41,0	44,7	46,2
<b>2</b>	28,8	32,2	35,6	39,8	40,6	43,4
<b>3</b>	28,0	34,7	36,9	39,2	41,2	44,4
<b>4</b>	28,4	32,3	35,6	40,6	41,3	42,0
<b>5</b>	30,6	32,8	36,4	40,5	44,5	46,1
<b>6</b>	28,6	31,3	36,6	38,6	41,5	43,8
<b>7</b>	27,6	31,2	33,7	37,2	40,8	41,6
<b>8</b>	30,0	33,5	35,3	40,6	44,3	45,6
<b>9</b>	30,6	33,5	36,2	40,7	43,6	43,7
<b>10</b>	28,0	32,5	35,0	37,4	40,3	44,0
<b>11</b>	30,2	33,1	35,5	41,8	44,8	46,0

A concentração de glicose alcançada ao final de hidrólise para estes experimentos variaram dentro da faixa de 8 a 11 g.L<sup>-1</sup>. Essas baixas concentrações refletem a baixa carga de sólidos empregada na hidrólise (5% de biomassa seca), sendo assim, apesar de se constituírem valores importantes no âmbito industrial, não foram utilizadas como parâmetro para verificar a eficiência do pré-tratamento, pois representam valores absolutos. Ao invés disso, os rendimentos, que representam valores relativos, foram utilizados como parâmetro.

A Figura 4.6 apresenta o gráfico de Pareto que mostra os efeitos das variáveis independentes e suas combinações sobre o rendimento de glicose para 24 horas de hidrólise enzimática. No gráfico, os termos lineares estão associados com a letra L e os termos quadráticos com a letra Q. É possível visualizar a magnitude de cada efeito a qual é representada pelo comprimento de cada coluna. A linha pontilhada vertical representa o p-valor de 0,1 que corresponde a 90% de confiança.

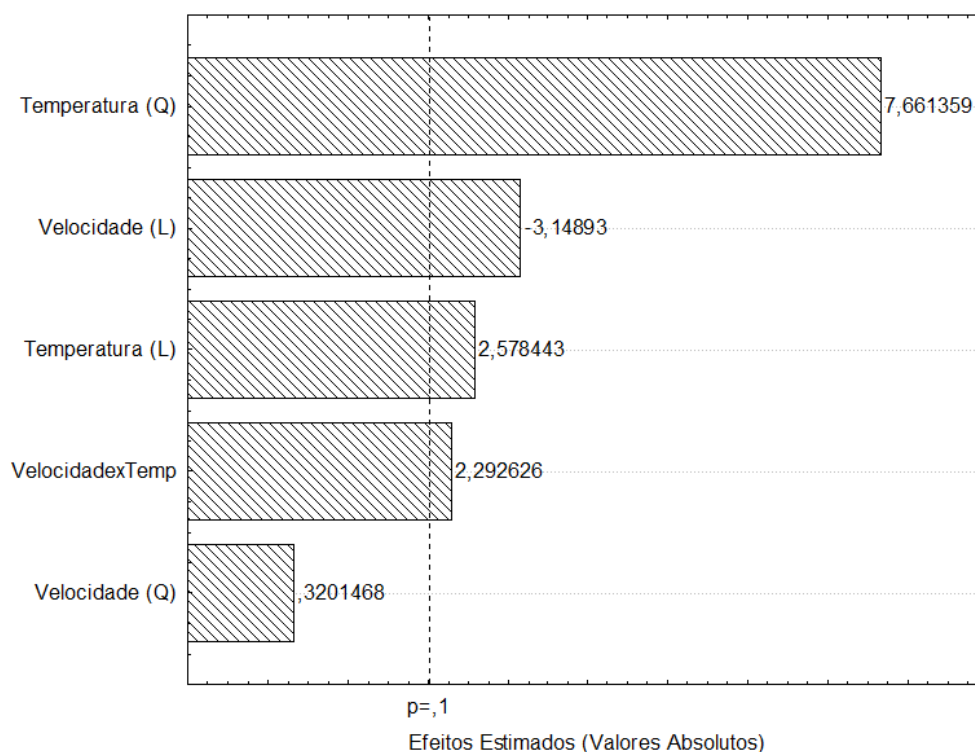


Figura 4.6: Gráfico de Pareto para 24 horas de hidrólise enzimática do bagaço.

Para 24 horas de reação, a Figura 4.6 mostra, com um nível de confiança de 90%, que os termos quadráticos e lineares da temperatura e o termo linear da velocidade apresentam influência na resposta, bem como a interação entre eles. Como mostra o gráfico de Pareto, a maior influência é a do termo quadrático da temperatura e apenas o termo linear da velocidade apresenta efeito negativo sobre o rendimento de glicose em 24 horas. Dessa forma, os termos sem significância foram eliminados e a regressão foi realizada novamente. A análise de variância e o teste F para esta nova regressão estão apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Análise de variância para rendimento em glicose em 24 horas

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor $F_{cal}$
<b>Regressão</b>	32,4413	4	8,1103	24,817
<b>Resíduo</b>	1,9611	6	0,3268	
<b>Total</b>	34,4023	10		

$$R^2 = 94,3\%; F_{tab(4; 6; 0,1)} = 3,18$$

O modelo apresentou ajuste bom de 94,3% e, a um nível de significância de 90%, pôde ser validado pelo teste F que apresentou um  $F_{cal}$  maior que o  $F_{tab}$ . O modelo quadrático ajustado em termos apenas das variáveis significativas é dado na Equação 5.1 para 24 horas de hidrólise, com rendimento em %, velocidade em rpm e temperatura em °C e o gráfico de curvas de nível é mostrado na Figura 4.7.

$$R_{24} = 36,634 - 0,691 \left( \frac{(v-60)}{28,368} \right) + 0,565 \left( \frac{(T-90)}{42,55} \right) + 1,982 \left( \frac{(T-90)}{42,55} \right)^2 + 0,710 \left( \frac{(v-60)}{28,368} \right) \left( \frac{(T-90)}{42,55} \right) \quad (4.1)$$

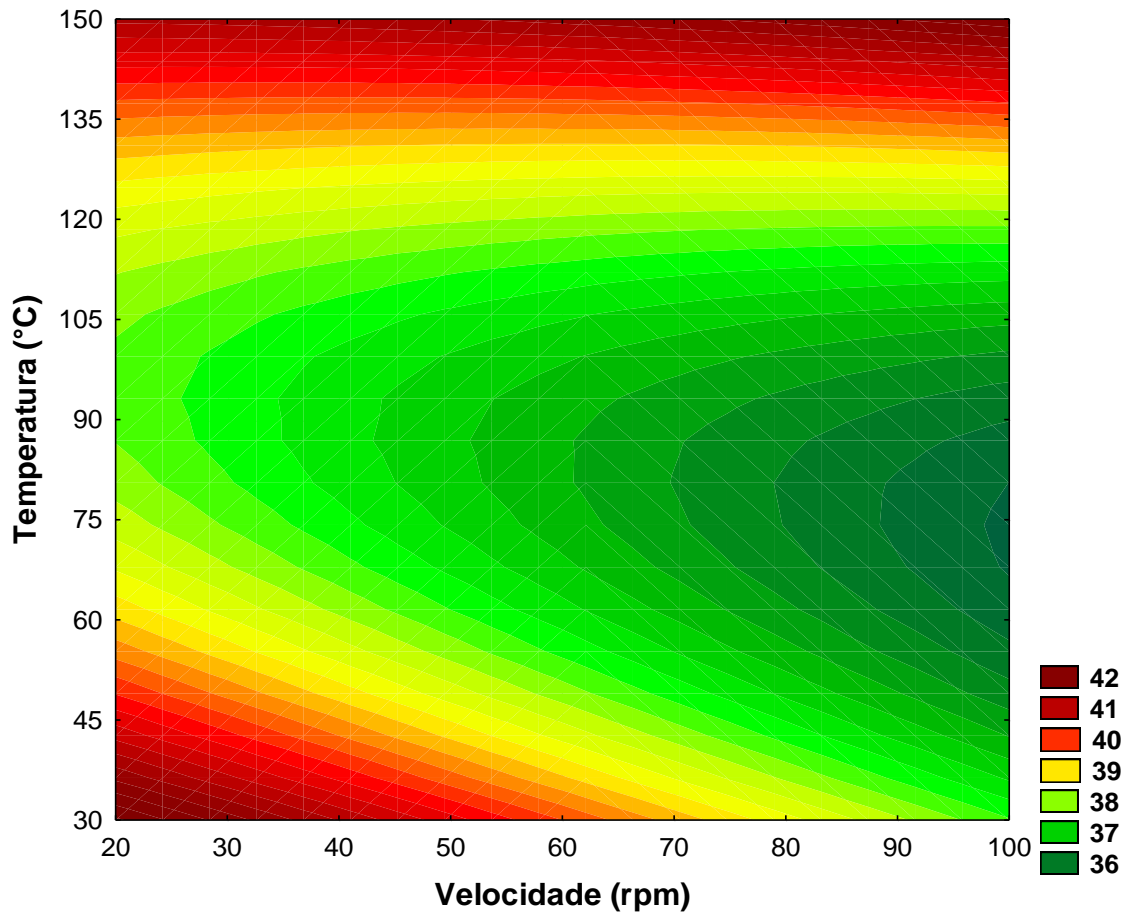


Figura 4.7: Curva de nível gerada a partir do modelo de determinação do rendimento de glicose em 24 horas de hidrólise enzimática.

Por meio da superfície de resposta observa-se que existem algumas regiões que definem condições ótimas em 24 horas de reação. Estas regiões se encontram nos extremos do gráfico, são elas: baixa temperatura associada à baixa velocidade de

rotação e alta temperatura associada a qualquer velocidade de rotação, dentro da região experimental.

Resultados similares são encontrados no trabalho de LAMSAL *et al.* (2010) que verificou que a combinação de altas temperaturas com baixo tempo de residência (alta velocidade de rotação) ou baixas temperaturas com altos tempos de residência (baixa velocidade de rotação) levou aos maiores rendimentos de hidrólise encontrados.

Entretanto, a influência dos parâmetros velocidade e temperatura, apesar de significativa, foi pequena. Isso pode ser observado pelos resultados de rendimento apresentados na Tabela 4.4 para 24 horas de hidrólise enzimática. Os valores mostram que os rendimentos variaram dentro da faixa 35,8-41,6%. Ou seja, uma variação pequena mesmo para uma variação muito grande de velocidade (de 20 a 100 rpm) e de temperatura (de 30 a 150 °C).

Para validar o modelo da Equação 4.1, novos experimentos de extrusão e hidrólise foram conduzidos em duas condições distintas. Para a primeira condição foi selecionado o ponto de 88 rpm e 90 °C (ponto 1) que corresponde a um dos menores rendimentos de glicose em 24 horas, segundo o modelo. Para a segunda condição foi escolhido o ponto 100 rpm e 150 °C (ponto 2) que, de acordo com o modelo, gerou um dos maiores rendimentos de glicose em 24 horas. A Tabela 4.7 mostra a proximidade entre os valores do modelo e os experimentais.

Tabela 4.7: Resultados experimentais e gerados pelo modelo

	<b>Tempo (h)</b>	<b>Experimental (%)</b>	<b>Modelo (%)</b>	<b>Erro (%)</b>
<b>Ponto 1</b>	24	36,1 ± 0,98	36,0 ± 0,44	0,53
<b>Ponto 2</b>	24	40,9 ± 0,98	41,8 ± 1,83	-2,17

Para o planejamento experimental da palha, decidiu-se expandir o intervalo de rotação para um máximo (nível 1,41) de 150 rpm. Por questões de segurança, seu intervalo de temperatura teve que ser reduzido para 140 °C devido a problemas de combustão que a palha apresentou em temperaturas maiores que de 150 °C. Sendo assim, o planejamento experimental para a palha foi reformulado com uma temperatura e rotação máximas de 140 °C e 150 rpm (nível 1,41), respectivamente, como mostra a Tabela 3.2.

Assim como feito para o bagaço de cana, os resultados de 24 horas de hidrólise da palha foram analisados no *software* STATISTICA versão 7.0 para regressão e análise gráfica. Entretanto, o gráfico de Pareto da Figura 4.8 mostra que nenhum termo influenciou significativamente nos rendimentos de hidrólise. Sendo assim, qualquer temperatura ou velocidade de rotação empregada gera resultados de hidrólise semelhantes.

Já que os resultados independem da velocidade de rotação e da temperatura do cilindro, as melhores condições a serem empregadas são aquelas que garantem o menor consumo energético por massa de material processado.

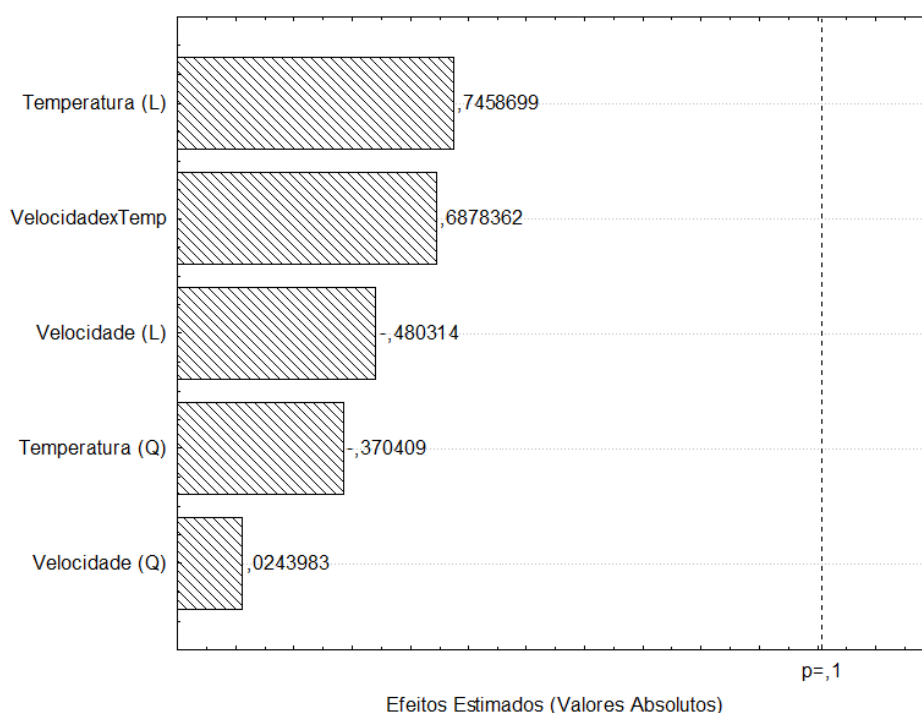


Figura 4.8: Gráfico de Pareto para 24 horas de hidrólise enzimática da palha.

## 4.5 Análise de Consumo Energético

Grande parte dos trabalhos encontrados na literatura que abordam pré-tratamentos físicos não apresentam dados de consumo energético. Existe uma carência de informações que relacionam a eficiência do pré-tratamento com o gasto energético,

principalmente nos casos de tratamento como a moagem que é reconhecida pelo seu grande consumo energético (ZHU *et al.*, 2009).

A extrusão, por sua vez, apresenta consumo energético geralmente inferior aos pré-tratamentos físicos de moagem (SILVA, *et al.*, 2013b). Esse menor consumo energético pode ser associado, principalmente, ao seu curto tempo de residência. O maior tempo de residência observado na Tabela 4.3 foi de 5,8 minutos, entretanto, é possível reduzir o tempo de residência e, ao mesmo tempo, aumentar a produtividade aumentando a velocidade de rotação dos parafusos o que conseqüentemente reduz ainda mais o consumo de energia por massa processada.

Para calcular o gasto energético dos processos de extrusão da biomassa de cana, foram realizadas medidas de corrente durante o funcionamento da extrusora e calculado o consumo de energia por grama de bagaço processado ou por grama de glicose produzida, de acordo com as Equações 3.4, 3.5 e 3.6.

As condições escolhidas para calcular o gasto energético foram aquelas nas regiões da Figura 4.7 que combinam valores extremos de temperatura e velocidade de rotação. A Tabela 4.8 apresenta o gasto energético por grama de biomassa processada e por grama de glicose produzida, utilizando dados de potência, vazão e rendimento para as condições escolhidas. Essas condições estão representadas pelo código de níveis utilizado no planejamento experimental.

Cabe observar que no segundo e terceiro ciclo as vazões empregadas são cerca de 50% maiores que no primeiro ciclo devido à maior facilidade de processar o material que já se encontra mais particulado. Isso significa que o gasto energético é menor nestes ciclos, já que é possível processar uma maior quantidade de biomassa no mesmo intervalo de tempo.

Tabela 4.8: Consumo energético das condições experimentais selecionadas

Ponto	(+1,41; +1,41)	(-1,41; -1,41)	(-1,41; +1,41)	(+1,41; -1,41)
Temperatura (°C)	150	30	150	30
Rotação (rpm)	100	20	20	100
Vazão 1º ciclo (g.min <sup>-1</sup> )	5	1	1	5
Vazão 2º e 3º ciclo (g.min <sup>-1</sup> )	7,5	1,5	1,5	7,5
Potência (W)	995,50	579,74	878,8	717,65
Consumo (kJ/g <sub>biomassa</sub> )	27,87	81,16	123,03	20,09
Rendimento 24 h (%)	43	43	43	38
Consumo (kJ/g <sub>glicose</sub> )	147,33	428,98	650,27	120,18



Fica claro que em baixa temperatura e rotação a potência do equipamento é menor, como é o caso do ponto (-1,41; -1,41). Entretanto, como a rotação é muito baixa, a vazão de alimentação empregada deve ser menor, processando então uma quantidade menor de material por tempo, o que resulta em um maior consumo energético por grama de biomassa, como pode ser observado na Tabela 4.8.

Dessa forma, verifica-se que, neste caso, a velocidade de rotação apresenta-se como um fator mais influente que a temperatura, quando se trata de consumo energético específico do pré-tratamento por extrusão.

O ponto (+1,41; -1,41) apresenta o menor consumo energético por grama de biomassa processada, uma vez que é conduzido em baixa temperatura e alta vazão. Entretanto, seu rendimento é um pouco mais baixo que os demais para 24 horas de hidrólise. Para uma comparação mais adequada foi calculado o consumo energético por grama de glicose produzida utilizando os dados de rendimento como fator de conversão. Observando, então, o consumo por grama de glicose na Tabela 4.8, verifica-se que o ponto (+1,41; -1,41) é mais vantajoso em termos energéticos, pois apresenta um consumo inferior que os demais pontos para cada grama de glicose produzida. Entretanto, por apresentar menor rendimento, necessita de maior quantidade de matéria prima por grama de glicose produzida.

Observando-se, então, na Tabela 4.8, um consumo mínimo de  $20,09 \text{ kJ.g}^{-1}$  para uma extrusão realizada em três ciclos, constata-se que a extrusão apresenta baixo consumo energético, se comparada com alguns pré-tratamentos físicos. Em HIDENO *et al.* (2009) um moinho de discos usado para tratar palha de milho consumiu  $5,4 \text{ kJ.g}^{-1}$  de biomassa processada com um total de 10 ciclos. Já o moinho de bolas utilizado para tratar a mesma biomassa por 60 minutos consumiu uma quantidade de energia de  $108 \text{ kJ.g}^{-1}$  de biomassa, ou seja, apresentou um consumo 20 vezes superior ao moinho de discos.

No trabalho de BARROS *et al.* (2013) o consumo energético para 4 ciclos em um moinho de discos, seguido de 60 minutos de ozonólise foi bem superior, com um total de 313,2 kJ e 334,8 kJ por grama de bagaço e palha, respectivamente. Segundo os autores, o pré-tratamento do bagaço e da palha apenas por ozonólise, conhecida pelo seu baixo consumo energético, consumiu uma média de  $140,4 \text{ kJ.g}^{-1}$ .

Já o moinho de discos utilizado por SILVA *et al.* (2010) no tratamento do bagaço e da palha consumiu quantidades comparáveis a extrusora utilizada neste trabalho. Um total de  $48 \text{ kJ.g}^{-1}$  e  $39,6 \text{ kJ.g}^{-1}$  foram consumidos para o bagaço e a palha, respectivamente, realizando-se 20 ciclos para cada biomassa (SILVA *et al.*, 2010).

Pode-se observar que os valores de gastos energéticos podem variar bastante de um trabalho para outro, pois dependem de muitos fatores que incluem a marca e o porte do equipamento.

## 4.6 Influência da Configuração dos Parafusos

A mudança da configuração dos parafusos altera a eficiência do pré-tratamento, pois permite ajustar o tempo de residência dentro do cilindro e com isso a intensidade de cisalhamento.

A primeira mudança de configuração consistiu na troca da angulação dos elementos da segunda zona de mistura. A nova angulação simulou um elemento reverso empurrando a biomassa para o sentido contrário ao transporte. Dessa forma, a biomassa permaneceu mais tempo nesta zona sofrendo maiores efeitos de cisalhamento.

A segunda mudança de configuração consistiu no acréscimo de um elemento reverso após a terceira zona de mistura. Esta localização foi escolhida, pois ao chegar ao elemento reverso o material retorna e se acumula na zona de mistura que se encontra logo anterior a ele e sofre novamente os efeitos de cisalhamento. Além disso, foi escolhida a terceira zona de mistura, pois ao chegar a esta zona, o material já se encontra mais particulado e com isso o equipamento não sobrecarrega tanto. A Figura 4.9 mostra os rendimentos em 72 horas de hidrólise das amostras selecionadas tratadas nas condições descritas na Tabela 3.4.

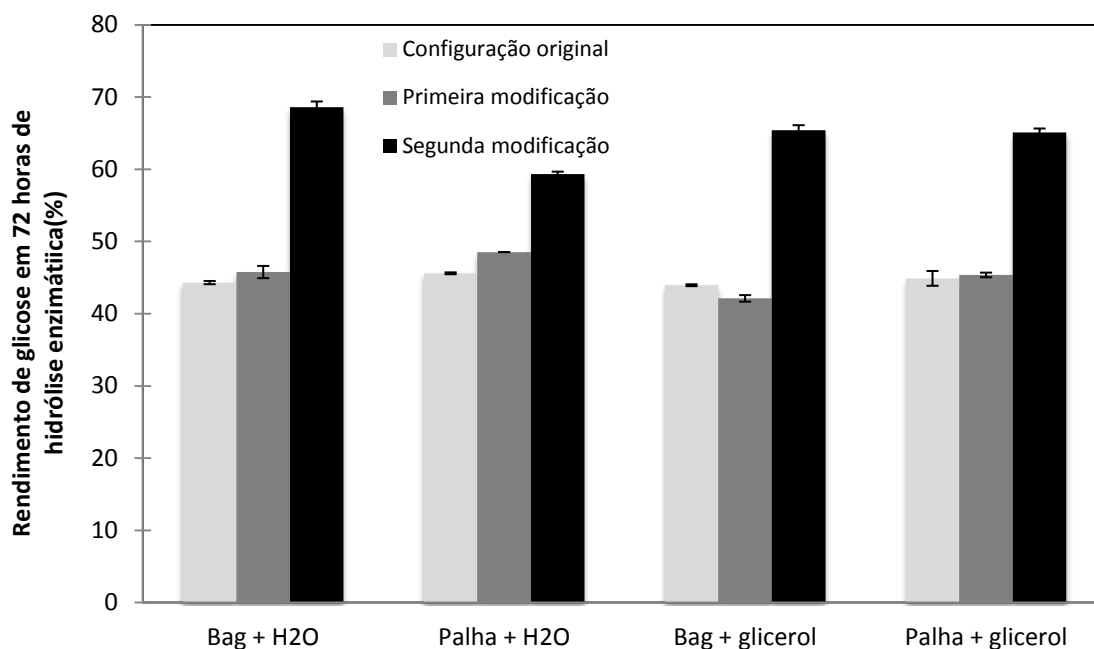


Figura 4.9: Comparação dos rendimentos em 72 horas de hidrólise das amostras processadas nas diferentes configurações de parafusos.

Como já era esperado, foi verificado um aumento do tempo de residência na medida em que os parafusos foram modificados. Com os parafusos na conformação original, o tempo de residência foi em média 0,9, 1,20 e 4,26 a 100, 85 e 30 rpm, respectivamente. Já para a primeira mudança de conformação, as extrusões apresentaram um pequeno aumento na média dos tempos de residência passando para 1,12, 1,27 e 4,58 minutos a 100, 85 e 30 rpm, respectivamente. A inserção do elemento reverso na segunda modificação ocasionou um grande aumento dos tempos de residência apresentando médias de 5,66, 5,52 e 10,5 minutos para 100, 85 e 30 rpm, respectivamente.

Pode-se observar pelo gráfico que a primeira mudança realizada praticamente não causou melhora na eficiência do pré-tratamento. Uma possível explicação para isso reside no fato de que ao chegar à zona de mistura modificada, o material retorna e encontra uma zona de transporte, a qual apresenta pouca capacidade de cisalhamento. Uma forma de tornar essa nova configuração mais eficiente seria adicionar uma nova zona de mistura, localizada antes dessa zona modificada. Nessa conformação os elementos da zona modificada que simulam um elemento reverso empurrariam o

material no sentido contrário ao transporte que acabaria encontrando uma zona de mistura ao invés de uma zona de transporte e, com isso, sofrendo maior cisalhamento.

Observa-se também que a presença do elemento reverso aumenta de maneira drástica a eficiência do pré-tratamento, sendo essencial a presença deste para que se alcance bons rendimentos. Os rendimentos alcançados foram 68,6, 59,3, 65,4 e 65,1% de glicose em 72 horas de hidrólise enzimática para as misturas de bagaço+água, palha+água, bagaço+glicerol e palha+glicerol, respectivamente.

O aumento do tempo de residência justifica em parte os melhores rendimentos encontrados com a inserção do elemento reverso, além disso, a presença deste causa um impacto maior dos parafusos e cilindro sobre a biomassa, favorecendo a mistura e o cisalhamento e proporcionando maior quebra da estrutura da biomassa.

Apesar dos rendimentos mais elevados, a presença do elemento reverso prejudicou drasticamente a fluidez da biomassa dentro do cilindro. Ao longo da passagem o torque excedeu, por diversas vezes, o limite máximo permitido pelo equipamento, devido à entupimentos na zona de mistura localizada antes do elemento reverso. Sendo assim, foi necessário empregar uma vazão de entrada extremamente baixa em todos os casos, para evitar o bloqueio dos parafusos. Essa baixa vazão acarreta em aumento do gasto energético por grama de biomassa processada. Uma forma de contornar esse problema seria adicionar uma maior quantidade de aditivo por grama de biomassa ou um maior teor de umidade. Isso facilitaria a passagem pela extrusora, permitindo maiores vazões de entrada e com isso, a redução do gasto energético. Em contrapartida, existe a possibilidade da redução da eficiência do pré-tratamento com o aumento do teor de aditivo, como foi verificado na Figura 4.4. Sendo assim, testes adicionais precisam ser realizados para verificar a influência das variáveis operacionais, bem como uma avaliação do gasto energético com essa nova conformação de parafusos.

Uma grande vantagem deste pré-tratamento é que o rendimento chega quase ao seu máximo no tempo de apenas 24 horas de hidrólise e a partir desse ponto o acréscimo no rendimento é bastante pequeno. É possível observar isso na Figura 4.10 que apresenta as curvas de hidrólise das amostras.

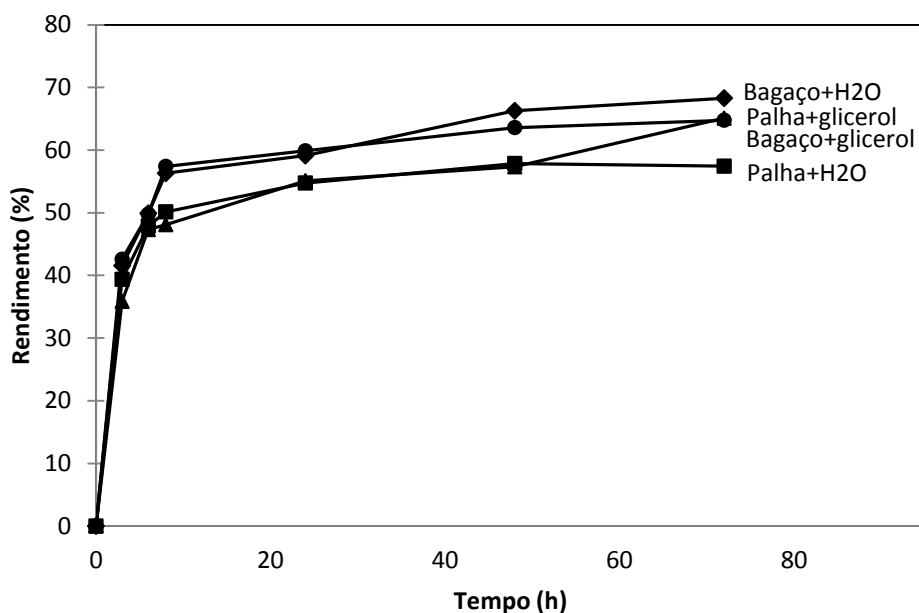


Figura 4.10: Curvas de hidrólise das amostras processadas com elemento reverso.

Foi observado um escurecimento da cor das biomassas do primeiro ao terceiro ciclo nas extrusões com o elemento reverso. A Figura 4.11 compara as cores de uma amostra de palha *in natura* com amostras de palha tratadas do primeiro ao terceiro ciclo no tratamento com a nova configuração do parafuso, utilizando glicerol como aditivo. Observa-se o escurecimento da biomassa à medida que se aumenta o número de ciclos. Isso acontece, pois o tempo de residência dentro da extrusora aumenta e, com isso, a biomassa fica exposta a alta temperatura por maior tempo. A temperatura definida no experimento da Figura 4.11 foi de 85 °C, entretanto a temperatura real do cilindro chegou a 130 °C devido à geração de calor pelo equipamento. Sendo assim, de forma geral, foi observado que quanto maior a temperatura do cilindro mais escura a cor da biomassa tratada, mesmo na configuração original dos parafusos.

HASETH (2012) relatou o escurecimento de biomassa pré-tratada com líquidos iônicos, o que, provavelmente, segundo o autor, pode estar associado com a condensação da lignina. Já CURELI *et al.* (2002) associaram o escurecimento da palha de milho tratada com ácido sulfúrico à formação de produtos da degradação de carboidratos ou à catálise ácida de ligações lignina-carboidrato.

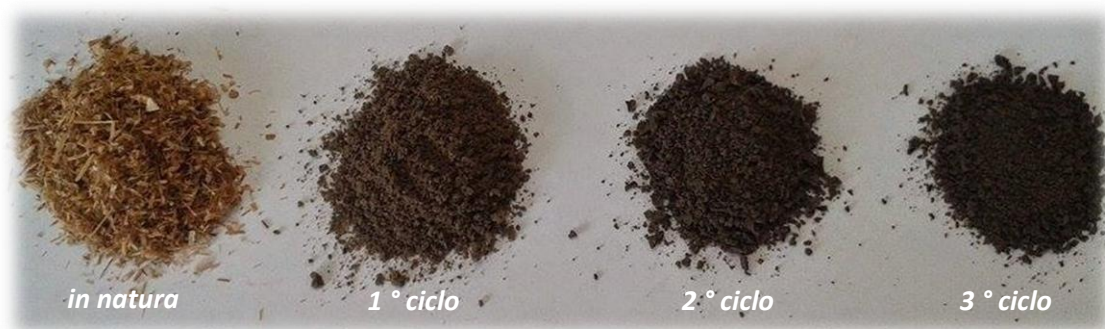


Figura 4.11 Comparação da cor da palha *in natura* e tratada do primeiro ao terceiro ciclo utilizando os parafusos com elemento reverso.

Com intuito de verificar se houve degradação de açúcares, as amostras de bagoço e palha, tratadas com três ciclos na configuração com elemento reverso utilizando glicerol como aditivo nas condições descritas na Tabela 3.4, foram enviadas para HPLC para quantificação dos principais inibidores. A Tabela 4.9 mostra a concentração dos inibidores avaliados.

Tabela 4.9: Concentração dos principais inibidores

Inibidor	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	
	Bagoço	Palha
Ácido acético	0,76	0,59
Furfural	n.d.	n.d.
HMF	n.d.	n.d.

n.d.: não detectado

Apesar do bagoço e a palha terem sido tratados em altas temperaturas que atingiram, respectivamente, 130 e 160 °C devido à geração de calor pelo equipamento, não foi detectada a presença de furfural e HMF nos xaropes de biomassa. Como a extrusão não modifica a composição da biomassa e, portanto, não produz açúcares, é razoável a ausência destes dois inibidores, uma vez que eles são gerados a partir da degradação de pentoses e hexoses, como mostra a Figura 2.3.

Por outro lado, a presença de ácido acético é possível, uma vez que este é formado a partir da degradação da hemicelulose quando exposta a condições drásticas, como alta temperatura e elevada acidez. Todavia, a concentração de ácido acético encontrada é muito pequena para provocar uma inibição significativa da fermentação.

HUANG *et al.* (2011) verificaram que em baixas concentrações de ácido acético (1-4 g.L<sup>-1</sup>) não houve inibição da produção de etanol a partir de uma solução hidrolisada de palha de milho tratada por explosão a vapor. A inibição só passou a ser significativa nas concentrações testadas de 4 a 6 g.L<sup>-1</sup>.

Já os resultados de TOQUERO e BOLADO (2014) mostraram uma inibição do rendimento de etanol em concentrações mais baixas de ácido acético. O rendimento de etanol de 77,9% para a amostra controle caiu para 60,1, 51,9 35,9 e 2,1% em concentrações de ácido acético de 0,5, 1, 2 e 4 g.L<sup>-1</sup>. Entretanto, sabe-se que a inibição é também dependente da linhagem de levedura utilizada.

Os rendimentos de etanol alcançados por BELLIDO *et al.* (2011) na fermentação também foram reduzidos pela presença de ácido acético a partir de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. As concentrações de etanol obtidas foram 10,4, 17,5 18,0 e 22,8 g.L<sup>-1</sup> para concentrações de ácido acético de 2,5, 1,5 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> e para amostra controle.

## 4.7 Fermentação do Hidrolisado

Os três substratos descritos na Seção 3.9 foram preparados e submetidos à fermentação com o objetivo de avaliar os efeitos inibitórios, principalmente do glicerol que está presente em altas concentrações. Os rendimentos de etanol ao longo do tempo de fermentação para os três substratos são apresentados na Figura 4.12 e foram calculados com base na quantidade total de açúcar presente no início da fermentação. A Tabela 4.10 apresenta a concentração de glicerol e dos açúcares presentes em cada substrato no início da fermentação.

Tabela 4.10: Concentração de açúcares e glicerol no início da fermentação

	<b>Condição controle</b>	<b>Xarope com glicerol</b>	<b>Xarope sem glicerol</b>
<b>Glicerol (g.L<sup>-1</sup>)</b>	21,7	20,3	0
<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	12,8	13,7	13,6
<b>Sacarose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	18,0	19,9	18,9
<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>	2,9	4,6	4,7
<b>Total de açúcar (g.L<sup>-1</sup>)</b>	33,7	38,1	37,2

Como pode ser observado na Tabela 4.10, a adição de melão ocasionou a diluição da concentração de glicerol do xarope que contém o mesmo, entretanto, como o volume adicionado foi pequeno, essa diluição foi de apenas 21 para 20,3 g.L<sup>-1</sup>.

Os maiores rendimentos são alcançados no tempo de 4 horas de fermentação, chegando a 82,7, 80,6 e 79,6% para a condição controle e para o xarope de biomassa com e sem glicerol, respectivamente. As concentrações de etanol alcançadas foram 14,2, 15,7 e 15,1 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, para os três substratos. Do ponto de vista industrial, essas concentrações de etanol são baixas, entretanto, não são resultados de rendimentos ruins, mas sim de uma carga baixa de açúcares utilizada como substrato da fermentação. Entretanto, o foco desta etapa foi verificar a influência do glicerol por comparação entre os rendimentos dos três diferentes substratos, sem se preocupar com suas concentrações geradas ao final do processo.

Uma vez que os rendimentos entre os três substratos são muito próximos, os resultados indicam que o glicerol, na concentração presente, não é capaz de inibir a fermentação e prejudicar seu rendimento.

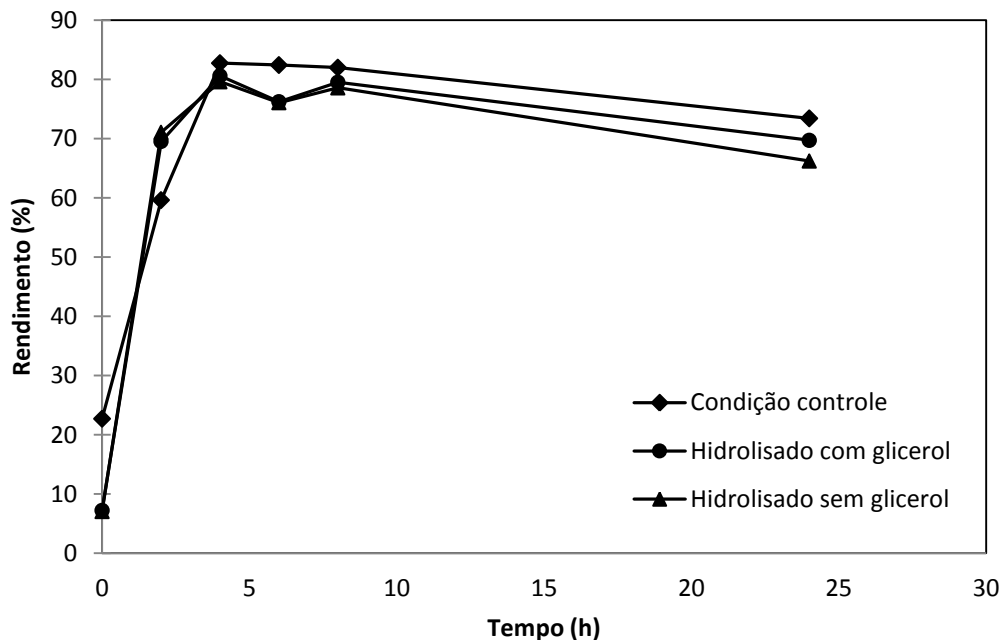


Figura 4.12: Rendimento de etanol ao longo do tempo de fermentação.

Para os três substratos as fermentações chegaram a rendimentos satisfatórios, mostrando que o glicerol pode ser utilizado como aditivo na extrusão. Entretanto seu



uso deve ser de forma cautelosa, pois em concentrações mais elevadas é possível que ocorra inibição que prejudique de forma significativa os rendimentos da fermentação, tornando o glicerol inviável como aditivo para extrusão. Sendo assim, caso se deseje concentrações mais altas de glicerol na extrusão, é importante que essas concentrações sejam testadas na fermentação para garantir que a mesma não seja prejudicada.

## 4.8 Caracterização Estrutural

Análises de caracterização estrutural de amostras tratadas e não tratadas foram realizadas com objetivo de verificar a influência do pré-tratamento na estrutura da biomassa. As análises realizadas foram microscopia eletrônica de varredura, índice de cristalinidade e área específica e seus resultados estão descritos nos tópicos seguintes.

### 4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia dos grânulos foi observada através de MEV com aumentos de 100 a 50.000 vezes, sendo possível observar as alterações estruturais que a extrusão provoca nas fibras lignocelulósicas das biomassas. As Figuras 4.13 e 4.14 mostram imagens de MEV para as biomassas não tratadas e amostras tratadas nos ensaios 8 e 1 do planejamento experimental, respectivamente para bagaço e palha.

O bagaço e a palha em sua forma *in natura* apresentam estruturas rígidas com fibras ordenadas. Sua superfície compacta e pouco porosa dificulta o acesso às enzimas. Após o pré-tratamento, foi possível observar pequenas mudanças estruturais no material tratado que se apresentou mais cominuído e desestruturado em relação à sua morfologia original. A quantidade de ranhuras e a rugosidade das biomassas se tornaram mais proeminente demonstrando a separação parcial da compacta estrutura lignocelulósica. Por meio das imagens não foi possível perceber diferenças significativas no nível de desestruturação da morfologia entre as duas biomassas estudadas. Isto está de acordo com os rendimentos muito semelhantes obtidos para o bagaço e a palha no planejamento experimental.

Como o pré-tratamento não remove a lignina, a presença desta não permite a visualização de microfibrilas de celulose desprendidas da matriz. Sendo assim, a desestruturação da parede celular ocorre apenas no nível macro, deixando as microfibrilas intactas, não ocorrendo, então, desfibrilação das biomassas.

A cominuição e a redução das fibras, provocadas pela extrusão, podem ser consideradas as responsáveis pelo aumento da sacarificação em relação à biomassa *in natura*, devido a maior área de contato entre as enzimas e a celulose, facilitando o ataque enzimático. Apesar disso, ainda pode ser visto nas imagens várias áreas que não foram afetadas pelo pré-tratamento, mantendo suas estruturas rígidas e organizadas, como mostra a região destacada na Figura 4.14. Isso mostra que o pré-tratamento por extrusão não foi capaz de alcançar e desordenar toda a estrutura da biomassa, deixando diversas áreas intactas e, por esse motivo, as hidrólises da biomassa apresentaram rendimentos relativamente baixos.

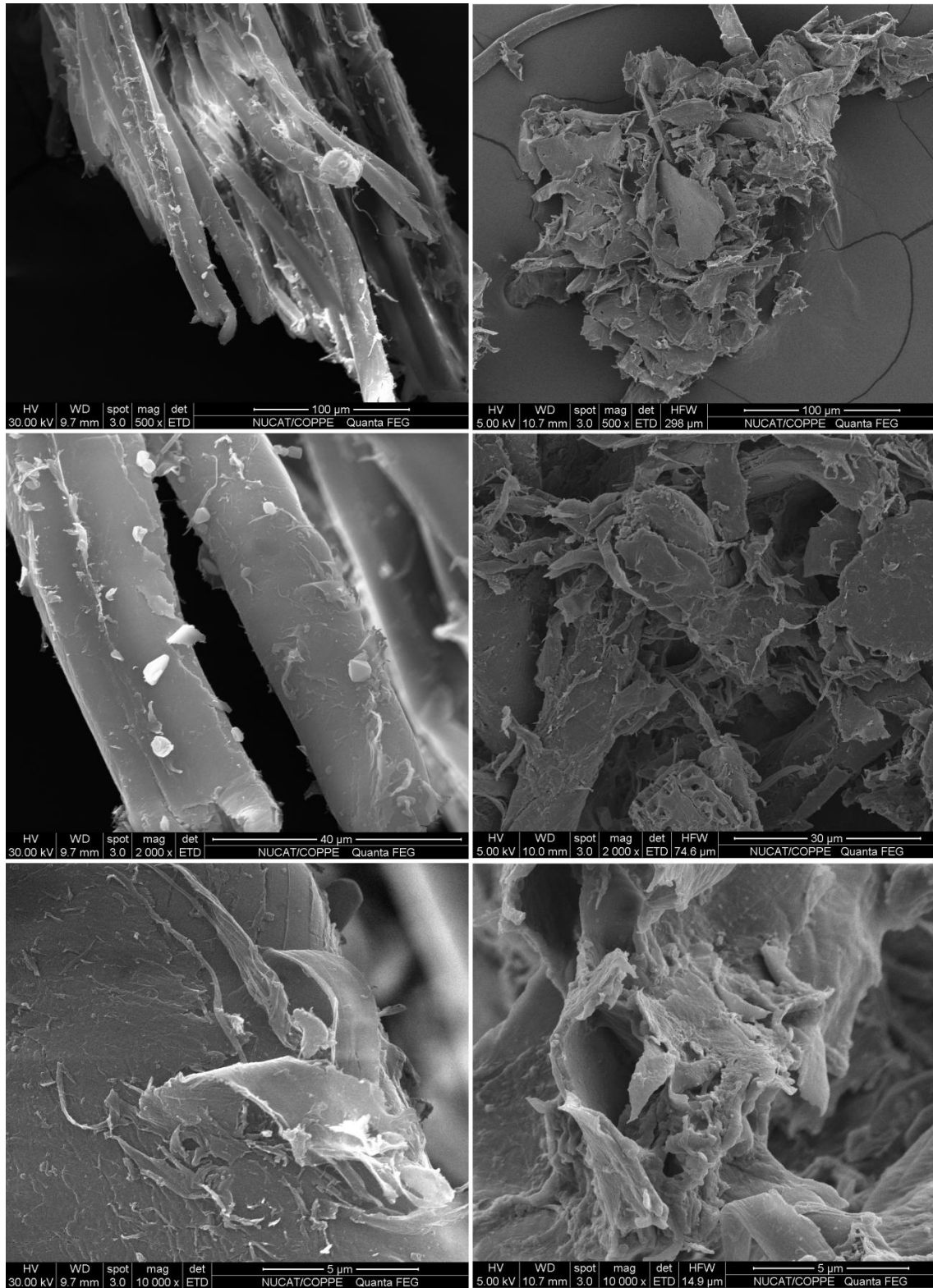


Figura 4.13: Imagens de MEV do bagaço sem tratamento (esquerda) e pré-tratado (direita) no ensaio 8 do planejamento experimental, com aumentos de 500, 2.000 e 10.000 x.

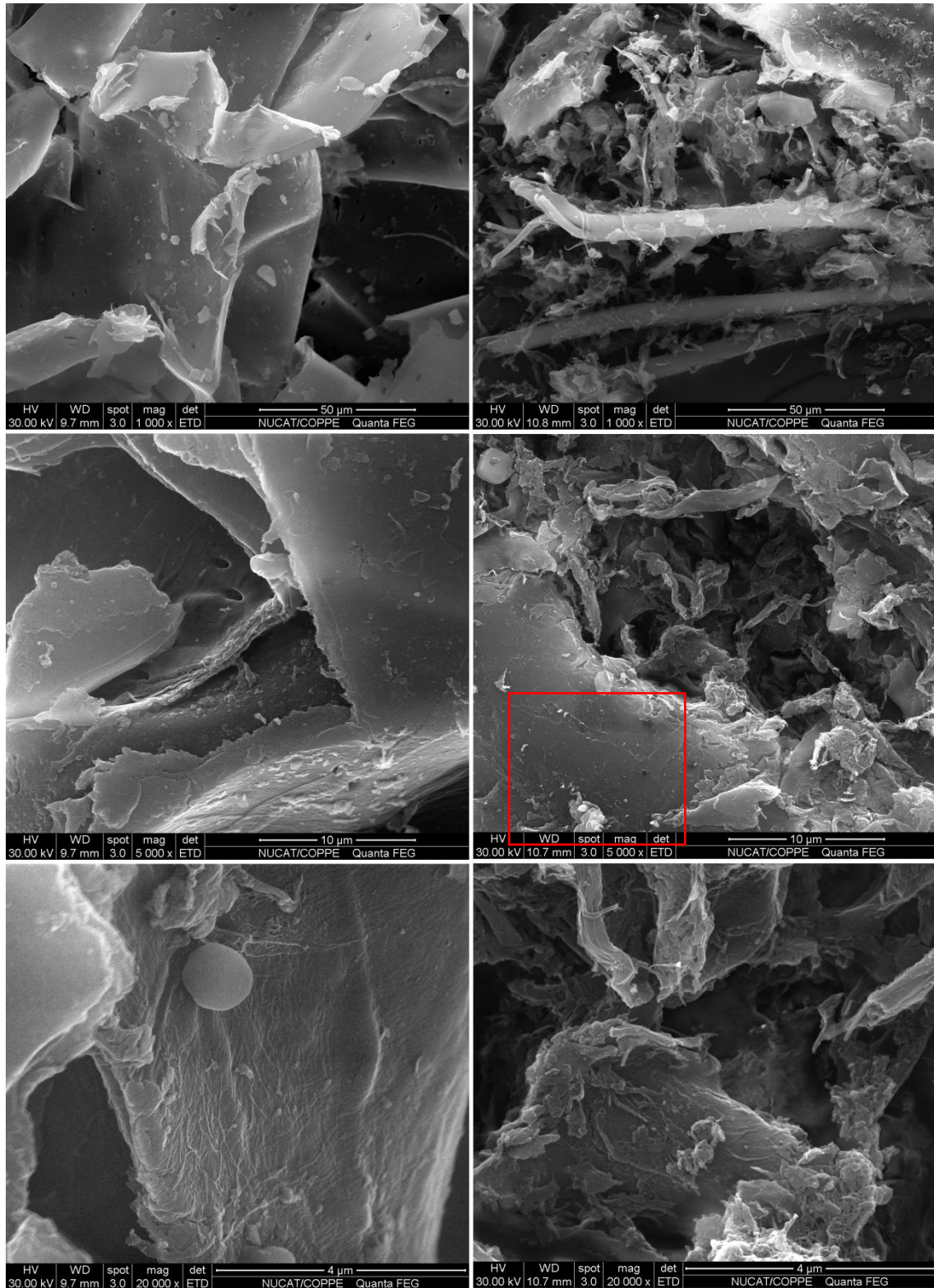


Figura 4.14: Imagens de MEV da palha sem tratamento (esquerda) e pré-tratada (direita) no ensaio 1 do planejamento experimental, com aumentos de 1.000, 5.000 e 20.000 x.

## 4.8.2 Índice de Cristalinidade

Os resultados de índice de cristalinidade para amostras de biomassas não tratadas e tratadas em ciclos nos experimentos descritos na Seção 3.4.3 podem ser visualizados na Figura 4.15.

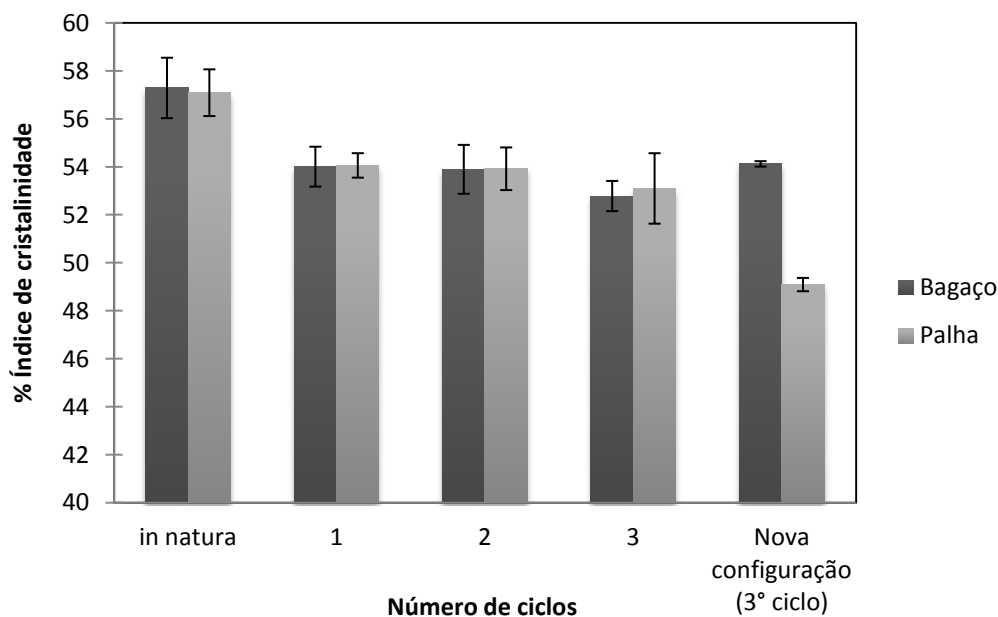


Figura 4.15: Índice de cristalinidade das amostras tratadas em ciclos.

Para o bagaço tratado em seu primeiro ciclo, a cristalinidade apresentou uma redução de  $57,3 \pm 1,25\%$  para  $54,0 \pm 0,23\%$  em relação ao bagaço *in natura*. Com a realização do segundo e terceiro ciclos, a cristalinidade se manteve constante, levando em conta o erro experimental. Já para a palha, houve uma redução de  $57,1 \pm 0,97\%$  para  $54,1 \pm 0,50\%$  em seu primeiro ciclo e uma pequena e nova redução de  $53,9 \pm 0,88\%$  para  $52,1 \pm 0,26\%$  do segundo para o terceiro ciclo.

SILVA *et al.* (2010) também obteve reduções pouco significativas do índice de cristalinidade ao tratar a biomassa de cana-de-açúcar em um moinho de discos. O bagaço e a palha apresentaram reduções no IC de 38 para 28% e de 30 para 21%, respectivamente. Enquanto que, ao tratar as mesmas biomassas em moinho de bolas, conseguiram uma total decristalinização de suas estruturas.

ZHANG *et al.* (2011) chegou a conclusões semelhantes ao tratar palha de milho em uma extrusora de dupla rosca. Em seu trabalho, não encontrou uma redução significativa do índice de cristalinidade que justificasse o aumento nos rendimentos de hidrólise. A desconstrução da parede celular observada por MEV e o aumento da área superficial foram considerados os responsáveis pelo aumento da sacarificação enzimática.

LEE *et al.* (2009) obteve uma redução pequena do índice de cristalinidade de 68,4% da amostra *in natura* para 54,7% da amostra cujo tratamento foi o mais eficiente. Entretanto, observou um IC ainda menor (47,1%) para uma amostra cujo pré-tratamento foi menos eficiente. Segundo os autores, o aumento da área específica representou um fator mais importante que a redução do IC na melhora da sacarificação da biomassa.

SILVA *et al.* (2013a) apesar de atingirem rendimentos elevados de glicose de 76,4%, obtiveram uma redução baixa do IC de 58,9 para 57,9% no tratamento do bagaço da cana utilizando líquido iônico em uma extrusora dupla rosca.

Também foram medidos os índices de cristalinidade para as amostras de palha e bagaço pré-tratadas com três ciclos na configuração que contém o elemento reverso, utilizando glicerol como aditivo. Apesar da amostra de bagaço apresentar rendimento muito superior, seu índice de cristalinidade foi muito semelhante às demais amostras, como mostra a Figura 4.15. Estes resultados indicam que a redução do índice de cristalinidade não foi significativa no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por extrusão e não foi o fator responsável pelo aumento da sacarificação da biomassa pré-tratada.

Já para a palha pode-se observar uma redução apreciável do IC, embora ainda muito baixa se comparada com outros pré-tratamentos. Dessa forma a redução do IC decorrente do tratamento da palha pode ter colaborado para o aumento da sacarificação da biomassa.

# 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

## 5.1 Conclusões

Biomassa de cana-de-açúcar, bagaço e palha, foi submetida ao pré-tratamento por extrusão variando-se a natureza e a carga de aditivo, número de ciclos, temperatura, velocidade de rotação e configuração dos parafusos. A extrusão proporcionou cisalhamento e mistura levando a uma alteração física da biomassa, desordenando sua estrutura e reduzindo sua cristalinidade.

Foi indispensável a presença de um aditivo para o transporte da biomassa ao longo dos parafusos. A água além de se constituir como um bom aditivo, em termos de rendimento de hidrólise, tem a vantagem de já estar presente na biomassa advinda dos campos com um teor, em média, de 50%.

Entretanto, o uso da água como aditivo está limitado ao uso de baixas temperaturas do cilindro. Por esse motivo o glicerol foi adotado para os experimentos posteriores. Antes de adotar um aditivo é importante o conhecimento de que o mesmo não prejudica a etapa de hidrólise e de fermentação nas concentrações usadas, como foi o caso do glicerol.

Apesar do aditivo se apresentar fundamental para o transporte da biomassa, uma alta carga de glicerol aumentou a sua fluidez e reduziu o atrito gerado entre a biomassa e os parafusos. Consequentemente, a eficiência do pré-tratamento foi reduzida. Dessa forma, uma quantidade intermediária de glicerol de 43% foi mais apropriada para o pré-tratamento.

Os rendimentos de glicose na hidrólise das amostras tratadas se apresentaram muito pequenos e inferiores à maioria dos rendimentos dos tratamentos, via extrusão, encontrados na literatura, principalmente aqueles que associam a extrusão a tratamentos ácidos ou alcalinos. O rendimento de glicose alcançado em 72 horas de hidrólise nas condições de 50 °C, 30 rpm e processamento com somente 1 ciclo foi de apenas 37,0% para o bagaço e 37,3% para a palha, empregando 43 e 35% de glicerol, respectivamente.

Na tentativa de aumentar esses rendimentos, foram conduzidos experimentos em ciclos na extrusora. Foi observado, em 72 horas de hidrólise, um aumento contínuo do rendimento de glicose de 36,0 para 42,1% do primeiro ao terceiro ciclo da extrusão do bagaço. A extrusão da palha apresentou aumento contínuo de 38,0 a 54,9% do primeiro ao sétimo ciclo. Entretanto, estes incrementos foram pequenos, principalmente para o caso da palha.

Os resultados do planejamento experimental mostraram que a temperatura do cilindro e a velocidade de rotação dos parafusos exercem pouca influência na eficiência do pré-tratamento de forma que uma grande variação destes parâmetros levou a rendimentos que variaram dentro de uma faixa estreita de 35,8 a 41,6%. A combinação de altas temperaturas ou baixas temperaturas com altos tempos de residência (baixa velocidade de rotação) resultou nos maiores rendimentos de hidrólise encontrados.

A análise do consumo energético da extrusora mostrou um baixo consumo em comparação com alguns moinhos de bolas reportados na literatura e mostrou um consumo comparável em relação ao moinho de discos. Apesar disso, foi percebido um maior consumo energético específico para extrusões realizadas com o elemento reverso devido, principalmente, às baixas vazões empregadas.

A configuração dos parafusos foi o fator que exerceu maior influência no desempenho do pré-tratamento. A primeira alteração não acarretou mudanças significativas na eficiência do pré-tratamento, já a segunda resultou em um aumento substancial dos rendimentos de hidrólise, chegando a 68,5% em 72 horas. Estes resultados mostram que a presença do elemento reverso é indispensável para que sejam alcançados bons rendimentos de glicose ao final da hidrólise. Entretanto, o elemento reverso dificultou drasticamente passagem da biomassa causando diversos entupimentos e excesso de torque na região ao redor do mesmo. Para contornar esses problemas foi preciso reduzir a vazão de entrada para valores extremamente baixos.

Por meio da caracterização estrutural das biomassas foi possível observar algumas mudanças estruturais no material tratado que se apresentou mais cominuído e desestruturado em relação à sua morfologia original. Além disso, foi observada uma pequena redução do índice de cristalinidade de 57,2 para 54% para o bagaço e uma redução de 57,09 para 54,06% para a palha. A desestruturação da parede celular das biomassas, a redução das fibras e a redução da cristalinidade, provocadas pela extrusão,



podem ser consideradas as responsáveis pelo aumento da sacarificação em relação à biomassa *in natura*, devido a maior área de contato entre as enzimas e a celulose, facilitando o ataque enzimático.

Analisando os resultados expostos, o tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão se mostrou possível, chegando a conversões em glicose comparáveis com alguns resultados encontrados na literatura. Além disso, a extrusão por não apresentar quase nenhuma desvantagem somada aos bons rendimentos encontrados torna-se competitiva e promissora frente aos demais pré-tratamentos.

## 5.2 Sugestões

Uma forma de contornar os problemas causados pela presença do elemento reverso foi reduzir a vazão de entrada, entretanto, isso eleva o consumo energético por grama de biomassa tratada. Outra possibilidade seria aumentar o teor de aditivo na biomassa *in natura* para facilitar a fluidez do material principalmente na região do elemento reverso. Entretanto, aumentar a proporção aditivo:biomassa pode reduzir a eficiência do pré-tratamento. Dessa forma é deixado como sugestão para trabalhos futuros investigar se a alta carga de aditivo melhora a fluidez da biomassa na presença do elemento reverso e mantém a eficiência do pré-tratamento.

Como a alteração da configuração dos parafusos exerceu grande influência na eficiência do pré-tratamento, os bons resultados indicam que é conveniente investir em um estudo em que o desenho do parafuso seja uma das variáveis mais importantes a ser investigada e, com isso, novas configurações de parafusos sejam testadas.

Outra investigação plausível seria testar novamente a influência da temperatura do cilindro e da velocidade de rotação dos parafusos, porém, dessa vez, na presença do elemento reverso. É possível que, na presença deste, esses dois fatores exerçam maior influência no desempenho do pré-tratamento.

Também seria adequada uma análise energética em relação ao número de ciclos. As extrusões em ciclos aumentam os rendimentos em glicose, entretanto, demandam maior consumo energético. Dessa forma, uma análise do consumo

energético mais aprofundada é fundamental para se avaliar até quantos ciclos seriam viáveis de realizar.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R., RAMIREZ, J. A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M., 2002 “Kinetic Study of the Acid Hydrolysis of Sugar Cane Bagasse”, *Journal of Food Engineering* v. 55, pp. 309-318.

ALBERSHEIM, P., DARVILL, A., ROBERTS, K., SEDEROFF, R., 2011, *Plant Cell Walls*. 1 ed. Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC, New York, USA.

ALICE WEB, 2014, Sistema de Análise de Informação de Comércio Exterior. Disponível em: <<http://www.aliceweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em 16 de nov. 2014.

ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M. J., 2010, “Pretreatment Technologies for an Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: A Review”, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 4851-4861.

ANDERSEN, N., 2007, *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Experimental and Modeling Studies*. Ph.D. dissertation, Technical University of Denmark, Denmark.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C., 2008, “Progress in Bioethanol Processing”, *Progress in Energy and Combustion Science* v. 34, pp. 551-573.

BARROS, R. O., PAREDES, R. S., ENDO, T., BON, E. P. S., LEE, S. H., 2013, “Association of Wet Disk Milling and Ozonolysis as Pretreatment for Enzymatic Saccharification of Sugarcane Bagasse and Straw”, *Bioresource Technology* v. 136, pp. 288-294.

BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G. S., “Microbial xylanases and their applications: a review”. *Applied microbiology and Biotechnology* v. 56, p. 326-338, 2001.

BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S., 2014, “Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v. 36, pp. 91–106.

BELLIDO, C., BOLADO, S., COCA, M., LUCAS, S., BENITO, G. G., CUBERO, M. T. G., 2011, “Effect of Inhibitors Formed During Wheat Straw Pretreatment on Ethanol Fermentation by *Pichia Stipitis*”, *Bioresource Technology* v. 102, pp. 10868-10874.

BNDES – Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2008, *Bioetanol de Cana-de-açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável*. BNDES e CGEE (Org). 1 ed. Rio de Janeiro.

BRASIL. Resolução ANP n. 7, de 21 de fevereiro de 2013. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em 22 de nov. 2014.

CANILHA, L., CHANDEL, A. K., MILESSI, T. S. S., ANTUNES, F. A. F., FREITAS, W. L. C., FELIPE, M. G. A, SILVA, S. S., 2012, “An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* v. 2012.

CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A., PAZ, I. C., 2010, “Production of Bioethanol from Sugarcane Bagasse: Status and Perspectives”, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 4754-4766.

CARRASCO, C., BANDEL, H. M., SENDELIUS, J., MODIG, T., ROSLANDER, C., GALBE, M., HAGERDAL, B. H., ZACCHI, G., LIDEN, G., 2010, “SO<sub>2</sub>-Catalyzed Steam Pretreatment and Fermentation of Enzymatically Hydrolyzed Sugarcane Bagasse”, *Enzyme and Microbial Technology* v. 46, pp. 64-73.

CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., GÍRIO, F. M., 2008, “Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments”, *Journal of Scientific & Industrial Research* v. 67, pp. 849-864.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T., 1998, "Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw". *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 74, pp. 135-159.

CHEN, W., XU, Y., HWANG W., WANG, J. B., 2011, "Pretreatment of rice straw using an extrusion/extraction process at bench-scale for producing cellulosic ethanol", *Bioresource Technology* v. 102, pp. 10451-10458.

CHIRUVELLA, R. V., JALURIA, Y., KARWE, M. V., 1996, "Numerical Simulation of the Extrusion Process for Food Materials in a Single-screw Extruder", *Journal of Food Engineering* v. 30, pp. 449-467.

CHOI, C. H.; OH, K. K., 2012, "Application of a continuous twin screw-driven process for dilute acid pretreatment of rape straw", *Bioresource Technology* v. 110, pp. 349-354.

CUNHA, A. L., 1999, *Modelling and Optimization of Single Screw Extrusion*, Ph.D. dissertation, University of Minho, Braga, Portugal.

CURRELI, N., AGELLI, M., PISU, B., RESCIGNO, A., SANJUST, E., RINALDI, A., 2002, "A Complete and Efficient Enzymic Hydrolysis of Pretreated Wheat Straw", *Process Biochemistry* v.37, pp. 937-941.

DEMIRBAS M. F, 2009, "Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review". *Applied Energy* v. 86, pp. 151–161.

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

DUQUE, A., MANZANARES, P., BALLESTEROS, I., NEGRO, M. J., OLIVA, J. M., SAEZ, F., BALLESTEROS, M., 2013, “ Optimization of integrated alkaline–extrusion pretreatment of barley straw for sugar production by enzymatic hydrolysis”, *Process Biochemistry* v. 48, pp. 775–781.

FERNANDO, S., ADHIKARI, S., CHANDRAPAL, C., MURALI, N., 2006 “Biorefinery: Current status, challenges and future directions”, *Energy & Fuels* v. 20, p. 1727-1737.

FERREIRA-LEITÃO, V., PERRONE, C. C., RODRIGUES, J., FRANKE, A. P. M., MACRELLI, S., ZACCHI, G., 2010, “An approach to the utilization of CO<sub>2</sub> as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and straw for ethanol production”, *Biotechnology Biofuels* v.3, pp. 1-8.

GHOSE, T. K., 1987, “Measurement of cellulase activities”. *Pure and Applied Chemistry* v. 59, pp. 257-268.

GÓMEZ, S. M. R., ANDRADE R. R., SANTANDER C. G., COSTA, A. C., MACIEL, F. R., “Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis”. *2nd International Conference on Industrial Biotechnology*, UNICAMP, pp. 321-326, 2010.

GRAN BIO, 2015. Disponível em: <<http://www.granbio.com.br>>. Acesso em 26 de jan. 2015. GÖGER, A., 2013, *Modelling of Counter Rotating Twin Screw Extrusion*, D.Sc. thesis, School of Graduate Studies, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada.

HASETH, J. K., 2012, *Decrystallization of Lignocellulosic Biomass using Ionic Liquids*, Ph.D. dissertation, Department of Chemical Engineering, Norwegian University of Science and Technology, Norway.

HIDENO A., INOUE H., TSUKAHARA K., FUJIMOTO S., MINOWA T., INOUE S., ENDO T., SAWAYAMA S., 2009, “Wet disk milling pretreatment without sulfuric

acid for enzymatic hydrolysis of rice straw”, *Bioresource Technology* v. 100, pp. 2706-711.

HIETALA, M., NIINIMAKI, J., OKASMAN, K., 2011, “The Use of Twin-screw Extrusion in Processing of Wood: the Effect of Processing Parameters and Pretreatment”, *Bioresources* v. 6, pp. 4615-4625.

HJORTH, M., GRÄNITZ, K., ADAMSEN, A. S., MOLLER, H. B., 2011, “Extrusion as a Pretreatment to Increase Biogas Production”, *Bioresource Technology* v. 102, pp. 4989–4994.

HO, N. W. Y., CHEN, Z., BRAINARD, A. P., SEDLAK, M. “Successful Design and Development of Genetically Engineered *Saccharomyces* Yeasts for Effective Cofermentation of Glucose and Xylose from Cellulosic Biomass to Fuel Ethanol”. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* v. 65, G.T. Tsao , Berlin: Springer – Verlag, pp. 163 – 192, 1999.

HUANG, H., GUO, X., LI, D., LIU, M., WU, J., REN, H., 2011, “Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids” *Bioresource Technology* v. 102, pp. 7486–7493.

ISAACS, S. H., 1984, *Ethanol Production by Enzymatic Hydrolysis. Parametric Analysis of a Base-Case Process*. In: Report TR-231-2093, Solar Energy Research Institute, U.S. Department of Energy, United States of America.

JIANG, Q., 2008, *Modelling Flow, Meltin, Solid Conveying and Global Behavior in Intermeshing Counter-rotating Twin Screw Extruders*, D.Sc thesis, Graduate Faculty, University of Akron, Akron, Ohio, United States of America.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2009b, “Combined Effect of Alkali Soaking and Extrusion Conditions on Fermentable Sugar Yields from Switchgrass and Prairie Cord Grass”, ASABE paper no: 096754. ASABE Annual International Meeting Reno, Nevada.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2010a, "Influence of Extruder Temperature and Screw Speed on Pretreatment of Corn Stover while Varying Enzymes and Their Ratios", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, pp. 264-279.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2010b, "Effect of extruder parameters and moisture content of switchgrass, prairie cord grass on sugar recovery from enzymatic hydrolysis", *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 162, pp. 1785-1803.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2011a, "Optimization of Extruder and Prairie Cord Grass Parameters for Maximum Sugar Recovery Through Enzymatic Hydrolysis" *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* v. 5, pp. 520-531.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2011b, "Influence of Extruder and Feedstock Variables on Torque Requirement During Pretreatment of Different Types of Biomass - A Response Surface Analysis", *Biosystems Engineering* v. 109, pp. 37-51.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2011c, "Optimization of Alkali, Big Bluestem, Particle Size and Extruders Parameters for Maximum Enzymatic Sugar Recovery Using Response Surface Methodology", *Bioresources* v. 6, pp. 762-790.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2011d, "Optimization of alkali soaking and extrusion pretreatment of prairie cord grass for maximum sugar recovery by enzymatic hydrolysis", *Biochemical Engineering Journal* v. 54, pp. 71-82.

KARUPPUCHAMY, V., MUTHUKUMARAPPAN, K., 2009a, "Extrusion pretreatment and enzymatic hydrolysis of soybean hulls". *ASABE Conference*, BIO-097989, Seattle, Washington, USA, 11-14 October 2009.

KRISHNAN, C., SOUSA, L. C., JIN, M., CHANG, L., DALE, B. E., BALAN, V., 2010, "Alkali-based AFEX pretreatment for conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol", *Biotechnology and Bioengineering* v. 107, pp. 441-450.



LAGAERT, S., BELIËNB, T., VOLCKAERTA, G., 2009, “Plant cell walls: Protecting the barrier from degradation by microbial enzymes”, *Seminars in Cell & Developmental Biology* v.20, pp. 1064–1073.

LAMSAL, B., YOO, J., BRIJWANI, K., ALAVI, S., 2010, “Extrusion as a Thermo-mechanical Pre-treatment for Lignocellulosic Ethanol”, *Biomass and Bioenergy* v. 34, pp. 1703-1710.

LEE, S., INOUE, S., TERAMOTO, Y., ENDO, T., 2010a, “Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II: Effect of hot-compressed water treatment”, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 9645–9649.

LEE, S., TERAMOTO, Y., ENDO, T., 2009, “Enzymatic Saccharification of Woody Biomass Micro/nanofibrillated by Continuous Extrusion Process I – Effect of Additives with Cellulose Affinity”, *Bioresource Technology* v. 100, pp. 275-279.

LEE, S., TERAMOTO, Y., ENDO, T., 2010b, “Enhancement of enzymatic accessibility by fibrillation of woody biomass using batch-type kneader with twin-screw elements”, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 769–774.

LENIHAN, P., OROZCO, A., O'NEILL, E., AHMAD, M. N. M., ROONEY, D W., WALKER, G. M., 2010, “Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass”, *Chemical Engineering Journal* v. 156, pp. 395–403.

LI, J., LI, S., FAN, C., YAN, Z., 2012, “The mechanism of poly(ethylene glycol) 4000 effect on enzymatic hydrolysis of lignocellulose”. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* v. 89, pp. 203–210.

LIEW, W. H., HASSIM, M. H., D. K. S, “Review of evolution and sustainability assessment of biofuel production”, *6th International Conference on Process Systems Engineering*, 930–935, Kuala Lumpur, Malaysia, 25-27 June 2013.

LYND, L. R., WEIMER, P. L., ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S., 2002, “Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology”. *Microbiology Molecular Biology Reviews* v. 66, n.3, p.506-577.

McMILLAN, J. D., “Pretreatment of lignocellulosic biomass”. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (eds), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, chapter 15, Washington, USA, American Chemical Society, 2004.

MESA, L., GONZÁLES, E., CARA, C., GONZÁLES, M., CASTRO, E., MUSSATTO, S. I., 2011, “The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse”, *Chemical Engineering Journal* v. 68, pp. 1157–1162.

MILLET, M. A., EFFLAND, M. J., CAULFIELD, D. F., 1979, “Influence of Fine Grinding on the Hydrolysis of Cellulosic Materials – Acid vs. Enzymatic”, *Advances in Chemistry Series* v. 181, pp. 71-89.

MONTE, J. R., BRIENZO, M., MILAGRES, A. M. F., 2011, “Utilization of Pineapple Stem Juice to Enhance Enzyme-hydrolytic Efficiency for Sugarcane Bagasse after an Optimized Pretreatment with Alkaline Peroxide”, *Applied Energy* v. 88, pp. 403-408.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G. S., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M., 2013, ”Lignocellulosic Biomass to Bioethanol, a Comprehensive Review with a Focus on Pretreatment”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* v. 27, pp. 77–93.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., RICHARD, E., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M., 2005, “Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology* v. 96, pp. 673–686.

OLIVEIRA, F. M. V., 2010, *Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana*. Tese de D.Sc., Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B, 2000, "Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition", *Bioresource Technology* v. 74, pp. 25-33.

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

PARK, E. Y., NARUSE, K., KATO, T., 2011, "Improvement of Cellulase Production of Cultures of *Acremonium Cellulolyticus* Using Pretreated Waste Milk Pack with Cellulase Targeting for Biorefinery", *Bioresource Technology* v. 102, n. 10, pp. 6120-6127.

PERLACK, R. D., WRIGHT, L. L., TURHOLLOW, A., GRAHAM, R. L., 2005, *Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry the technical feasibility of a billion-ton annual supply*. 1 ed. Oak Ridge, EUA, Oak Ridge National Laboratory.

PEREIRA, Jr. N., COUTO, M. A. P. G., SANTA ANNA, L. M. M, "Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery". In: Pereira, Jr.N. (ed), *Series on Biotechnology*, 1 ed., Rio de Janeiro, Brazil, Brazilian National Library, 2008.

POPPE, M. K., CORTEZ, L. B., 2012, *Sustainability of sugarcane bioenergy*. 1 ed., Center for Strategic Studies and Management (CGEE), Brasília, Brazil, Corporate Financial Center.

RABELO, S. C., 2010, *Avaliação e Otimização de Pré-tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração*. Tese de D.Sc., Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

RABELO, S. C., CARRERE, H., MACIEL FILHO, R., COSTA, A. C., 2011, “Production of Bioethanol, Methane and Heat from Sugarcane Bagasse in a Biorefinery Concept”, *Bioresource Technology* v. 102, pp. 7887–7895.

RAÍZEN: Relatório de Sustentabilidade 2013/2014, São Paulo, Brasil. Disponível em: <<http://www.raizen.com.br>>. Acesso em 26 de jan. 2015.

ROCHA, G. J. M., MARTIN, C., SOARES, I. B., MAIOR, A. M. S., BAUDEL, H. M., ABREU, C. A. M., 2011, “Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production”, *Biomass and Bioenergy* v. 35, pp. 663-670.

ROMERO, I., RUIZ, E., CASTRO, E., MOYA, M., 2010, “Acid hydrolysis of olive tree biomass”, *Chemical Engineering Research and Design* v. 8, pp. 633–640.

SADDLER, J. N., GREGG, D. J. “Ethanol production from forest product wastes”. In: Bruce, A., Palfreyman, J.W. (eds.), *Forest Products Biotechnology*, pp 183-207, London, England, Taylor & Frances, 1998.

SANTOS, F. A., QUEIROZ J. H., COLODETTE, J. L., MANFREDI, M., QUEIROZ, M. E. L. R., CALDAS, C. S., SOARES, F. E. F., 2014, “Otimização do Pré-tratamento Hidrotérmico da Palha de Cana-de-açúcar Visando à Produção de Etanol Celulósico” *Química Nova* v. 37, pp. 56-62.

SEGAL, L., CREELY, J., MARTIN, A., CONRAD, C., 1959, “An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer”, *Textile Research Journal* v. 29, pp. 786-800.

SENDELIUS, J., 2005, “Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production”, Master of Science Thesis, Departamento of Chemical Engineering, Lund University, Sweden.

SILVA, A. S., INOUE, H., ENDO, T., YANO, S., BON, E. P. S., 2010, “Milling Pretreatment of Sugarcane Bagasse and Straw for Enzymatic Hydrolysis and Ethanol Fermentation”, *Bioresource Technology* v. 101, pp. 7402-7409.

SILVA, A. S., LEE S. H., ENDO T., BON, E. P. S., 2011, “Major improvement in the rate and yield of enzymatic saccharification of sugarcane bagasse via pretreatment with the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate ([Emim] [Ac])”, *Bioresource Technology* v.102, pp. 10505-10509.

SILVA, A. S., TEIXEIRA, R. S., ENDO, T., BON, E. S., LEE, S., 2013a, “Continuous Pretreatment of Sugarcane Bagasse at High Loading in an Ionic Liquid Using a Twin-screw Extruder”, *Green Chemistry* v. 15, pp. 1991-2001.

SILVA, A. S., TEIXEIRA, R. S., MOUTTA, R. O., FERREIRA-LEITÃO, V. S., BARROS, R. R. O., FERRARA, M. A., BON, E. P. S., 2013b, “Sugarcane and Woody Biomass Pretreatments for Ethanol Production”. In: Chandel, A. K., Silva, S. S. (eds), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass – Techniques, Applications and Commercialization*, 1 ed., chapter 3, Rijeka, Croatia, Intech.

SINGHA, J., SUHAG, M., DHAKAC, A., 2015, “Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review”, *Carbohydrate Polymers* v. 117, pp. 624–631.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLENTON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure*, NREL/TP-510-42628, 2011.

SOARES, I. B., TRAVASSOS, J. A., BAUDEL, H. M., BENACHOUR, M., ABREU, C. A. M., 2011, “Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse”, *Industrial Crops and Products* v. 33, pp. 670–675.

TAHERZADEH, M. J., KARIMI, K., 2007a, “Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review”, *BioResources* v. 2, p. 472-499.

TAHERZADEH, M., KARIMI, K., 2007b, “Enzyme-based Hidrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Material: A Review”, *Bioresources*, v. 2, pp. 707-738.

TODD, D. B., 1997, “Practical Aspects of Processing in Intermeshing Twin Screw Extruders”, ANTEC, (versão eletrônica), Polymer Processing Institute Hoboken.

TOQUERO, C., BOLADO, S., 2014, “Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing”, *Bioresource Technology* v. 157, pp. 68-76.

TRAVAINI, R., OTERO, M. D. M., COCA, M., SILVA, R., BOLADO, S., 2013, “Sugarcane Bagasse Ozonolysis Pretreatment: Effect on Enzymatic Digestibility and Inhibitory Compound Formation”, *Bioresource Technology* v. 133, pp. 332–339.

ÚNICA, 2014, União da Indústria de Cana-de-açúcar, São Paulo, Brasil. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em 15 de nov. 2014.

VAZ JUNIOR, S., 2011, *Biorrefinarias: Cenários e Perspectivas*. 1 ed. Brasília, Embrapa Agroenergia.

WJIAYA, Y. P., PUTRA, R. D. D., WIDYAYA, V. T., HA, J-M., SUH, D. J., KIM, C. S., 2014, “Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass”, *Bioresource Technology* v. 164, pp. 221–231.

YOO, J., 2011, *Technical and Economical Assessment of Thermo-mechanical Extrusion Pretreatment for ellulosic Ethanol Production*. D.Sc thesis, Department of Grain Science and Industry, College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan, Kansas.

YOO, J., ALAVI, S., VADLANI, P., BEHNKE, K. C., 2012, “Soybean Hulls Pretreated Using Thermo-Mechanical Extrusion—Hydrolysis Efficiency, Fermentation Inhibitors, and Ethanol Yield”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 166, pp. 576–589.

YOON, L. W., ANG T. N., NGOH, G. C., CHUA, A. S. M., 2012, “Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes”, *Biomass and Bioenergy* v. 36, pp. 160-169.

ZHANG, S., KESHWANI, D. R., XU, Y., HANNA, M. A., 2012, “Alkali Combined Extrusion Pretreatment of Corn Stover to Enhance Enzyme Saccharification” *Industrial Crops and Products* v. 37, pp. 352-357.

ZHANG, S., XU, Y., HANNA, M. A., 2011, “Pretreatment of Corn Stover with Twin-screw Extrusion Followed by Enzymatic Saccharification”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 166, pp. 458 – 469.

ZHAO, X., PENG, F., CHENG, K., et al., 2009, “Enhancement of the Enzymatic Digestibility of Sugarcane Bagasse by Alkaliperacetic Acid Pretreatment”, *Enzyme Microbial Technology* v. 44, pp. 17–23.

ZHENG, Y., PAN, Z., ZHANG, R., WANG, D., JENKINS, B., 2008, “Non-ionic surfactants and non-catalytic protein treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated Creeping Wild Ryegrass”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 146, pp. 231-238.

ZHU, J. Y., WANG, G. S., PAN, X. J., 2009, “Specific Surface to Evaluate the Efficiencies of Milling and Pretreatment of Wood for Enzymatic Saccharification”, *Chemical Engineering Science* v. 64, pp. 474-485.