

GLAUCO DA CRUZ CANEVARI

Pré-tratamento ácido e básico de bagaço de cana-de-açúcar e sacarificação enzimática

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C221p
2013

Canevari, Glauco da Cruz, 1982-

Pré-tratamento ácido e básico de bagaço de cana-de-açúcar
e sacarificação enzimática / Glauco da Cruz Canevari. – Viçosa,
MG, 2013.

xi, 55f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Luciano Gomes Fietto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Cana-de-açúcar. 2. Bagaço de cana. 3. Resíduos como
combustível. 4. Etanol. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

GLAUCO DA CRUZ CANEVARI

Pré-tratamento ácido e básico de bagaço de cana-de-açúcar e sacarificação enzimática

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:

Prof. Márcio

Prof. Arlindo

Prof. Valéria
(Coorientadora)

Prof. José Humberto de Queiroz
(Coorientador)

Prof. Luciano Gomes Fietto
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Francisco e Salete.

Aos meus irmãos Samuel e Thiago. A minha esposa Lea Sthefany. Ao meu filho Arthur.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realizar este trabalho.

A os professores da UFV, especialmente aos do Departamento de Bioquímica agrícola, que contribuíram muito para a minha formação acadêmica e pessoal e profissional.

A FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais e irmãos, minha esposa e filho que me apoiaram durante essa empreitada.

Ao meu professor e orientador Luciano Gomes Fietto, por me acolher ao seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, pela orientação, amizade e compreensão durante todo o Doutorado.

Ao secretário Eduardo pela dedicação e boa vontade indispensáveis em todos os momentos.

Aos amigos dos laboratórios que foram parceiros para o desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA

GLAUCO DA CRUZ CANEVARI, filho de Francisco Aparecido Canevari e Salete da Cruz Canevari, nasceu em 23 de Abril de 1982, Pereira Barreto, São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil.

Em Janeiro de 2003, ingressou no Curso de Graduação de Ciências Biológicas (Licenciatura) pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), em Três Lagoas, Mato Grosso do Sul, formando em dezembro de 2006.

Em Agosto do ano de 2007, ingressou no Curso de Mestrado em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, submetendo se à defesa de dissertação em Julho de 2009.

Em Agosto de 2009, ingressou no Curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais, submetendo a qualificação no primeiro semestre de 2011 e à defesa de tese em Julho de 2013.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Pretreatment of sugarcane bagasse for second generation ethanol production – Review - Periódicos de revisão (Normas: <i>Química nova</i>).....	07
Abstract.....	09
Environmental and economic aspects related to the production of ethanol.....	10
Lignocellulosic biomass of sugarcane.....	11
Mechanical treatment.....	15
Acid pretreatment.....	16
Alkaline pretreatment.....	18
Hydrothermal.....	19
Autohydrolysis.....	20
Steam explosion.....	21
Ammonium fiber explosion (AFEX).....	22
Organosolv and other pretreatment.....	23
Conclusions and perspectives.....	24
References cited	25

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 e 2	37
Tabela 1	38

CAPÍTULO 2 - Acid and basic pretreatment of bagasse cane sugar and enzymatic saccharification.....	39
Objetivo geral.....	40
Objetivo específico.....	40
Resumo.....	41
Introdução.....	41
Materiais e métodos.....	43
Material.....	43
Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	43

Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos.....	44
Determinação das condições iniciais de pré-tratamento do bagaço de cana.....	44
Hidrólise enzimática.....	45
Métodos analíticos para a quantificação de Glicose.....	45
Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural.....	46
Análise do bagaço por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	46
Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).....	46
Termogravimetria (TG).....	46
RESULTADOS.....	47
Composição do bagaço da variedade RB867515.....	47
Pré-tratamento no tempo de 30 min, concentração de ácido sulfúrico 1,25 %, relação líquido-sólido para 1:10.....	47
Dados da hidrólise do pré-tratamento do bagaço.....	51
Discussão.....	51
Conclusão.....	55
Referencias.....	55

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.....	48
Figura 2.....	50
Figura 3.....	51
Figura 4.....	51
Figura 5.....	52
Tabela 1	44
Tabela 2	45
Tabela 3	47
Tabela 4	48
Tabela 5	49
Tabela 6	50

CAPÍTULO 1

PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Glauco C. Canevari

Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000 Viçosa -MG,
Brasil. Universidade Estadual de Minas Gerais, Rua: General Olímpio Mourão Filho,
s/n, 36.700.000 Leopoldina-MG, Brasil.

Carlos J. A. de Souza, Luciano G. Fietto*

Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n, 36570-000 Viçosa – MG,
Brasil.

PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

Different technologies are being tested for pretreatment of lignocelluloses from sugarcane for the production of second generation ethanol. This review will discuss the basics as well as advantages and disadvantages of various pretreatment methods. Several techniques will be compared to assist future efforts in the choice of pretreatment method to maximize ethanol yields (add: e outos subprodutos??).

Keywords: pretreatment, lignocelulosic biomass; fuel ethanol.

1. ENVIRONMENTAL AND ECONOMIC ASPECTS RELATED TO THE PRODUCTION OF ETHANOL

Renewable energies are considered promising and aim to reduce energy dependence on oil.^{1,2,3} Ethanol is produced on a large scale by the United States and Brazil from corn and sugar cane.⁴ Currently, this alternative energy strategy is the most established and accepted by society.³ The high demand for ethanol has led to a controversy surrounding the negative impact that these energy crops are causing on food production, particularly in the use of corn in the United States and the increase in cultivated area for sugar cane in Brazil. In Brazil, sugar cane bagasse has received special attention, both for its availability and the high content of carbohydrates that can be converted to ethanol.^{4,5} Second generation ethanol production from biorefinery agricultural waste is receiving a considerable research investment.

Brazil is the largest producer of sugarcane, representing approximately 30% of the world production.^{6,7} Currently, the cultivated area of sugarcane is estimated at 8 million hectares. The harvest of sugarcane in 2011 reached 625 million tons, an increase of 3.4% over the 2009-10 season, with 46% of the total sugarcane intended for sugar production and 54% for ethanol production. Every kilogram of sugar produced results in 0.3 g of molasses and 1.25 kg of bagasse.⁸ One ton of sugarcane generates on average 80 L of first generation ethanol and approximately 275 kg of bagasse. Thus, the use of bagasse can generate an increase of approximately 30% in the current output of alcohol without requiring expansion of the cultivated area. Currently, ethanol yield per hectare of sugarcane is approximately 6,000 L; this could be increased to 10,000 L if 50% of the bagasse were converted to ethanol.^{4,9}

2. LIGNOCELLULOSIC BIOMASS OF SUGARCANE

Lignocellulosic material such as bagasse from sugar cane is composed mainly of two polysaccharide fractions (cellulose and hemicellulose) and a polyphenolic polymer (lignin). Cellulose is the most abundant component (33-51%) and comprises linear chains of glucose molecules linked by β (1-4) glycosidic bonds.^{10,11} Hemicellulose makes up 15-35% of the biomass and consists of heterogeneous polymers that form branched chains predominantly containing pentoses (D-xylose, L-arabinose) and hexoses (D-mannose, D-glucose, D-galactose), with a small fraction of uronic acids derived from oxidation of carboxylic acids of aldoses.^{3,12} Hemicellulose is found in the crushed cane sugar in proportions of up to 34% of the total carbohydrates, and acid hydrolysis can result in decomposition to xylose, arabinose, uronic acids, furfural and hydroxymethylfurfural (Fig. 1). Hemicellulose is structurally similar to cellulose, and both are deposited in the cell wall before lignifications.^{13,14} Lignin is an aromatic biopolymer composed of phenylpropanoid units, hydroxycinnamyl alcohols derived from three monolignols, varying the proportion of phenylpropanoid precursors (e.g., paracoumaryl alcohol, coniferyl alcohol and sinapyl alcohol) that differ among species and tissues of plants and environmental conditions.^{15,16} These three monolignols are incorporated into the lignin polymer in the form of p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G), and syringyl (S) subunits and the proportion of the S and G subunits dictates the degree of lignin condensation.¹⁶ The lignin complex is among the most abundant structures synthesized by plants and serves to protect the plant tissue against microbial attack while also preventing collapse of conductive elements of water and nutrients.^{12,17} The lignin content in sugar cane bagasse averages 21-32% (Fig. 1) and can be decomposed into phenolic compounds such as ferulic acid.^{5,18,19} The lignin is not used

for bioethanol production, but it can be used for the production of chemicals such as solvents and paints, as well as fuel for burning to generate electricity.^{1,20,21,22} Carbohydrates and lignin interact by covalent and hydrogen bonds in the structure of the plant cell wall, forming a complex network that provides microbial resistance.^{23,24} Lignocellulosic biomass is formed by two types of fiber: one with high crystallinity that has as characteristic low susceptibility to digestion, and amorphous (disordered) fibers that are more susceptible to chemical reactions and thus are more readily degraded.⁵ The crystalline regions of the cellulose microfibrils are formed by polymers of glucans that interact through hydrogen bonds and van der Waals forces. In this arrangement, the glucans are evenly spaced and in close proximity; small molecules such as water have difficulty penetrating the fiber.^{25,26}

The recalcitrance of lignocelluloses is a major obstacle for economical production of second generation bioethanol. The main factors that contribute to the recalcitrance of biomass are cellulose crystallinity, degree of polymerization, particle size, porosity, and the presence and distribution of lignin and hemicellulose.^{27,28} It has been reported that the degree of crystallinity is the major factor that contributes to the hydrolysis resistance of the fiber by hindering access of cellulases to glycosidic bonds.²⁹ The degree of polymerization is related to the size of the polymer and studies have shown that lowering the degree of polymerization contributes to an increase in surface area and consequently to the yield of the enzymatic hydrolysis sugars.^{17,30} The porosity of lignocellulosic material compared to the size of the enzymes may hinder access to glycosidic linkages and enzymes may become attached to the pores.³¹ The presence and distribution of lignin may hinder hydrolysis because it acts as a barrier that prevents binding of the enzyme to the polymer.²⁹ Hydrolysis may also be affected by non-productive adsorption of cellulases in lignin.³²

These factors together make it difficult for enzymes to cleave glycosidic linkages in the polymers of cellulose and hemicellulose.^{11,33,28} Thus a pretreatment step prior to hydrolysis is necessary to overcome the recalcitrance and render the cellulose and hemicellulose more accessible to hydrolytic enzymes.^{3,34,35} (Table1).

3. PRODUCTION OF SECOND GENERATION ETHANOL

The sugarcane bagasse is rich in polymerized sugars that can be released by enzymatic hydrolysis and then fermented by microorganisms such as *Saccharomyces cerevisiae*,³⁶ *Kluyveromyces marxianus*,³⁷ to produce ethanol (Fig. 2). Unlike the process for producing ethanol from sugar cane juice, the cellulosic ethanol production requires two steps preceding the fermentation process, namely pretreatment and enzymatic hydrolysis,^{27,38,39} Thus, the complete process of producing ethanol from biomass requires four steps. The first step is the pretreatment that decreases the recalcitrance of lignocellulosic matrix and facilitates enzymatic access to the bagasse fibers.^{40,41,42} The second step is the enzymatic hydrolysis or saccharification of biomass using cellulolytic enzymes. This step may use a mixture of endo- β -1,4-glucanoglucanhydrolases, exo- β -1,4-glucanocellulobiohydrolases (cellulases) and β -glucosidases.^{43,44,45} The third step is the fermentation of pentoses and hexoses by microorganisms. The principal organism used is the yeast *S. cerevisiae*. However, this microorganism is not capable of fermenting xylose to ethanol. Moreover, microorganisms that naturally use xylose such as *S. stipitis* are not tolerant to ethanol or ferment xylose to xylitol. Thus, different strategies for metabolic engineering, evolutionary engineering and random mutation using yeasts and bacteria have been

developed to obtain strains able to ferment xylose.^{46, 47} The fourth step is the distillation of ethanol.³

4. PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC MATERIAL FROM SUGARCANE

Pretreatment is recognized as the most crucial step for having an impact on other steps in the bioprocess as it influences the saccharification, fermentation and recovery of products and energy demands along the processing line.^{4, 14,48,49,50,51} An ineffective pretreatment can result in the production of toxic compounds that affect the performance of yeast in the fermentation step (Fig. 1).^{35,36,44,52} Thus, the pretreatment must meet certain preconditions to be considered efficient at minimizing energy demand to avoid the destruction of the hemicellulose and cellulose and avoid the formation of fermentation inhibitor compounds.^{4,53} It is suggested in the literature that the optimal pretreatment must achieve the following objectives: (1) increase the digestibility of biomass, (2) prevent the loss or degradation of carbohydrates, (3) prevent the formation of inhibitors for subsequent hydrolysis and fermentation processes, and (4) be economically viable.^{28,49}

There are various methods of pretreatment described for the sugar cane bagasse including physical treatment^{5,54}, chemical treatment^{14,55,56,57}, physicochemical treatment⁵⁸ and biological treatment.²³ Physical pretreatment seeks to reduce the size of the biomass and consequently the degree of polymerization, thus increasing the surface area. Biological pretreatment involves the use of fungi that produce enzymes that degrade hemicellulose and lignin with less impact on cellulose. Chemical pretreatment involves the use of chemicals such as acids, bases and organic substances to solubilize the hemicellulose and lignin. Physicochemical pretreatment seeks to solubilize or even

decrease the interaction between the different components in the lignocellulosic fractions to obtain higher yields in enzymatic hydrolysis.^{9,11,27} Hemicelluloses are normally removed during the initial processing. Acids, water or steam are the most widely used options for the selective fractionation process, whereas alkaline agents are selective for lignin removal.^{3,19} The removal of hemicellulose and lignin (delignification) can significantly increase the yields of sugars on enzymatic hydrolysis of cellulose. When the lignocellulosic material is exposed to different pretreatment conditions, its structural organization is disrupted, thus decreasing the recalcitrance of cellulose.^{36,44,59,60,61} Various experimental pretreatment conditions have been studied to cheaply and efficiently improve ethanol yield and enable the extraction of chemical compounds derived from the fiber for other industrial purposes (Table 1).^{6,20,22} Today, the production cost and the lack of efficient technologies for lignocellulosic ethanol are the main impediments to large-scale commercialization of this technology.⁴

5. MECHANICAL TREATMENT

Pretreatment by mechanical grinding reduces the particle size and crystallinity, increasing the accessible area for hydrolysis. Physical processes such as grinding rolls, hammer mill, knife mill, ball mill and wet milling with disk have been used as physical treatments. The particle size is approximately 10-30 mm after chipping and 0.2 to 2 mm after grinding or crushing. 20-40 mesh particles are used and do not cause an adverse effect on the yield of glucose from the enzymatic hydrolysis.⁴⁹ The increased surface area and decreased crystallinity of the fibers result in an increase in the yield of glucose from enzymatic hydrolysis of between 5-25%.¹⁴ This depends on the composition of the

lignocellulosic material, time and type of milling used and generally reduces the time of the saccharification step by 23-59%.^{27,62} The reduced time for pretreatment and hydrolysis are key factors in the production of second generation ethanol because they significantly decrease the production costs. The hydrolysis of biomass after pretreatment with the ball mill presents yields of 78.7% glucose and 72.1% xylose from bagasse and yields of 77.6% glucose and 56.8% xylose from cane leaves. Meanwhile, pretreatment using wet grinding disk results in yields of 49.3% glucose and 36.7% xylose for pulp and approximately 68% glucose and 50% xylose for straw.⁵ This suggests that the ball mill is more efficient at reducing the crystallinity of lignocellulosic material. The physical pretreatment is usually preferred over almost all other pretreatments. Thus, the effect of combined pretreatments has been explored; this tends to improve the yield of saccharification, and the cost-effectiveness of each method should be evaluated. The ball mill is highly effective for reducing the crystallinity of biomass; however, it is economically unfavorable when comparing the energy costs of other pretreatments and the production of fermentation inhibitors in the process.^{5,30} Reducing the physical size of the particle was able to increase the conversion rates to approximately 50%, while chemical modification achieved in the conversion reaches approximately 70% of the biomass.³⁰

6. ACID PRETREATMENT

The function of acid pretreatment is to solubilize the hemicellulose fraction from biomass via the cleavage of glycosidic linkages, making the cellulose more accessible for cellulase hydrolysis.^{27,63} Various types of acids are used, such as sulfuric acid (H_2SO_4),^{7,58,14} hydrochloric acid (HCl),⁶⁴ acetic acid,¹⁴ phosphoric acid

(H_3PO_4),^{65,66} and hydrogen peroxide (H_2O_2).^{22,67} The pretreatment consists of adding concentrated acid to dilute biomass, followed by incubation at a certain temperature and time.²⁸ Pretreatment acid (e.g., sulfuric acid (H_2SO_4)) can be used in concentrated or diluted form, 72% or 1.25%, respectively (Table 1).^{12,68} Diluted acid is used more frequently to solubilize the hemicellulose.^{14,27} Concentrated acid causes higher solubilization of hemicellulose but its use demands extreme caution; in addition to being toxic and corrosive, concentrated acid can promote further degradation of cellulose and hemicellulose and generate acetic acid by deacetylation of hemicellulose and furfural by dehydration of sugars (Figure 1).^{27,36,69} The diluted acid is widely used in operating conditions with variation of temperature (80-200 °C), solid-liquid ratio (1:0-1:20 w/v), type and concentration of acid (0.25-8% w/v) and reaction time (1-40 min).^{14,22,58} To reduce the generation of fermentation inhibitor by products such as furfural, hydroxymethyl furfural and acetic acid and to increase the yield of glucose in this process, kinetic models have been developed in the laboratory at semi-pilot and pilot scales (Table 1) to improve the pre-treatments for solubilization and removal of various chemical compounds present in the sugarcane biomass (Fig. 1).^{14,19,58} Statistical models have been used to optimize the pretreatment process by evaluating the interaction effects of the various process factors.^{14,56,70,71} According to Canilha,⁷ statistical models are based on the response surface methodology (RSM), in central composite design, whose equations can be determined by linear regression and factorial design to better classifying the variables studied in the pretreatment (temperature, time, acid concentration and solid-liquid ratio) based on their influence on the process. For example, temperature has the greatest effect among the significant variables explored, followed by acid concentration and the time (temperature > conc. acid > time). Canettieri,⁷² successfully optimized the saccharification process in pilot scale reactors to

achieve efficient yields of sugars (xylose, arabinose and glucose) while minimizing formation of undesirable fermentation inhibitor byproducts (furfural, 5-hydroxymethylfurfural and acetic acid). These statistical analyses have shown that the variables with the greatest influence on the outcome include the following: the effective bagasse solubility, recovery of xylose from hydrolysis of hemicellulose, the efficiency of enzymatic saccharification of cellulose and loss of cellulose, hemicellulose and lignin from pretreated bagasse.⁷ The temperature directly influences the rate of removal of the hemicellulose fraction; low temperatures (110-160 °C) require longer periods of pretreatment, whereas high temperatures (160-260 °C) favor the hydrolysis of cellulose.^{48,49,71} Typically, temperatures above 160 °C have been employed in reactors with 1% (w/v) sulfuric acid, solid-liquid ratio 10% (w/v) to give 90% solubilization of hemicellulose with only 15% degradation of cellulose and little effect on lignin.¹⁴ The solubilization of hemicellulose and cellulose digestibility depends on the chemical composition of the raw material; therefore, an analysis of the lignocellulosic material is required to allow for optimization of pretreatment conditions before scale-up. Due to its ability to remove hemicellulose, acid pretreatment has been used in combination with the alkaline pretreatment for fractionating biomass, thus increasing both the concentration of cellulose and the yield of the fermentation.⁷³

7. ALKALINE PRETREATMENT

Alkaline pretreatments increase the digestibility of cellulose and are more effective for solubilizing lignin, with lower solubility of the cellulose and hemicellulose.¹⁹ Alkaline pretreatment is described as causing less degradation of

sugars compared to acid pretreatment and was more effective than agricultural waste materials timber.⁶⁰ During alkaline pretreatment, the first reaction that occurs is the swelling of the biomass, which facilitates enzymatic access to the fibers.²⁷ Further, some alkali may remove acetyl groups from hemicellulose, thereby decreasing the steric hindrance to degradation enzymes.^{27,28,53} As in the acid pretreatment, factors such as the concentration of alkali, temperature, pressure and exposure time of the lignocellulosic material influence the efficiency of the lignin removal process (Table 1). Alkaline treatments cause less deterioration than do sugar acids. The loss of sugars and the production of fermentation inhibitor compounds must be considered to optimize the conditions of pretreatment.²⁸ Monomers of hemicellulose are easily degradable and may generate other volatile compounds such as furfural, which cause losses and fermentation inhibition (Fig. 1).

Alkali commonly used for pretreatment of lignocellulosic biomass are sodium hydroxide (NaOH),^{19,74} potassium hydroxide (KOH),⁷⁵ calcium oxide (CaO).⁵⁴ Crushed sugar cane was exposed to acid and then alkali pretreatment to generate a higher yield of sugars during enzymatic hydrolysis. This combination also increased solubilization of hemicellulose (55-62%) and lignin (54-74%) to separate glucose, the sugar of greatest interest for ethanol production.^{5,14,67} The delignification process using NaOH 1% (w/v) at 100 °C achieved approximately 81% lignin solubilization.

8. HYDROTHERMAL

The hydrothermal pretreatment typically includes hot water (autohydrolysis) and steam explosion. These and other physicochemical methods have been gaining attention because they are effective for various types of lignocellulosic materials.^{28,48,76}

The goal of both methods is the selective solubilization of hemicellulose. These processes generally do not require the use of chemical reagents, which makes them economically and environmentally attractive³ (Table 1). The hydrothermal operating conditions vary greatly and depend mainly on the type of method (autohydrolysis or steam explosion) used.

9. AUTOHYDROLYSIS

This method disrupts the lignocellulosic fiber by a highly explosive decomposition process where the vapor pressure starts out high and is then rapidly reduced, thereby breaking the hydrogen bonds and that stabilize the lignocellulose. The mechanical effects of autohydrolysis arise from the explosive decompression, which promotes disruption of structural material, generating high solubility (approximately 55-84%) hemicellulose.^{3,28,77} The autohydrolysis process has been used at temperatures of 150-230 °C, with the lignocellulosic material being hydrolyzed by the ionization reaction of water and hydrogen ions. Because the acetic acid catalysts are generated from the fiber itself, this method theoretically does not require chemicals for solubilizing polysaccharides.^{19,28} Thus, the fibers of lignocellulosic material can be easily hydrolyzed after autohydrolysis, obtaining higher yields due to decomposition of hemicellulose and lignin transformation. Autohydrolysis has many advantages when compared to other pretreatments, including low investment and operating costs, low formation of inhibitors, high solubilization of cellulose and lignin, and a lack of need for chemicals (Table 1). This process results in approximately 95% recovery of cellulose with 60% yield of the enzymatic hydrolysis, 41% recovery of xylose fraction and a significant net saving of 70% power.^{49,60}

The autohydrolysis pretreatment may also be combined with other methods involving the addition of chemicals. Thus, the crushed cane sugar exposed to hydrothermal process (autohydrolysis) together with alkaline pretreatment achieved revenues of approximately 20 g/L ethanol under the following conditions (195 °C/10 min reactors from 20 L and treated with NaOH 1 % (w/v) at 100 °C for 60 min, solid-liquid ratio (1:10).¹⁹ Generally, the hydrothermal pretreatment adds advantages in the reduction of costs for catalysts and reactors due to low corrosion potential of the process.

10. STEAM EXPLOSION

Steam explosion is classified as a thermochemical mechanical process, and it promotes the breakdown of structural components by heat from steam (thermal), shear strength due to expansion of water (mechanical) and hydrolysis of the glycosidic linkages (chemical), the latter being catalyzed by acids released from the degradation of structural components of the biomass itself.³ Steam explosion, autohydrolysis and physicochemical processes are very similar, and the operating conditions depend mainly on the type of pretreatment. The steam explosion process is being implemented mainly in pilot scale and industrial pulp and paper in Brazil.^{3,14} Several factors can influence the efficiency of the steam explosion pretreatment; these include the particle size and the combination of temperature and time.^{76,78} The initial temperature for steam explosion pretreatment is higher (160-260 °C) compared to autohydrolysis (150-230 °C for 30-60 min). However, the reaction time for steam explosion is short, requiring only seconds or minutes before the lignocellulosic material is exposed to atmospheric thermal and pressure conditions.^{35,49,78,79} Thus, steam explosion pretreatment may also

be conducted with the addition of acid or alkali to the process. The addition of dilute H₂SO₄ or sulfur dioxide (SO₂) in this method can effectively improve enzymatic hydrolysis by promoting a better removal of hemicellulose (30 and 80%, respectively).^{60,70,79} Zeng,⁸⁰ reported that the addition of ferulic acid esterase accelerated the hydrolysis of straw cane sugar with steam explosion, breaking ester linkages between phenolic acids, leading to better accessibility to cellulose and lignin removal. The type and amount of toxic compounds generated depend on the lignocellulose material and operating conditions applied to pretreatment such as residence time (t), temperature (T), size and crystallinity index of the particles (CRI) and solid-liquid ratio (S:L). The major inhibitory compounds are derivatives of furans and phenolic acids, which can be generated from the degradation of hexoses and pentoses, respectively.

11. AMMONIUM FIBER EXPLOSION (AFEX)

Ammonium fiber explosion (AFEX) process is a pretreatment that contains both alkaline and physicochemical elements. The lignocellulosic material is subjected to liquid ammonia at elevated temperature and pressure. Reduction in pressure results in the expansion of ammonia gas causing swelling and physical damage to the lignocellulosic material. AFEX is similar to steam explosion and has been used in bagasse, cane leaves, grasses, corn and timber. The optimum conditions for AFEX is typically 1-2 kg ammonia per kg of dry biomass, reactor temperature between 60-100 °C and residence time of 5-30min.^{35,49,60} Efficient AFEX process depends on such parameters as the loading of ammonia and water, temperature, time and pressure and the type of biomass used.⁵³ AFEX pretreatment promotes low solubility of hemicellulose and cellulose and requires

greater financial investment when compared with other pretreatments such as dilute acid and autohydrolysis. Thus, to reduce process costs and avoid environmental damage, ammonia must be recycled after pretreatment.^{70,75} Lignocellulosic material pretreated with AFEX can result in 40-50% yield after enzymatic saccharification, and the use of this method produces no inhibitory compounds to the fermentation process.^{48,81} However, the AFEX process is not as effective for biomass with a high content of lignin and does not generate changes in the chemical composition of biomass.^{35, 49,81,82}

12. ORGANOSOLV

Organosolv is a pretreatment method that makes use of solvents or aqueous solvent mixtures. Solvents in use include ethanol, methanol, acetone and water. The most commonly used alcohols are methanol and ethanol because of their low boiling point. These alcohols are low in cost compared to other solvents and are also easily recovered by the end of the distillation process. Organic acids may also be used; however, these have the disadvantage of equipment corrosion as well as acetylation of the cellulose during pretreatment. Depending on the solvent, lignin can be obtained in high purity.^{28,74} The process itself involves mixing the organic solvent with water in different proportions together with the biomass. This mixture is then heated, resulting in solubilization of the hemicellulose and lignin. It is important that the solvent can be recovered at the end of the process.⁷⁴

13. OTHER PRETREATMENT

Many additional types of pretreatments have been studied, including biological pretreatment,^{60,63} ionic liquid,⁸³ ozonolysis,⁴⁹ microwave,⁸⁴ and wet oxidation⁸⁵ In addition to the treatments described in item 3, other types can be used. These treatments require further study to evaluate their effect on sugarcane bagasse disorganization, possible income generated from sugars, and formation of undesirable compounds. Thus, success in selecting a particular pretreatment depends on the type of biomass to be used (cane, maize, sorghum) and operating conditions explored because plant cell wall composition is not uniform and varies with age, species and the environment.^{86,87,88}

14. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The significant increase in bioethanol production (add no brasil??) should be associated with the use of agricultural residues, in particular biomass bagasse from sugar cane. This challenge is linked to the development of more efficient technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass and subsequently other processes such as enzymatic saccharification and fermentation. It is noteworthy that research for second generation bioethanol is advancing dramatically. Recent literature suggests that the crushing of bagasse has been done primarily using the slicer, which is less efficient than mill balls but is faster and cheaper. Another important factor is the particle size of the biomass, which can affect the performance of carbohydrates in the enzymatic saccharification step. Atualmente, várias metodologias de pré-tratamento vem sendo avaliadas, mas indicar a mais eficiente é impossível, uma vez que todas possuem vantagens e desvantagens em etapas posteriores e qual molécula pretende extrair (exemplo; xilose, glicose e lignina).⁴⁰⁰ (add no texto??). Among the hydrothermal pretreatments (physical and chemical), the autohydrolysis process is the most promising technique for

the conversion of cellulosic ethanol from sugar cane bagasse, (essa afirmativa (em amarelo) foi questionada pela revisor anterior, devemos retirar??) as it obtains an efficient solubilization of hemicellulose, can be done without the use of chemicals (which consequently generates fewer fermentation inhibitors), and can be enhanced by adding dilute sulfuric acid and/or sodium hydroxide. Efficient release of C5 and C6 sugars can be optimized with the aid of statistical methods. The cell wall is highly complex, and research in cellular, molecular and structural biology could help to uncover the various catalytic reactions that occur in biomass. Following the pretreatment steps that utilize enzymes and yeast there must be an integrated system for production of cellulases and xylanases as well the development for yeast co-fermentation of glucose and xylose on the large scale. Finally, ethanol is often considered the only product to be obtained from lignocellulosic biomass from sugar cane; however, the efficient implementation of these pretreatment methods would have result in both financial and energy savings.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the support of the “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais” (FAPEMIG).

REFERENCES CITED

1. Saxena, R. C.; Adhikari, D. K.; Goyal, H. B.; *Renewable Sustainable Energy Rev.* 2009, 13, 167.

2. Allen, S. A.; Clark, L.; McCaffery, J. M.; Cai, Z.; Lanctot, A.; Slininger, P.J.; Liu, Z. L.; Gorsich, S.W.; *Biotechnol Biofuels*. 2010, 2, 1.
3. Girio, F. M.; Fonseca, C.; Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R.; *Bioresour Technol*. 2010, 101, 4775.
4. Cardona, C. A.; Quintero, J. A., Paz, I. C.; *Bioresour Technol*. 2010, 101, 4754.
5. Silva, A. S.; Inoue, H.; Endo, T.; Yano, S.; Bom, E. P. S.; *Bioresour Technol*. 2010, 101, 7402.
6. Hartemink, A. E.; *Adv Agron*. 2008, 99, 125.
7. Canilha, L.; Santos, V. T. O.; Rocha, G. J. M.; Almeida, J. B.; Giulietti, M.; Silva, S.S.; Felipe, M.G.A.; Ferraz, A.; Milagres, A.M.F.; Carvalho, W. J. *Ind Microbiol Biotechnol*. 2011, 38, 1467.
8. Botha, T.; Blottnitz, H. V.; *Energy Policy*. 2006, 34, 2654.
9. Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. S.; Medeiros, A. B. P.; Karp, S. G., Buckeridge, M.; Ramos, L. P.; Pitarelo, A. P.; Ferreira-leitão, V.; Gottschalk, L. M. F.; Ferrara, M. A.; Bom, E. P. S.; Moraes, L. M. P.; Araújo, A.; Torres, F. A. G.; *Bioresour Technol*. 2010, 101, 4820.
10. Betancur, G. J. V.; Pereira JR, N.; *Electronic J Biotechnol*. 2011, 13, 1.

11. Brodeur, G.; Yau, E.; Badal, K.; Collier, J.; Racachandran, K. B.; Ramakrishnan, S.;
Enzyme Res. 2011, 30, 1.
12. Fengel, D.; Wenger, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Walter De Gruyter, Berlin, New York, 1989.
13. Paturau, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. 3^a. Ed. Amsterdam, Elsevier, 435p, 1989.
14. Rocha, G. J. M.; Martin, C.; Soares, I. B.; Maior, A. M. S.; Baudel, H. M.; Abreu, C. A. M.; *Biomass Bioenerg.* 2011, 35, 663.
15. Campbell, M. M.; Sederoff, R. R.; *Plant Physiol.* 1996, 110, 3.
16. Bhuiya, M. W; Liu, C.J.; *J Biol Chem.* 2010, 285, 277.
17. Mansfield, S. D.; Mooney, C.; Saddler, J. N.; *Biotechnol Prog.*, 1999, 15, 804.
18. Almeida, J. R. M.; Modig, T.; Petersson, A.; Hän-Hägerdal, B. H.; Lidén, G.; Gorwa-Grauslund, M. F.; *J Chem Technol Biotechnol.* 2007, 82, 340.
19. Silva, V. F. N.; Arruda, P. V.; Felipe, M. G. A.; Gonçalves, A.R.; Rocha, G. J. M.;
J Ind Microbiol Biotechnol. 2010, 38, 809.

20. Rana, A. K.; Mandal, A.; Bandyopadhyay, S.; *Compos Sci Technol.* 2003, 63, 801.
21. Hartman, J.; Albertsson, A. N.; Lindblad, M. S.; Sjöberg, J.; *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 100, 2985.
22. Brienzo, M.; Siqueira, A. F.; Milagres, A. M. F.; *Biochem. Eng. J.* 2009, 46, 199.
23. Castro, A, M.; Pereira, Jr, N.; *Quim. Nova.* 2010, 33, 181.
24. Zhou, Y.; Stuart-Williams, H.; Farquhar, G. D.; Hocart, C. H.; *Phytochemistry*, 2010, 71, 982.
25. Krässig H. A. Cellulose: Structure, Accessibility, and Reactivity Gordon and Breach Science Publishers Krässig HA 1993, 11, 167.
26. Somerville, C.; Bauer, S.; Brininstool, G.; Facette, M.; Hamann, T.; Milne, J.; Osborne, E.; Paredez, A.; Person, S.; Raab, T.; Vormerk, S.; Youngs, H.; *Science*, 2004, 306, 2206.
27. Hendriks, A.T.W. M.; Zeeman, G.; *Bioresour Technol.* 2009,100, 10.
28. Alvira, P.; Tomás-Pejó, E.; Ballesteros, M.; Negro, M. J.; *Bioresour Technol.* 2010, 101, 4851.
29. Chang, V. S.; Holtzapple, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000, 86, 5.

30. Vidal, B. C.; Dien, B.S.; Ting, K. C.; Singh, V.; *Appl Biochem Biotechnol.* 2011, 8, 1405.
31. Zhang, H. Y.; Lynd, L. R.; *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 88, 779.
32. Esteghlalian, A. R. Svivastava, V.; Gilkes, N.; Gregg, D. J.; Saddler, J. N. In: Himmel, M.E.; Baker, W.; Saddler, J. N. (Eds.), *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion.* ACS, 100.
33. Dias, M. O. S.; Ensinas, A. V.; Nebra, S. A.; Filho, R. M.; Rossell, C. E. V.; Maciel, M. R. W.; *Chem Eng Res Des.* 2009, 87, 1206.
34. Zhu, J.Y.; Wang, G. S.; Pan, X. J.; Gleisner, R. The status of and key barriers in lignocellulosic ethanol production: a technological perspective". In: International conference on biomass energy technologies, Guangzhou, China, 2008, 3.
35. Balat, M.; *Energ convers manage.* 2011, 52, 858.
36. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; *Bioresour Technol.* 2000, 74, 17.
37. Tomás-Pejó, E.; García-Aparicio, M.; Negro, M.J.; Oliva, J.M.; Ballesteros, M.; *Bioresour Technol.* 2009, 100, 890.
38. Olofsson, K.; Bertilsson, M.; Lidén, G.; *Biotechnol Biofuels.* 2008, **1,1**.

39. Wang, M.; Li, Z.; Fang, X.; Wang, L.; Qu, Y. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2012, 128, 1.
40. Lee, J.; *J Biotechnol.* 1997, 56, 1.
41. Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Laboratory Analytical Procedures, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, 2004.
42. Cuevas, M.; Sánchez, S.; Bravo, V.; García, J. F.; Baeza, J.; Parra, C.; Freer, J.; *Fuel.* 2010, 89, 2891.
43. Parisi, F.; *Adv. Biochem. Eng.* 1989, 38, 53.
44. Palmqvist, E.; Hahn-Hägerdal, B.; *Bioresour Technol.* 2000, 74, 25.
45. Gottschalk, L. M. F.; Oliveira, R. A.; Bom, E. P. S.; *J. Biochem. Eng.* 2010, 51, 72.
46. Ha, S.; Galazka, J. M.; Kima, S. R.; Choi, J.; Yang, X.; Seo, J.; Glass, L.; Cate, J. H. D.; Jn, Y.; *PNAS*, 2011, 108, 504.
47. Matsushika, A.; Inoue, H.; Kodaki, T.; Sawayama, S.; *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009, 1, 37.

48. McMillan, J.D.; In: Himmel, M.E.; Baker, J. O.; Overend, R. P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*. American Chemical Society, Washington, DC, 292, 1994.
49. Sun, Y.; Cheng, J.; *Bioresour Technol.* 2002, 83, 1.
50. Keller, F. A.; Hamilton, J. E.; Nguyen, Q.A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2003, 108, 27.
51. Zhang, Y. H; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2008, 35, 367.
52. Kodali, B.; Pogaku, R.; *Electron J Environ Agric Food Chem.* 2006, 5, 1253.
53. Taherzadeh, M. J.; Karimi, K.; *Int J Mol Sci.* 2008, 9, 1621.
54. Buaban, B.; Inoue, H.; Yano, S.; Tanapongpipat, S.; Ruanglek, V.; Champreda, V.; Pichyangkura, R.; Rengpipat, S.; Eurwilaichitr, L.; *J Biosci Bioen.* 2010, 110, 18.
55. Beukes, N.; Pletschke, B. I.; *Bioresour Technol.* 2010, 101, 4472.
56. Monte, J. R.; Brienzo, M.; Milagres, A. M. F.; *Applied Energy.* 2011, 88, 403.
57. Hong, B.; Xue, G.; Weng, L.; Guo, X.; *Bio Res.* 2012, 7, 4902.

58. Rodrigues, R. C. L. B.; Rocha, G. J. M.; Rodrigues Jr. D.; Filho, H. J. I.; Felipe, M. G. A.; Pessoa Jr., A.; *Bioresour Technol.* 2010, 101, 1247.
59. Chandra R.; Bura, R.; Mabee, W.; Berlin, A.; Pan, X.; Saddler, J.; *Biofuels. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* Springer, 2007, 67.
60. Kumar, P.; Barrett, D. M.; Delwiche, M. J.; Stroeve, P. *Ind Eng Chem Res.* 2009, 48, 371.
61. FitzPatrick, M.; Champagne, P.; Cunningham, M. F.; Whitney, R. A. *Bioresour Technol.* 2010, 101, 8915.
62. Delgenés, J .P. ; Penaud, V. ; Moletta, R. ; “Pretreatments for the enhancement of anaerobic digestion of solid wastes Chapter 8”. In: *Biomethanization of the Organic Fraction of Municipal Solid Wastes.* IWA Publishing, 2002, 201.
63. Agbor, V. B.; Cicek, N.; Sparling, R.; Berlin, A.; Levin, D. B.; *Biotechnol Adv.* 2011, 29, 675.
64. Chandel, A. K.; Kapoor, R. K.; Singh, A.; Kuhad, R.C.; *Bioresour Technol.* 2007, 98, 1947.
65. Gámez, S.; González-Cabriales, J. J.; Ramírez, J. A.; Garrote, G.; Vázquez, M.; *J Food Eng.* 2006, 74, 78.

66. Li, H.; Kima, N. J.; Jiang, M.; Kang, J. W.; Chang, H. N.; *Bioresour Technol.* 2009, 100, 3245.
67. Xu, F.; Sun, J. X.; Liub, C. F.; Sun, R. C.; *Carbohydr Res.* 2006, 341, 253.
68. Cheng, K. K.; Cai, B.Y.; Zhang, J. A.; Ling, H. Z.; Zhou, Y. J.; Ge, J. P.; Xu, J. M.; *J. Biochem. Eng.* 2008, 38, 105.
69. Ramos, L. P.; *Quim. Nova.* 2003, 26, 863.
70. Ballesteros, I.; Ballesteros, M.; Manzanares, P.; José Negro, M.; Oliva, J. M.; Sáez, F.; *J. Biochem Eng* 2008, 42, 84.
71. Yan, L.; Zhang, H.; Chen, J.; Lin, Z.; Jin, K.; Jia, H.; Huang, H.; *Bioresour Technol.* 2009, 100, 1803.
72. Canettieri, E. V.; Rocha, G. J. M.; Carvalho Jr. J. A.; Silva, J. B. A.; *Bioresour Technol.* 2007, 98, 422.
73. De Souza, C. J. A.; Costa, D. A.; Rodrigues, M. Q. R. B.; dos Santos, A. F.; Lopes, M. R.; Abrantes, A. B. P.; Costa, P. S.; Silveira, W. B.; Passos, F. M. L.; Fietto, L. G.; *Bioresour. Technol.* 2012, 109, 63.
74. Zhao, X.; Cheng, K.; Liu, D.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 82, 815.

75. Sun, J. X.; Sun, X. F.; Zhao, H.; Sun, R. C.; *Polym Degrad Stabil.* 2004, 84, 331.
76. Tomas-Pejó E.; Olive, J. M.; Ballesteros, M.; *J Sci Ind Res.* 2008, 67, 874.
77. Carvalheiro, F.; Duarte, L. C.; Gírio, F. M.; *J. Sci. Ind. Res.* 2008, 67, 849.
78. Ballesteros, I.; Oliva, J. M.; Negro, M. J.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; *Process Biochem.* 2002, 38, 187.
79. Ballesteros, I.; Negro, M. J.; Oliva, J. M.; Cabañas, A.; Manzanares, P.; Ballesteros, M.; *27th Symposium on Fuels and Chemicals*, Poster 3B-34, Denver, Colorado, USA, 2005.
80. Zeng, W.; Chen, H.; *Chin. J. Biotechnol.* 2009, 25, 49.
81. Holtzapple, M. T.; Jun, J. H.; Ashok, G.; Patibandla, S. L.; Dale, B. E.; *American Institute of Chemical Engineers National Meeting*, Chicago, IL, 1990.
82. Holtzapple, M. T.; Jun, J. H.; Ashok, G.; Patibandla, S. L.; Dale, B. E.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1991, 29, 59.
83. Hayes, D. J.; “An examination of biorefining processes, catalysts and challenges”. *Catal.Today.* 2009, 145, 138.

84. Keshwani, D. R. "Microwave Pretreatment of Switchgrass for Bioethanol Production". Thesis Dissertation. North Carolina State University, 2009.
85. Klinke, H. B.; Ahring, B. K.; Schmidt, A. S.; Thomsen, A. B.; *Bioresour Technol.* 2002, 82, 15.
86. Harris, D.; Debolt, S.; *Plant Biotechnol J.*, 2009, 8, 244.
87. Pauly, M.; Keegstra, K.; *Curr Opin Plant Biol.* 2010, 13, 305.
88. Vanholme, R.; Demedts, B.; Ralph, K. M. J.; Boerjan, W.; *Plant Physiol.* 2010, 153, 895.

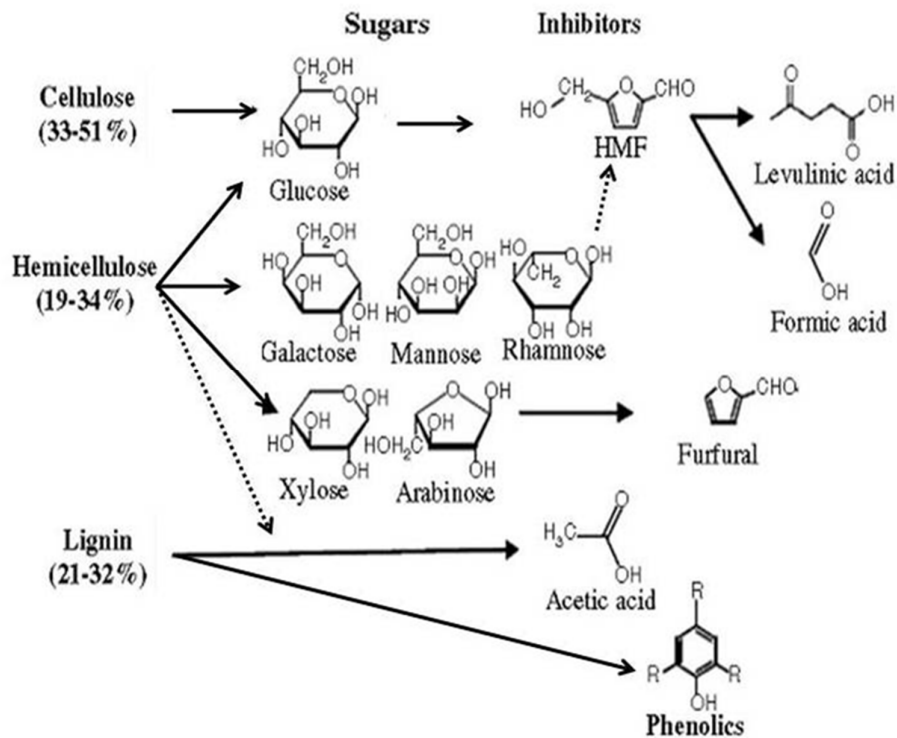


Figure1: Composição química média da biomassa e produtos gerados no pré-tratamento. (traduzir)

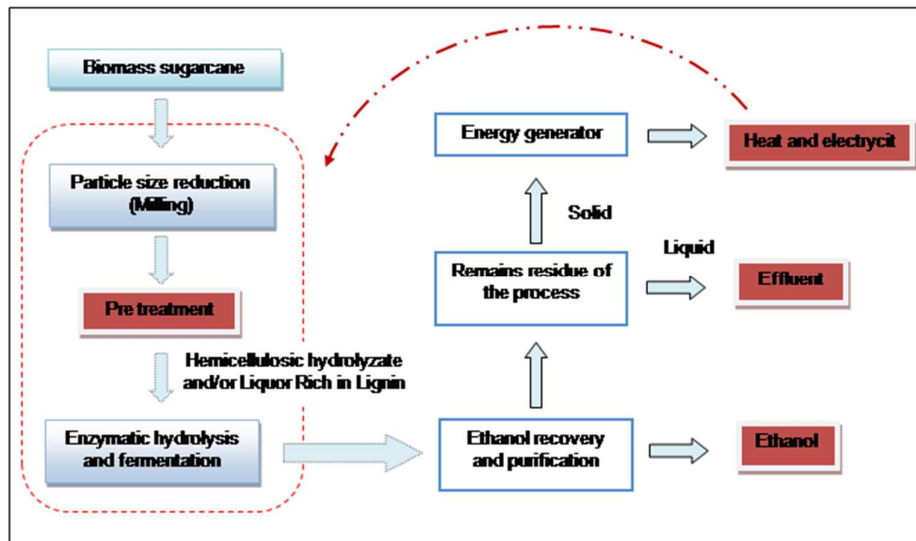


Figure 2: Fluxo operacional para a conversão do material lignocelulósico em etanol de segunda geração. (traduzir)

Table 1 - Pretreatment processes of sugarcane bagasse

Pretreatment	Reagent	Conditions	Observations	Reference
Diluted acid	H ₂ SO ₄	Acid concentration (1.25% w/w). Operation at 121 °C for 2 h. The biomass at a solids loading of 10% (w/w).	High solubilization of hemicelluloses.	(a)
		Acid concentration (0.5%). Operation at 121 °C and 1.5 kg/cm ² pressure for 1 h		(b)
	H ₃ PO ₄	Acid concentration (4%). Operation to 122 °C for 5 h. The S:L (1:8) dry weight.	The release rate of xylose increased with the concentration of phosphoric acid for 2%, 4% and 6%.	(c)
Alkali	HCl	Acid concentration (1.25% v/v) ml per g of bagasse, S:L (1:15); Operation 121 °C and 1.1 kg/cm ² pressure for 4 h	30% conversion of the sugarcane bagasse in reducing sugars.	(d)
		Acid concentration (2.5% v/v), fiber size (2.2-10 mm). Operation 140 °C for 30 min. The S: L 1:10		(e)
	NaOH	Alkali concentration (3%), S:L (1:25 w/v). Operation 50 °C for 3 h.	74.9% solubilization of hemicelluloses and the predominant sugar is xylose (79.2 to 96.7%)	(f)
Physical and chemical		Alkali concentration of 1.0% (w/v). Operation at 100 °C for 1 h in vials of 500 mL stainless steel immersed in oil. S:L (1:10 w/v)	High solubilization of lignin	(g)
	hydrothermal	Operation at 121 °C and 1.1 kg/cm ² pressure for 4 h.		(h)
		Operation at 195 °C for 10 min in 20 L reactor. S: G (1:10 w/v), stirring 6 rpm	High solubilization of lignin and ethanol yield (20.5 g/L)	(i)
	H ₂ O, SO ₂ and H ₂ SO ₄	SO ₂ concentration (2%) by weight of water in the mulch. Acid concentration H ₂ SO ₄ (0.25 g per 100 g dry matter). Temperature of 180 °C for 5 min.	Approximate yield of glucose and xylose 86.3% and 72.0%, respectively.	(j)
	AFEX	Concentration of liquid ammonia (1-2 kg ammonia / kg of dry biomass). Temperature of 90°C and residence 30 min.	Remove the lignin and hemicellulose and not produce inhibitors. It is not efficient for high lignin fraction.	(k)
	UHPE	NaOH concentration (0.5% w/v). S:L (3% w/v). Operation at 125 °C for 120 min.	Obtained significant delignification and enzymatic digestibility increases to 95.5%.	(l)

a; Cheng et al. (2008) / b; Pattra et al. (2008) / c; Gámez et al. (2006) / d; Hernández-Salas et al. (2009) / e; Chandel et al. (2007) / f; Peng et al. (2009) / g; Silva et al. (2010b) / h; Hernández-Salas et al.(2009) / i; Silva et al. (2010b) / j; Sendelius (2005) / k; Balat (2011) / l; Chen et al. (2010)

CAPÍTULO 2

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA USANDO ÁCIDO SULFÚRICO

2.1 - Objetivo geral

Avaliar as variações de escalas nos processos de pré-tratamentos de bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído (H_2SO_4) tendo como resposta o rendimento de açúcares obtido nas hidrolises enzimáticas.

2.1.1 - Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente o bagaço de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 antes e após o processo de pré-tratamento.
- Analisar o material lignocelulósico com microscopia eletrônica de varredura (MEV), FTIR e DTG/TG antes e após o processo de pré-tratamento.
- Avaliar a inter-relação dos seguintes fatores para o pré-tratamento: a concentração de ácido, o tempo, a relação sólido-líquido, sendo a temperatura e pressão constantes ($121^\circ C$ e $1,1 \text{ Kg/cm}^2$).
- Determinar um modelo estatístico utilizando a metodologia de superfície de resposta em função das variáveis de pré-tratamento que permita melhor rendimento da sacarificação enzimática.
- Determinar o rendimento de glicose do processo de sacarificação enzimática em função das variáveis do processo de pré-tratamento.
- Analisar e quantificar os produtos gerados no hidrolisado hemicelulósico após o processo de pré-tratamento.

Exemplo de referencias: ABATEPAULO, A.R.; CAETANO, A.R.; MENDES, J.R. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. **Animal Genetics**; v.39, p.328-329, 2008.

Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana usando ácido sulfúrico

Resumo

O pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar foi investigado por tratamento com ácido sulfúrico diluído. Para maximizar a extração de hemicelulose foram examinadas várias condições aplicando o planejamento estatístico fatorial fracionado 2^3 : concentração de H_2SO_4 de 0,5-2,0% (m/v), tempo de reação de 10-50 minutos, a relação sólido-líquido de 0,5-1,5 (m/v) e temperatura constante de 121 °C. Esta abordagem permitiu a seleção de condições para a extração de hemicelulose. A resposta avaliada foi a produtividade de glicose liberada do pré tratamento de bagaço após a hidrólise enzimática. Os resultados mostram que a maior conversão enzimática foi de 36,1 (g/L) obtida utilizando 1,25% de ácido sulfúrico a 30 °C na relação sólido-líquido de 1,0. O Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) foi usado para determinar os principais constituintes presentes nas fibras do bagaço antes e após o tratamento. A degradação térmica do bagaço de cana apresenta dois pontos de perda de massa atribuídos à liberação de umidade e decomposição do material lignocelulósico. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para analisar o efeito do pré-tratamento estudado para remoção da hemicelulose e desorganização da fibra. A análise da morfologia do bagaço pré-tratado confirmou os resultados obtidos na caracterização química. Esse planejamento fatorial envolvendo a tecnologia de pré-tratamento tem grande influencia em etapas subseqüentes como a hidrolise enzimática e fermentação para conversão de etanol de segunda geração.

1- Introdução

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar representando cerca de 30% da produção mundial (Hartemink 2008, Canilha et. al., 2011). O bagaço de cana de açúcar é um resíduo agrícola abundante no Brasil e pode ser usado em várias aplicações, em especial, diminuir a dependência do uso dos combustíveis fósseis. O etanol é produzido em grande escala no Brasil a partir da cana de açúcar e pelo Estados Unidos a partir do milho. O bagaço de cana-de-açúcar não é composto apenas de celulose, mas sim por hemicelulose e lignina (Cardona et al 2010; Rocha et al. 2011). A celulose e hemicelulose correspondem em cerca de 70% da fibra e a interação dos carboidratos com a lignina é feita por ligações de hidrogenio e covalentes formando uma fibra densa (McKendry 2002; Zhou et al., 2010). Hoje em dia, cerca de 50% de bagaço de cana é queimado para gerar calor e energia para executar as usinas de açúcar e etanol sendo

que o poder calorífico da lignina é maior que dos carboidratos (celulose e hemicelulose) (Brienzo et al 2009). No entanto, uma parte importante da produção de bagaço é sub-utilizado (Rocha et al., 2011). Tecnologias de pré tratamento para a remoção de hemicelulose e celulose seriam benéficas para a utilização e produção de etanol de segunda geração, como também, a geração de em outros produtos de valor agregado como polímeros e compósitos para aplicações químicas e farmacêuticas e componentes de substitutos da pele em caso de dano de camadas superficiais da epiderme (Melandri et al., 2006; Brienzo et al., 2009; Rocha et al., 2011). A lignina não é usada para a produção de etanol mas pode ser aproveitada para geração de produtos como solventes e tintas (Rana et al., 2003; Hartman et al., 2006; Luz et al., 2008; Saxena et al., 2009).

A hemicelulose e celulose estão fortemente ligadas na parede celular do vegetais, sendo difícil de separa-lás sem a sua desorganização estrutural (Sun et al 2004). As xilanas são as mais abundantes nas hemiceluloses. Diferentes aplicações de tratamentos vem sendo feitos para o fracionamento do material lignocelulósico em seus principais componentes para utilização em bioindústrias (Saad et al., 2008; Rocha et al., 2011). Abordagens eficazes de pré-hidrólise ácido diluída tem sido demonstrado (Taherzadeh and Karimi 2008, Kumar 2009). O ácido sulfúrico um dos ácidos mais utilizados em pré-tratamentos de bagaço de cana para remoção de hemiceluloses (Lavarack and Griffin 2002, Rocha et al 2011), mas outros reagentes também podem ser utilizados (Girio et al., 2010). Os ácidos liberam prótons que quebram as ligações éter entre os monómeros de açúcar de cadeias poliméricas constituídas de hemiceluloses e celulose. Assim, essa aplicação libera açúcares como a glicose, xilose e arabinose, como também, compostos como furfural e ácido acético (Aguilar et al 2002).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo estudar um modelo de pré-tratamento para o bagaço de cana de açúcar com ácido sulfúrico diluído com diferentes associações de fatores, tendo como resposta a produção de glicose. A análise da estrutura química da fibra foi investigada com o espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (Bilba et al., 1996). Além disso, nós usamos a análise termogravimétrica (TGA) e a diferencial termogravimetria (DTG) para fornecer informação sobre a natureza e extensão de degradação e a estabilidade térmica dos materiais (Brown 1988). A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para mais informações estruturais e morfológica (Rocha et al 2011). Esse estudo fornece informações importantes sobre a composição, a morfologia, a estrutura e estabilidade

térmica do bagaço de cana, e podem ser amplamente utilizado para outras caracterizações de biomassa.

2- Materiais e métodos

2.1- Material

A cana-de-açúcar utilizada para obtenção do bagaço foi à variedade RB867515, cedida pelo professor Márcio H. P. Barbosa (Grupo Ridesa) do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV). A cana foi coletada no campo experimental da UFV. O colmo foi prensado para remoção do caldo e posteriormente o bagaço foi lavado com água e seco ao ar livre a temperatura ambiente por cinco dias. Após a secagem, o bagaço foi cortado em pedaços pequenos (1-3 cm) e posteriormente triturado em moinhos de bolas e amostras de 20 mesh (0,85 mm) foram separadas e estocadas em sacos plásticos fechados à temperatura ambiente para utilização experimental.

2.2- Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Pesou-se 0,3 g de bagaço de cana triturado. Em seguida adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico 72% e manteve em banho maria por 1 hora. Após este tempo a mistura foi diluída com água e aquecida em autoclave a 118 °C por 1 hora para promover a hidrólise total de oligossacarídeos e polissacarídeos. Após a hidrólise, a mistura foi filtrada em cadinho de Gooch previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente, seco em estufa até peso constante e a percentagem de lignina insolúvel e solúvel foi determinada em relação à massa seca da amostra. Espectroscopia no ultravioleta foi utilizada para a determinação da lignina solúvel em ácido conforme a norma TAPPI T222 om-88.

2.2.1- Determinação dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos

A determinação dos teores de carboidratos foi realizado no aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), marca Shimadzu acoplado a um detector de índice de refração, equipado com coluna marca BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7.8mm) e pressão de 134 kgf. As amostras foram analisadas nas seguintes condições: temperatura de 60°C, fase móvel ácido sulfúrico 5 mM, fluxo de 0,6 mL/min.⁻¹ e volume injetado de 20 µL da amostra, com tempo de retenção de 30 minutos. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos

açúcares e ácidos a serem analisados, sendo feito uma curva de calibração de cada composto.

2.3- Determinação das condições iniciais de pré-tratamento do bagaço de cana

Amostras de 4g de bagaço triturados (partículas de 20 mesh) foram submetidas ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído em autoclave. As condições experimentais foram determinadas pelo planejamento estatístico fatorial fracionado 2^3 (Barros Neto *et al.* 2001). Os níveis dos fatores estudados, com seus valores reais e codificados, estão representados na Tabela 1, enquanto que os delineamentos experimentais estão representados na Tabela 2. Nesta fase foram investigadas as influências dos seguintes fatores: relação entre a massa seca do resíduo e a solução ácida (S:L) (g/v), concentração da solução ácida (g/v) e tempo de reação (minutos) tendo como resposta a eficiência de rendimento de glicose (g/L). Resíduos sólidos do processo de foram filtrados a vácuo e o hidrolisado foi armazenado para análise. A fração sólida foi lavada com água destilada até atingir o pH neutro. Os hidrolisados obtidos foram filtrados e armazenados para estudos posteriores.

Tabela 1. Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial do tipo 2^3 para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
Tempo (minutos)	10	30	50
Conc. ácido (% m/v)	0,5	1,25	2,0
Relação (S:L) (m/v)	0,5	1	1,5

Os parâmetros serão analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao valor codificado do nível inferior dos parâmetros e +1 ao nível superior; a resposta investigada será a eficiência de rendimentos de glicose.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial do tipo 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação dos efeitos dos parâmetros tempo, concentração de ácido e relação sólido-líquido.

Ensaio	Tempo (min)	Conc. ácido (% m/v)	Relação (S:L)
01	10	0,5	0,5
02	10	0,5	1,5
03	10	2,0	1,5
04	10	2,0	0,5
05	50	0,5	0,5
06	50	0,5	1,5
07	50	2,0	1,5
08	50	2,0	0,5
09	30	1,25	1,0
10	30	1,25	1,0
11	30	1,25	1,0
12	30	1,25	1,0

2.4- Hidrólise enzimática

A conversão enzimática foi realizada utilizando a celulase comercial (Celluclast 1.5 L). Foram empregadas as seguintes condições para as reações: tampão citrato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8, sob agitação de 150 rpm em incubadora de movimento rotatório a 50°C por 72 h sendo a relação sólido:líquido 1:10 (m/v) (Carrasco et al., 2010). As cargas enzimáticas utilizadas foram de 15 FPU/g de material lignocelulósico seco utilizando o complexo Celluclast 1.5 L (Cara et al., 2006). Após o término da reação enzimática os hidrolisados foram filtrados em membrana com poros de $0,45 \mu\text{m}$ (MILLIPORE), para a remoção de possíveis sólidos em suspensão e, posteriormente analisados em leitor de Elisa visando o rendimento em glicose.

2.5 - Métodos analíticos para a quantificação de Glicose

Para a quantificação de glicose foi adicionado 10 µL de cada amostra das combinações do pré-tratamento em placa de Elisa e adicionado junto às amostras 190 µL do kit enzimático Glicose hexoquinase (HK) (Sigma). A placa contendo as amostras e o Kit enzimático foi incubado a temperatura de 35°C por 15 min. A leitura foi feita a 340 nm em Elisa. A concentração de glicose foi avaliada com base na curva de calibração partindo de uma solução de 1 g/L glicose (Sigma). Diluições foram necessárias para que a absorvância das amostras estivesse dentro do intervalo da curva padrão.

2.6- Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural

Uma alíquota de 2 mL da solução foi filtrada em membrana com poros de 0,45 µm (MILLIPORE), para a remoção de possíveis sólidos em suspensão. O furfural e o hidroximetilfurfural presentes no hidrolisado ácido foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, em equipamento SHIMADZU, nas seguintes condições: coluna Hewlett Packard RP-18 (200 mm), temperatura ambiente, utilizando como eluente solução de 1:8 (acetonitrila /água) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,8 mL/min, volume da amostra de 20 µL e detector SPD-10^a UV/visível, com comprimento de onda de 280nm.

2.7- Análise do bagaço por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As fotomicrografias de MEV foram obtidas em um equipamento LEO (modelo Leo 1430v8) (Carl Zeiss). O metalizador utilizado foi Sputtering Balzers, modelo FDV-010. Amostras dos materiais lignocelulósicos foram fixadas com fita carbono em suporte de alumínio “stub” e submetidas ao recobrimento de plasma de ouro 30 mA, vácuo 10^{-2,6} mbar, por 2 minutos formando uma camada de ouro sobre a amostra de aproximadamente 15-20 nm. As amostras foram mantidas no dissecador até o momento da análise e dispostas de forma que fosse possível observar as modificações superficiais das fibras dos materiais lignocelulósicos in natura e após a etapa de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

2.8- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).

Para caracterizar estruturalmente o bagaço de cana de açúcar, in natura e após ser submetido ao tratamento ácido, foi utilizada a espectroscopia IV. Os espectros na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) dos materiais foram adquiridos em um espectrofotômetro da Bomem série MB com 4 cm^{-1} de resolução e 64 varreduras acumulativas. As amostras foram diluídas em KBr, contendo 1% em massa dos materiais, e prensadas para obtenção na forma de pastilhas.

2.9- Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas dos materiais, bagaço de cana in natura e após sofrer tratamento ácido, foram realizadas em um analisador DuPont, modelo 9900, aquecendo-se aproximadamente 10,0 mg das amostras em intervalo de 25 a 800°C em fluxo de argônio.

3. RESULTADOS

3.1- Composição do bagaço da variedade RB867515

(Tabela 3)

Tabela 3 - Composição química do bagaço in natura e bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico diluído.

Componentes	in natura ^a (%)	pré-tratado ^b (%)
Matéria seca	100	100
Celulose	53,2	61,9
Hemicelulose	21,9	7,5
Lignina total*	21	28,7
Extrativos	3,9	ND
Total	100	98,1

ND – Não detectado

^a Composição química do bagaço de cana “in natura”. *Soma de lignina Klason e lignina solúvel em ácido.

^b Composição química da fração sólida obtida pelo pré-tratamento do bagaço de cana no tempo de 30 min, concentração de ácido 1,25 %, em relação líquido-sólido para 1:10. *Soma de lignina Klason e lignina solúvel em ácido

3.2 – Dados do pré-tratamento no tempo de 30 min, concentração de ácido sulfúrico 1,25 %, relação líquido-sólido para 1:10

(Figuras 1- 5); (Tabela 4-6)

Tabela 4 – Interação de fatores do pré-tratamento e a resposta do rendimento de glicose g/L.

Ensaio	Tempo (min)	Conc. ácido (% m/v)	Relação (S:L)	Rendimento Glicose (g/L)
1	10	0,5	0,5	17,62
2	10	0,5	1,5	28,57
3	10	2	1,5	19,21
4	10	2	0,5	20,02
5	50	0,5	0,5	11,47
6	50	0,5	1,5	22,46
7	50	2	1,5	19,06
8	50	2	0,5	22,36
9*	30	1,25	1	37,20

*Média de quatro repetições (ensaio 9-12)

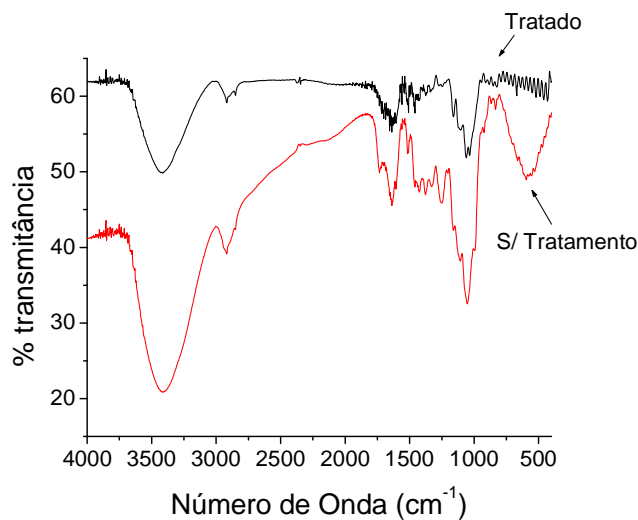


Figura 1 – Os espectros de FT-IR de bagaço in natura e pré-tratado com ácido sulfúrico diluído.

Tabela 5 - Identificação dos picos no espectro no infravermelho médio (FTIR)

(em anexo)

Tabela 6 - Composição química da fração líquida obtida do pré-tratamento do bagaço

Compostos	Concentração, g/L
Xilose	9.24 ± 0.03
Arabinose	0.92 ± 0.00
Glicose	3.00 ± 0.02
Celobiose	0.35 ± 0.00
Acido acético	2.91 ± 0.03
Furfural	0.12 ± 0.00
HMF	0.03 ± 0.00

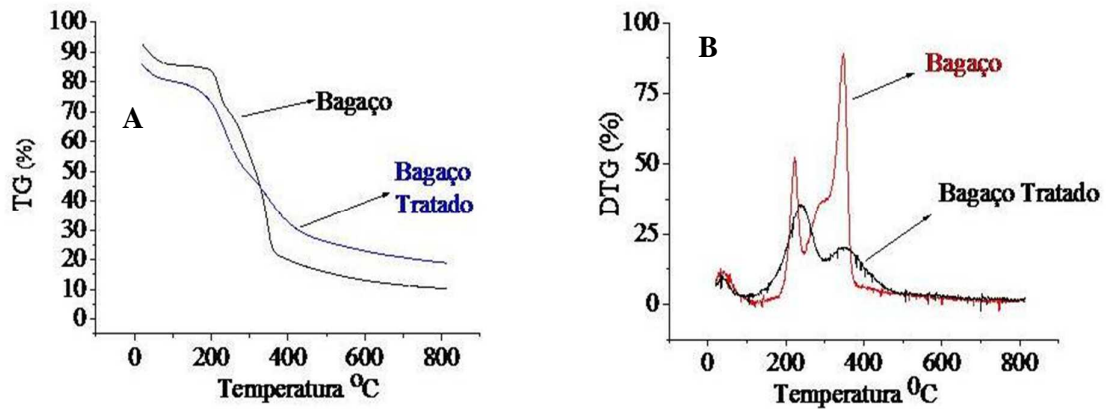


Figura 2 – Curvas DTG (A) e TG (B) para a amostra de bagaço obtida sob fluxo de argônio.

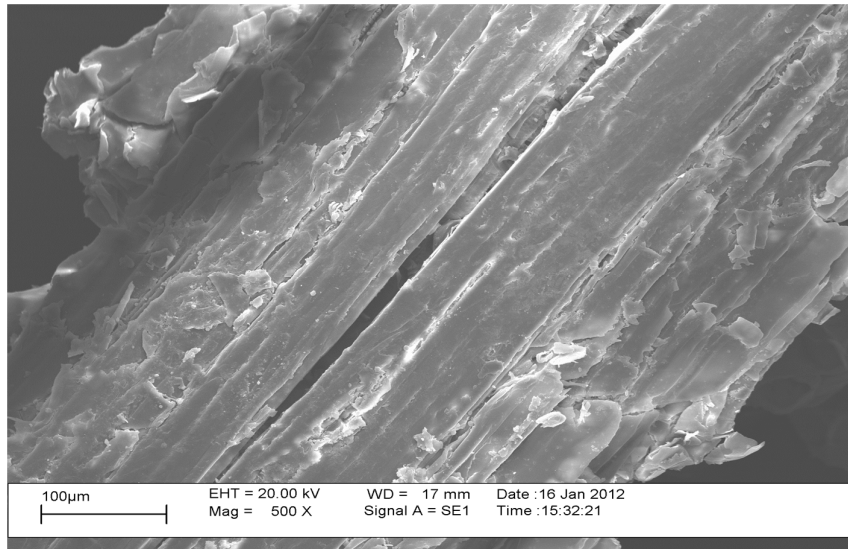


Figura 3 – Micrografia de um feixe de fibra de bagaço de cana in natura. Ampliação: 500 x.

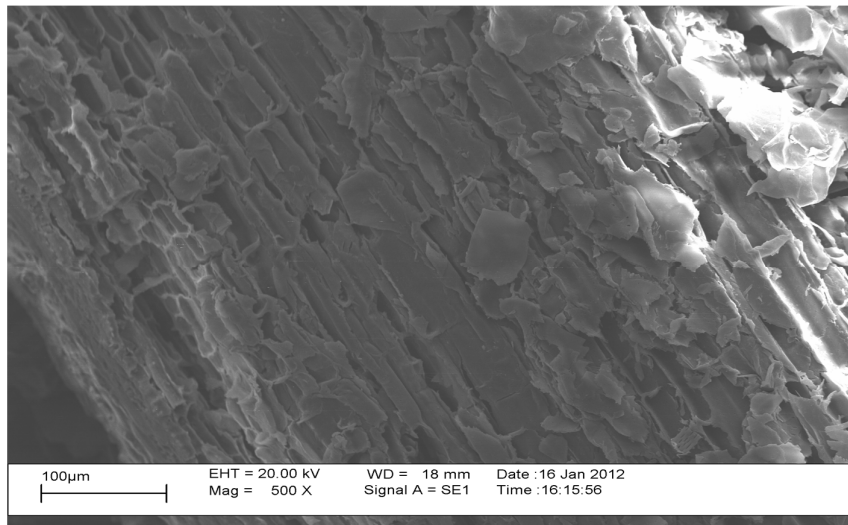


Figura 4 – Micrografia de um feixe de fibra de bagaço de cana pré-tratado. Ampliação: 500 x.

3.3 – Dados da hidrólise do pré-tratamento do bagaço de 0 - 72 h.

(Figura 5)

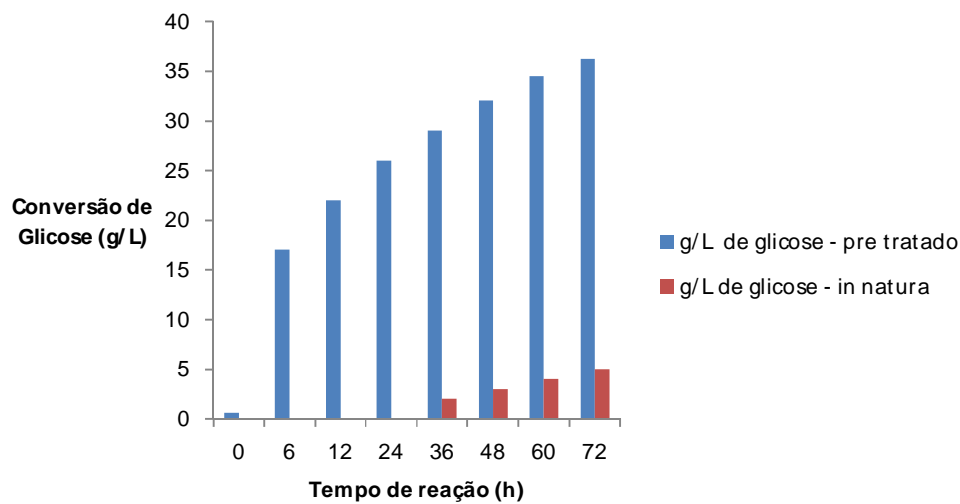


Figura 5 – Conversão de celulose durante a hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado e in natura.

4. DISCUSSÃO

A composição das amostras da fração sólida do bagaço é demonstrada na Tabela 3. As análises indicaram que o teor dos principais componentes in natura utilizado neste estudo está de acordo com o teor de outros tipos de bagaço previamente relatado (Silva et al., 2010). A distribuição dos principais componentes nas amostras de bagaço é típica de material lignocelulósico. Essa diferença na composição de celulose, hemicelulose e lignina do bagaço geram diferentes reatividades e propriedades de combustão em pré-tratamentos, sendo diferentes as quantidades e os tipos de compostos liberados durante o processo utilizado (Biagini et al.2006). Assim, as diferenças existentes nos teores de glicose, xilose e lignina do bagaço (Tabela 3) são resultantes do pré-tratamento estudado. O pré-tratamento utilizado solubilizou 65,7 % o teor de xilanas e aumento em 16,3 % o teor de celulose (Tabela 3). Assim, a maior parte da celulose solubilizada corresponde a sua fração amorfa ou de baixa cristalinidade (Rocha et al., 2011). A baixa concentração de glicose no hidrolisado está de acordo com a baixa solubilização de celulose e celobiose (Tabela 6). Dessa forma, o elevado teor de celulose da fibra in natura, acima de 53 %, indica o elevado potencial dessa variedade de cana para a sua conversão através da rota de sacarificação.

A análise dos sólidos pré-tratados não revelou significativa remoção de lignina (Tabela 3). Isto é muito interessante perante a funcionalidade do pré-tratamento ácido investigado. A hemicelulose é estruturalmente semelhante à celulose, e ambos são depositados na parede da célula antes lignificação (Paturau 1989; Rocha et al., 2011). As hemiceluloses são uma barreira física que rodeia as fibras de celulose e as protege de aplicações enzimáticas (Taherzadeh e Karimi, 2008), no qual a sua remoção caracteriza o método utilizado eficiente para uma boa hidrólise enzimática do bagaço, tanto da fração sólida como a líquida obtidas do pré-tratamento. Dessa forma, a presença e distribuição de lignina também podem dificultar hidrólise (Alvira et al., 2011). Tipicamente, o pré-tratamento ácido, remove além de hemiceluloses, uma pequena, mas não insignificante parte da fração de lignina (Kumar et al., 2009). Esses fatores juntos tornam difícil a clivagem das ligações glicosídicas nos polímeros de celulose e hemicelulose pelas enzimas (Brodeur et al., 2011; Alvira et al., 2011).

A sacarificação é uma das etapas para a produção de etanol de segunda geração, assim, é necessário pré-tratar o material para remoção das hemiceluloses e lignina para aumentar a conversão enzimática da celulose. O pré-tratamento com ácido é amplamente utilizado, em especial, o ácido sulfúrico, pois aumentam a ação autocatalítico do ácido acético que é liberado pela clivagem hidrolítica de grupos acetil do bagaço (Rocha et al., 2011). Isso tem demonstrado eficiência na melhoria da hidrólise enzimática da celulose.

A análise estatística mostrou que os pré-tratamentos apresentados Tabela 1 e 2, não tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) rejeitando assim, o modelo estatístico proposto. Ensaio de 9-12 apresentaram sinal positivo, indicando os melhores rendimentos de glicose na hidrólise enzimática quando as variáveis foram associadas (Tabela 4 e figura 5).

A composição química da fração líquida obtida do pré-tratamento do bagaço é demonstrada na Tabela 6. Dados do pré-tratamento no tempo de 30 minutos, concentração de ácido sulfúrico 1,25 %, relação líquido-sólido para 1:10, obtiveram maior solubilização de hemicelulose, seguido posteriormente de celulose (Glicose). Resultados apresentados na tabela 6 detectaram a presença de oligômeros de açúcar no hidrolisado. Produtos que compõe a hemicelulose, como a xilose e outros derivados, tais como arabinose e ácido acético foram também encontrados na fração líquida. As concentrações de produtos gerados na degradação do açúcar, tais como o furfural, o HMF, foram bastante baixos, sugerindo o bom potencial do hidrolisado para

fermentação. Esta é uma indicação da eficiência da remoção de hemicelulose e baixa produção de compostos indesejados no processo de fermentação.

O espectro de absorção na região do infravermelho do bagaço de cana pode ser observado na Figura 1. Busca-se verificar a presença e as mudanças dos grupos orgânicos, principalmente devido à presença de hemicelulose, lignina, celulose, que são características de fibras lignocelulósicas. Dessa forma, as diferenças mais visíveis do espectro de Infra Vermelho do bagaço de cana in natura e o pré-tratado foram encontrados entre 900 a 3500 cm^{-1} . Em geral, o espectro de IV para a fibra in natura e quimicamente modificada é representado com ampla banda em 3400 cm^{-1} , que é característica de vibrações e alongamentos de grupos OH de ácidos carboxílicos, alcoóis e fenóis e, a outra banda em 2800 cm^{-1} está relacionada à vibração de grupos C-H (metil e/ou metileno) (Mothé e Miranda 2009; Ernesto 2009).

As bandas de absorção em 1735, 1630 e 1500 cm^{-1} estão associadas a componentes estruturais presentes na lignina. A banda em 1735 cm^{-1} pode também estar relacionada com carbonilas (C=O) de hemicelulose, enquanto a banda de 1250 cm^{-1} pode ser devido ao alongar C-O-C a partir da cadeia de celulose. A banda em 1100 cm^{-1} esta associado com o estiramento assimétrico (C-O-C) a partir da celulose e hemicelulose (Mothé e Miranda 2009).

Algumas bandas são características de lignina (1254-1453 cm^{-1}), que pode ser devido ao alongamento C-O de anéis guaiacil e grupos metílicos CH, respectivamente (Saliba et al 2001). A faixa do estiramento 1453 cm^{-1} , pode ser atribuída ao radical de lignina -CH-, -CH₂-CH₃ (Baddi et al 2004). Bandas largas na região 500-700 cm^{-1} pode estar associada a um aumento no grau de substituição de grupos de metilcelulose, como também, a diminuição de grupos OH (Rodrigues et al 2007). As características observadas em bagaços de cana são mostradas na Tabela 5. Assim, os espectros de Infravermelho (figura 1), mostram o comportamento de componentes orgânicos em função do pré-tratamento no tempo (30 minutos), concentração de ácido sulfúrico (1,25 %), relação líquido-sólido para (1:10) a temperatura constante de 121 °C.

As curvas de termogravimetria entre 25 e 800 °C obtidas de bagaço de cana sob atmosfera de argônio podem ser observadas na Figura 2. A curva TG de bagaço apresentou três passos de perda de massa.

O primeiro passo entre 25 a 100 °C pode ser atribuído à eliminação de umidade com perda de, aproximadamente 12 % de massa da fibra. O segundo passo ocorre entre 200 a 280 °C e representam os vários componentes orgânicos, como exemplo, as ceras,

minerais, os alcalóides, os terpenos (Mothé e Miranda 2009, Bernabé 2008) que estão presentes em grandes quantidades no bagaço. Esse passo resultou perda de massa em, aproximadamente 55%. O terceiro passo aparecendo em 300 a 390 °C, no qual a temperatura é atribuída à decomposição de lignina, hemicelulose e celulose. Tal decomposição resultou perda de massa em, aproximadamente 87 %. Esse pico exotérmico demonstra a decomposição térmica de celulose e lignina, uma vez que o pico dessa decomposição é geralmente mais intenso (Mothé e Miranda 2009).

As análises indicaram que a decomposição térmica de celulose e lignina utilizado neste estudo está de acordo com a decomposição de outros tipos de bagaço previamente relatado (Mothé e Miranda 2009; Bernabé 2008). Estudos relatam que a temperatura para a liberação de compostos químicos durante o tratamento térmico diminui com o maior teor de lignina (Kollman e Topf 1971, Maliger et al., 2011). É importante enfatizar que a degradação térmica da hemicelulose e celulose ocorrem em temperaturas em torno de 200 a 400 °C, dependendo da natureza dos heteropolímeros presentes na biomassa (Mothé e Miranda 2009; Bernabé 2008). Órfão e Figueiredo 2001, evidenciaram que em temperaturas abaixo de 230 °C predomina a decomposição da hemicelulose; entre 230 e 260 °C, a hemicelulose e a celulose sofrem decomposição térmica. Entre 260 e 290 °C considera-se o final da decomposição da hemicelulose, predominando a seguir a decomposição da celulose. Assim, o calor de combustão da celulose está relacionado com a sua cristalinidade que tem relação intrínseca com o número de ligações de hidrogênio na matriz (Millili et al., 1996). Dessa forma, quanto mais ligações de hidrogênio, mais energia é necessário para decompor a estrutura da fibra (Shafizadeh 1968). Geralmente, a reação de decomposição do material lignocelulósico está relacionada com a quebra de ligações, por exemplo, clivagem de ligações glicosídicas (Garcia et al., 2001).

Para elucidar as mudanças físicas do bagaço ocorridas durante pré-tratamento, a morfologia do bagaço in natura e pré-tratado foram investigados usando MEV (Figura 3-4). As figuras mostram uma micrografia panorâmica do bagaço de cana. O aumento da porosidade do bagaço pré-tratado (Figura 4) comprado ao bagaço in natura (figura 3) pode ser claramente observado. A ampliação da imagem revela que, o pré-tratamento estudado desorganizou os feixes das fibras do bagaço. Isto pode ser atribuído à elevada solubilização de hemiceluloses e, pequena porção de lignina durante o pré-tratamento. Essas fibras constituem a medula do bagaço, uma vez que são constituídas por células

do parenquima e tem elevado teor de regiões amorfas e ou de baixa cristalinidade de celulose (Rocha et al. 2011).

5. CONCLUSÃO

As observações deste trabalho podem ser atribuídas às mudanças estruturais, térmicas e morfológicas do bagaço de cana após o tratamento químico. É evidente que o tratamento causa diferentes modificações nas propriedades estruturais do material lignocelulósico e podem ser utilizadas em outras aplicações. Tratamento químico causa elevada solubilização das hemiceluloses, e estas mudanças foram demonstradas por FTIR, DTG/TG, MEV e outras análises químicas. Após o pré-tratamento, a hidrólise enzimática obteve alto rendimento em glicose devido ao aumento da porosidade do material e, com isso, foram gerados poucos compostos não desejados como furfural e HMF, evidenciando uma eficiente técnica de tratamento químico.

Atualmente, a celulose pode ser utilizada para muitos produtos, por exemplo, compósitos, derivados químicos e outros. Por esta razão, resíduos agrícolas como o bagaço de cana e a técnica de pré-tratamento deste trabalho podem servir como uma excelente alternativa renovável para a produção de etanol de segunda geração e uma variedade de produtos.

6. REFERENCIAS