

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR VISANDO À PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO

Fernando A. Santos*, José H. de Queiroz, Jorge L. Colodette, Mauro Manfredi, Maria Eliana L. R. Queiroz, Celso S. Caldas e Filipe E. F. Soares

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

Recebido em 28/03/2013; aceito em 25/07/2013; publicado na web em 21/08/2013

OPTIMIZATION OF HYDROTHERMAL PRETREATMENT OF CANE SUGAR STRAW FOR CELLULOSIC ETHANOL PRODUCTION. The sugarcane industry has huge potential for biorefinery concept application, given its development in recent years. In this context, cane sugar straw has become an attractive raw material for biofuel production. This study aims to investigate the chemical composition of cane sugar straw from different regions of Brazil, and to optimize a hydrothermal pretreatment stage for cellulosic ethanol production. Results of chemical characterization of the cane sugar straw for the regions assessed indicated little influence of place on straw chemical composition. Hydrothermal pretreatment showed high efficiency in hemicellulose removal. Hydrothermal pretreatments operating with temperatures of 190 and 210 °C presented satisfactory results, reaching values close to 100% hydrolysis.

Keywords: cane sugar straw; hydrothermal pretreatment; ethanol.

INTRODUÇÃO

Devido às constantes crises no fornecimento de petróleo, bem como à possibilidade de sua escassez, à instabilidade dos preços e, principalmente, aos efeitos negativos ao meio ambiente, aumentou nos últimos anos o interesse por fontes alternativas de energia.¹ Entre essas fontes alternativas, a palha de cana-de-açúcar se destaca como fonte energética. A palha apresenta grande potencial para geração de calor, eletricidade e para produção de etanol celulósico. Segundo Ripoli² uma tonelada de palha equivale a algo entre 1,2 a 2,8 EBP (barris equivalentes de petróleo). Conseqüentemente, a não utilização dessa biomassa significa desperdício energético.

Considerando a grande disponibilidade de biomassa produzida pela agroindústria sucroenergética, eles apresentam potencial para a produção de etanol celulósico. A produtividade média de cana-de-açúcar no Brasil é de 85 toneladas por hectare. E para cada tonelada de cana processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca, ou seja, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço por hectare.¹ Considerando a conversão de toda a celulose contida no bagaço e na palha em etanol, o aproveitamento integral da cana-de-açúcar (colmo, palha e bagaço) poderá aumentar significativamente a produção de etanol por hectare, passando dos atuais 7.000 litros para aproximadamente 14.000 litros sem necessidade de expansão da área cultivada, além de ser possível diminuir os custos de produção.¹ Em termos energéticos, o bagaço e a palha representam aproximadamente dois terços da energia potencial da cana-de-açúcar.³⁻⁵

A tecnologia de conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentáveis para a produção de etanol celulósico vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção necessária para atender à demanda mundial de etanol. Apesar de já existirem tecnologias disponíveis, a maioria esbarra em dificuldades técnicas ou econômicas. O processo envolve quatro etapas: (i) pré-tratamento, para romper a estrutura cristalina da celulose (ii) hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos

em açúcares fermentescíveis; (iii) fermentação, para converter os açúcares em etanol e a (iv) destilação, que visa a separação de componentes de uma mistura, de acordo com a volatilidade relativa dos componentes.⁶

Efetivamente, devido à natureza recalcitrante da biomassa, a hidrólise enzimática é muito lenta e é difícil atingir elevados rendimentos em açúcar se a biomassa não for previamente pré-tratada. O pré-tratamento é provavelmente a etapa mais crucial, uma vez que tem forte impacto em todas as outras etapas do processo, por exemplo, na hidrólise enzimática e na fermentação, em termos de digestibilidade da celulose e toxicidade da fermentação.⁷

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos. No entanto, o pré-tratamento hidrotérmico tem chamado atenção, por não fazer uso de reagentes químicos, que é interessante do ponto de vista ambiental e econômico, por não ter necessidade de trabalhar com reatores altamente resistentes a corrosão e por hidrolisar grande parte da fração hemicelulósica.⁸ Vários estudos foram realizados utilizando esse método de pré-tratamento em diferentes biomassas, tais como a palha de trigo,⁹ a palha de milho¹⁰ e bagaço de cana.¹¹ Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar e otimizar a etapa de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol celulósico.

PARTE EXPERIMENTAL

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi a palha (folhas e ponteiros) de cana-de-açúcar cultivar RB867515. Proveniente de uma mesma safra, a palha foi colhida manualmente após a colheita mecanizada da cana em diferentes regiões do Brasil: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Alagoas e Mato Grosso.

Preparação da palha de cana-de-açúcar

A palha foi colhida no campo após a colheita mecanizada e secada à temperatura ambiente durante quatro dias, com constante homogeneização. Após a secagem, a palha foi submetida a um processo de

*e-mail: fernandoasantos7@gmail.com

moagem, utilizando-se um moinho de facas marca Wiley Mill. Após o tratamento físico a palha foi classificada por meio de um conjunto de peneiras, sendo a fração utilizada para análises a que passou pela peneira de 40 mesh e ficou retida na peneira de 60 mesh. Os teores de umidade das amostras foram determinados de acordo com a norma TAPPI T 264 om-88.¹²

Caracterização química da palha de cana-de-açúcar

A caracterização química das amostras de palha de cana-de-açúcar foi realizada em triplicatas no Laboratório de Celulose e Papel da Universidade Federal de Viçosa. Foram realizadas as seguintes análises químicas: teor de carboidratos (glicanas, xilanas, galactanas, mananas, arabinanas, grupos de acetila e ácidos urônicos), lignina (solúvel e insolúvel e total), extrativos totais e cinzas.

Determinação dos teores de carboidratos

A determinação dos teores de carboidratos foi realizada no aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), marca Shimadzu, acoplado a um detector de índice de refração (RID- 10 A), equipado com coluna marca BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) 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 análise de 30 min. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares a serem analisados, sendo a quantificação feita pela área do composto em uma curva de calibração de cada composto.

Determinação do teor de lignina insolúvel e solúvel

Pesou-se 0,3 g de palha. 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 oli e polissacarídeos. Posteriormente, 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 em ácido, ou lignina solúvel, foi determinada em relação à massa seca da amostra. O filtrado foi recolhido e aferido em balão volumétrico de 250 mL para determinação da lignina solúvel em ácido por espectroscopia no ultravioleta, através da equação, segundo a norma TAPPI T222 om-88:¹²

$$C \text{ (g/L)} = \frac{4,53(AI - Ac)}{300}$$

AI e Ac correspondem às absorvâncias a 215 e 280 nm.

Determinação de extrativos

Para a avaliação do teor de extrativos totais presente na palha de cana-de-açúcar utilizou-se para a extração: álcool:tolueno (1:2), álcool 95% e água quente nesta ordem de polaridade, segundo a norma adaptada de TAPPI T 204 om-88¹² e TAPPI T 264 om-88.¹²

Determinação do teor de cinzas

Para determinação do teor de cinzas na palha de cana-de-açúcar, pesou-se 1,0 g da amostra em três cadinhos de porcelana previamente tarados. Em seguida os cadinhos foram tampados e levados para mufla à temperatura de 575 °C, permitindo deste modo a incineração

inicial. Mantendo a mufla a 575 °C, a tampa foi retirada do cadinho, permanecendo por mais 3 horas. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador até temperatura ambiente e pesados. A calcinação foi repetida até atingir massa constante.

Planejamento experimental do pré-tratamento hidrotérmico

Foram realizados planejamentos experimentais para o pré-tratamento hidrotérmico visando à otimização do mesmo, ou seja, obtenção da maior conversão da celulose em glicose. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado com seis repetições no ponto central e a interação de três variáveis independentes: temperatura (°C), tempo (min) e relação palha/água (%). A matriz DCCR gerada pelo software Design-Expert 7.0, para as três variáveis gerou vinte ensaios. O efeito dessas variáveis foi estudado em 5 níveis experimentais: $-\alpha$, -1 , 0 , 1 , $+\alpha$, onde $\alpha = 2^{n/4}$, n é igual ao número de variáveis e 0 corresponde ao ponto central. Com base na revisão de literatura foram definidos três níveis de cada variável analisada: (1) Temperatura (°C): 170, 190 e 210; (2) tempo (min.): 5, 10, 15; e (3) concentração palha/água (%): 10, 12,5 e 15 em 200 mL de água.

No processo de pré-tratamento hidrotérmico, colocou-se a mistura palha de cana-de-açúcar e água no reator com agitador e termômetro internos em alta temperatura e pressão. O tempo de hidrólise térmica foi cronometrado a partir do momento que atingiu a temperatura estabelecida no planejamento experimental. Após o tempo de hidrólise térmica, foram retirados do reator o licor negro e a palha, separadamente. Em seguida a palha foi lavada em água corrente até atingir pH neutro e colocada na centrífuga de secagem por 4 min a 800 rpm para promover sua desagregação e secagem. Após a lavagem e secagem a palha pré-tratada foi reservada em duas partes: uma parte para a caracterização química e outra parte para a etapa de hidrólise enzimática.

Hidrólise enzimática da palha pré-tratada

Após a etapa de pré-tratamento, pesou-se 4,0 g (massa seca) da palha pré-tratada de cada ensaio em erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de tampão citrato 50 mM. O pH das amostras foi ajustado para 4,8, valor de pH ótimo das enzimas. Em seguida os erlenmeyers foram fechados para que não houvesse uma alteração considerável dos volumes reacionais e incubados em um shaker com rotação constante de 150 rpm e temperatura de 50 °C durante todo o processo de hidrólise.

Para estudar as condições de pré-tratamento hidrotérmico, alíquotas de aproximadamente de 1 mL foram coletadas em períodos de tempo pré-determinado, isto é, 0, 12, 24, 26, 36, 48, 60, e 72 h e, então, centrifugadas e retirado o sobrenadante para análise da concentração de glicose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Utilizou-se enzima comercial (Celluclast 1.5 L, Novozymes) na concentração 15 FPU por grama de substrato.

Análise estatística

No Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), os resultados foram analisados estatisticamente por meio de análises de variância e de regressão. Por meio da análise da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), foram determinadas as melhores condições de pré-tratamento hidrotérmico para a palha de cana-de-açúcar. Os resultados foram analisados utilizando o software Design-Expert 7.0 ao nível de significância de 5%. Foi considerado para o delineamento de seleção de níveis das variáveis o valor de 5% para o DCCR.

Tabela 1. Composição química da palha de cana-de-açúcar em diferentes regiões do Brasil

Palha de cana	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	Extrativos	Total
	%					
MG	45,30	31,51	16,70	5,90	16,10	99,41
SP	44,44	30,70	19,80	3,90	16,70	98,84
PR	44,98	30,92	18,90	4,80	16,80	99,60
MT	43,57	30,53	19,40	5,30	16,70	98,80
AL	43,02	31,85	20,20	4,40	14,10	99,47
Média	44,26 ± 1,35	31,10 ± 0,78	19,01 ± 1,95	4,86 ± 1,10	16,68 ± 2,83	
Desvio padrão	0,95	0,56	1,38	0,78	2,01	

*Intervalo de confiança calculado das médias para $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização química da palha de cana-de-açúcar em diferentes regiões do Brasil

Na Tabela 1 pode-se observar que a concentração média de celulose encontrada na palha de cana-de-açúcar (44,26%) é comparável aos valores de concentração publicados na literatura, tais como: (41,8%);¹³ (40,1%);¹⁴ e (42,1%).¹⁵ Os valores de hemicelulose (31,10%) são superiores aos encontrados para o bagaço de cana (24%); madeira (25%); palha de arroz (26,4%); palha de cevada (27%) e palha de sorgo (26,04%).¹⁶ No caso da lignina (19,01%) foi inferior aos encontrados no bagaço por Samaniego¹⁷ (22,82%) e Pitarello¹⁵ (40,7%) e ligeiramente superior aos encontrados por Carvalho¹³ (16,2%).

Em relação à quantidade de cinzas é preciso levar em consideração as diferentes concentrações de cinzas dependendo da região e como foi coletada a palha de cana. A palha localizada próxima ao solo apresenta concentração de cinzas em torno de 7 a 8%. Já a palha proveniente do meio da cana e as folhas verdes apresentam quantidade de cinzas em torno de 2 a 3%.¹⁸ No Estado de São Paulo a concentração de cinzas da palha foi (3,90%), enquanto em Minas Gerais e no Mato Grosso obteve 5,90 e 5,30%, respectivamente. Pitarello¹⁵ obteve teores de cinzas (11,7%) na palha de cana superiores aos encontrados no presente trabalho. Concentrações elevadas de cinzas podem diminuir o potencial energético da matéria-prima para o processo de fermentação, acarreta um aumento na capacidade tamponante da matéria-prima, levando a uma neutralização parcial dos catalisadores ácidos responsáveis pela hidrólise parcial dos polissacarídeos constituintes da biomassa, além de causar maior abrasão e corrosão dos equipamentos.¹⁵ O percentual médio de extrativos encontrados na palha (16,68%) é ligeiramente maior do que os encontrados por Carvalho¹³ na palha (12,2%) e no bagaço (15,0%). Pitarello¹⁵ encontrou valores para palha de 11,5% e para o bagaço 6,8%. Estas diferenças nos resultados podem ser devidas a diferentes técnicas empregadas.

A composição química da palha de cana varia em função de diversos fatores, incluindo a própria genética da planta, as condições edafoclimáticas da região, estágio de desenvolvimento, bem como o sistema de colheita.¹⁹

Os resultados encontrados permitem concluir que as condições edafoclimáticas das regiões avaliadas pouco influenciam na composição química da palha de cana-de-açúcar, especialmente, em relação à celulose, hemicelulose e lignina. Diante disso, para dar prosseguimento nas etapas subsequentes, foi escolhida a palha de cana-de-açúcar oriunda do Estado de Minas Gerais.

Otimização do pré-tratamento hidrotérmico

A Tabela 2 mostra os resultados de caracterização da palha de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento hidrotérmico. Observa-se que a composição química da palha apresenta quantidades menores de celulose (45,30%) e lignina (16,70%) quando comparadas com a palha pré-tratada. No entanto, a concentração de hemicelulose (31,51%) presentes na palha foi bem maior em relação à palha submetida ao pré-tratamento hidrotérmico que ficou na faixa de 17,06 a 2,07%. Esses resultados corroboram os encontrados por Garrote,⁸ que em temperaturas de 150 a 230 °C o pré-tratamento hidrotérmico solubiliza grande parte da fração hemicelulósica sem afetar a celulose e a lignina. No entanto, em condições mais severas de temperaturas (260 a 270 °C), a celulose e a lignina podem ser solubilizadas em até 20% e 60%, respectivamente.²⁰

A maior remoção de hemicelulose (93,43%) ocorreu na condição de 223 °C por 10 min e na condição de 210 °C por 15 min,

Tabela 2. Efeito do pré-tratamento hidrotérmico nos teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes na palha de cana-de-açúcar

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
1	170	5	46,74	16,49	24,54
2	210	5	55,95	3,35	32,77
3	170	15	47,33	14,54	25,81
4	210	15	49,49	2,35	40,20
5	170	5	43,59	17,44	27,10
6	210	5	55,03	4,17	31,93
7	170	15	47,18	14,30	24,61
8	210	15	56,39	2,54	33,68
9	156,36	10	44,48	17,06	24,67
10	223,64	10	53,99	2,07	37,13
11	190	1,59	50,63	12,58	23,62
12	190	18,41	52,35	6,16	32,25
13	190	10	52,53	6,72	31,30
14	190	10	53,75	6,52	30,95
15	190	10	53,63	7,32	29,40
16	190	10	55,29	7,17	29,10
17	190	10	51,73	6,42	32,53
18	190	10	52,05	6,48	32,52
19	190	10	51,01	7,03	32,52
20	190	10	50,67	6,81	33,27
Palha de cana in natura			45,30	31,51	16,70

com 92,54% de hemicelulose. Esses resultados estão próximos aos encontrados por Silva,²¹ que avaliando o bagaço de cana em diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico encontrou 88,7% de hemicelulose removida para a condição de 195 °C por 10 min.

Verifica-se ainda que a variável temperatura tem maior efeito sobre os constituintes da palha de cana em relação ao tempo. Observa-se que na temperatura de 170 °C houve pequena diferença entre os valores encontrados para celulose (46,74 e 47,33%), hemicelulose (14,54 e 16,49%) e lignina (24,54 e 25,81%). Na temperatura de 190 °C o valores de celulose 52,53, 52,35 e 50,63% nos tempos de 1,59, 18,41 e 10 min, respectivamente, também variaram pouco, o que também pode ser observado para lignina. No entanto, nessas condições de temperatura e tempo os valores de hemicelulose mostraram que o tempo de 1,59 min solubilizou menos hemicelulose (12,58%) quando comparado aos tempos de 18,41 (6,16%) e 10 min (6,72%). Em temperaturas de 210 e 223 °C os valores de celulose e lignina pouco variaram em função do tempo (5,10 e 15 min.). Entretanto, nas condições avaliadas a temperatura foi a que mais influenciou para a maior remoção da hemicelulose (3,35, 2,35 e 2,07%).

Vale a pena ressaltar que, em processos de pré-tratamento hidrotérmico conduzidos a elevadas temperaturas, o tempo de aquecimento do reator até atingir a temperatura pré-estabelecida pode proporcionar, ainda que pequena, uma degradação da fração hemicelulósica.²² Ademais, fatores como a relação sólido/líquido são importantes para o controle da degradação da fração celulósica evitando a perda de rendimento no processo de conversão enzimática da fração celulósica em glicose para a obtenção de etanol celulósico.⁸

Hidrólise enzimática da palha pré-tratada

A hidrólise enzimática foi conduzida a 50 °C utilizando celulasas na concentração de 15 FPU por grama de palha pré-tratada. Para selecionar o melhor pré-tratamento a hidrólise foi acompanhada por 72 h para que se pudessem traçar curvas de liberação de glicose em relação ao tempo. Essa avaliação é importante uma vez que o efeito de cada condição de pré-tratamento sobre a palha de cana pode ser diferente. Isso torna a palha menos ou mais acessível para as celulasas, influenciando dessa forma no tempo de conversão da mesma. A Figura 1S mostra os perfis de liberação de glicose da palha de cana-de-açúcar nos 20 ensaios de pré-tratamento hidrotérmico.

Ao analisar os perfis da Figura 1S, observa-se que as diferenças

nos rendimentos de glicose estão relacionadas com as condições de cada ensaio do planejamento experimental. É possível verificar que a liberação de glicose é rápida nas primeiras 12 horas, diminuindo a velocidade de hidrólise, tendendo a estabilizar após 48 horas de sacarificação.

O menor valor de glicose liberada (9,70 g/L) foi encontrado no ensaio 9 na condição de temperatura de 156,36 °C; tempo de 10 min e relação de palha/água de 12,5%. Por sua vez, o maior rendimento de sacarificação enzimática (43,36 g/L) foi obtido no ensaio 12, na condição de temperatura de 190 °C; tempo de 18,41 min e relação palha/água de 12,5%. O ponto central do planejamento experimental (ensaios 15 a 20) proporcionou um rendimento médio de 34,22 g/L de glicose em 48 horas de sacarificação.

Estes resultados confirmam os relatados na literatura, evidenciando que o rendimento da hidrólise enzimática é fortemente influenciado pelas condições de pré-tratamento, pelo tempo de sacarificação, pela composição química da palha pré-tratada²³ e que o pré-tratamento hidrotérmico favorece a acessibilidade das enzimas celulolíticas à celulose, proporcionando, portanto, um aumento da digestibilidade enzimática nos processos de conversão da celulose em glicose.⁸

Sendo assim, escolheu-se o tempo de 48 horas de hidrólise enzimática como resposta final que obteve a maior liberação de glicose após a eliminação dos termos referentes às variáveis não significantes ($p > 0,05$), que pode ser obtida pela função:

$$Y = -551.87742 + 5.52469 X_1 + 4.69214 X_2 - 0.014008 X_2^2$$

onde Y é o valor da resposta (liberação de glicose) e X_1 e X_2 são os níveis codificados de temperatura e tempo.

O modelo de regressão teve sua significância estatística testada pelo teste F e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para o modelo quadrático de superfície de resposta (Tabela 3).

No presente trabalho, o modelo quadrático foi significativo com valor de $P > F$ 0,0009. Além disso, a falta de ajuste do referido modelo foi não significativa, conforme pode ser observado por meio do valor $P > F$ 0,1846.

Os resultados indicaram que o termo linear da temperatura e do tempo de residência no reator, e o efeito quadrático da temperatura tiveram efeito significativo ($P < 0,05$) sobre a liberação de glicose no processo de pré-tratamento hidrotérmico. Entretanto, o efeito linear da relação palha/água e os efeitos quadráticos do tempo e relação palha/água não demonstraram significância.

Tabela 3. ANOVA para superfície de resposta do modelo quadrático do processo de otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Valor p	Prob. >F	
Modelo	1537,65	9	170,85	9,28	0,0009		significativo
A-Temperatura	867,97	1	867,97	47,16	< 0,0001		significativo
B-Tempo	103,94	1	103,94	5,65	0,0389		significativo
C-%Sólido	21,45	1	21,45	1,16	0,3057		n.s
AB	43,85	1	43,85	2,38	0,1537		n.s
AC	23,77	1	23,77	1,29	0,2823		n.s
BC	8,84	1	8,84	0,48	0,5040		n.s
A ²	452,43	1	452,43	24,58	0,0006		significativo
B ²	12,44	1	12,44	0,67	0,4302		n.s
C ²	34,37	1	34,37	1,87	0,2017		n.s
Resíduo	184,055	10	18,40				
Falta de ajuste	129,17	5	25,83	2,35	0,1846		n.s
Erro puro	54,89	5	10,98				
Total	1721,70	19					

*R² = 0,89.

Superfície de resposta do pré-tratamento hidrotérmico

Na Figura 1 são apresentados os resultados da superfície de resposta tridimensional (3D), representado de acordo com a equação modelo para o processo de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar.

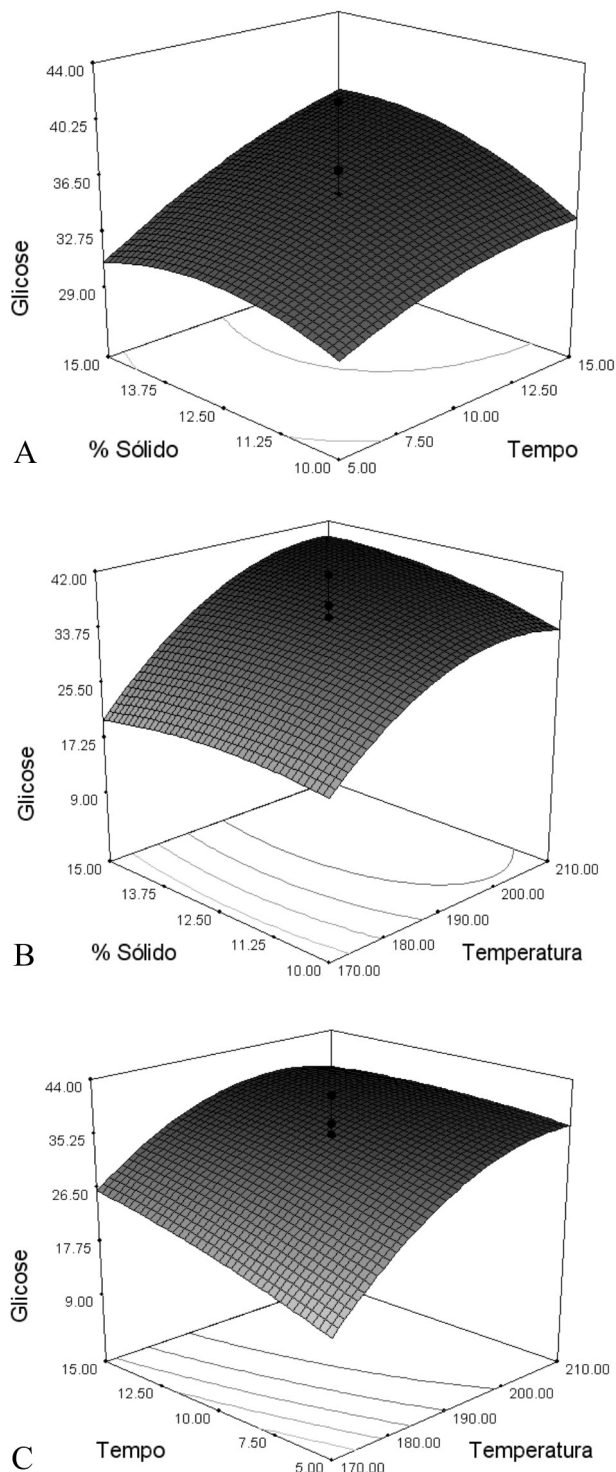


Figura 1. Curvas de superfície de resposta do processo de pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar. (A) liberação de glicose em função do tempo e da relação palha/água; (B) liberação de glicose em função da temperatura e da relação palha/água; (C) liberação de glicose em função da temperatura e do tempo

Ao analisar a Figura 1 (A) observa-se que, mantendo a temperatura no ponto central, a maior liberação de glicose ocorre na condição de maior relação palha/água e tempo. Com esse aumento de tempo e da relação palha/água a superfície de resposta apresenta um comportamento de um plano ascendente buscando atingir um máximo de liberação de glicose. Esse mesmo comportamento é observado quando o tempo é fixado no ponto central Figura 1 (B), no entanto, chega um momento que a temperatura acaba influenciando negativamente na liberação de glicose. Já na Figura 1 (C) nota-se que a maior liberação de glicose encontra-se nas maiores temperaturas do planejamento e em maiores tempos. Esses resultados corroboram os de Pitarelo,¹⁵ que obteve os melhores rendimentos de glicose liberada no bagaço de cana em temperatura de 195 °C e 210 °C por 8 min. Silva²¹ também verificou que a maior liberação de glicose no bagaço de cana ocorreu em temperaturas de 195 °C por 10 min pelo pré-tratamento hidrotérmico. No entanto, altas temperaturas favorecem a formação de produtos de desidratação dos carboidratos (furfural e hidroximetilfurfural) e degradação da lignina, que restringem a acessibilidade do substrato às enzimas.²⁴

A eficiência com que a celulose é hidrolisada depende de muitos fatores que envolvem desde as características do substrato até a natureza do sistema enzimático utilizado. Os fatores relacionados às enzimas incluem a inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de produto final (glicose e celobiose), adsorção irreversível das enzimas sobre o substrato, desnaturação enzimática por exposição excessiva à temperatura e agitação de processo. Já os fatores relacionados ao substrato correspondem à porosidade e cristalinidade das fibras de celulose, teor de lignina e hemiceluloses.²⁵

De acordo com Galbe,²⁶ o pré-tratamento hidrotérmico provoca redução do tamanho das partículas, abertura dos microporos e aumento da área superficial da biomassa lignocelulósica. Estas alterações na estrutura recalcitrante da biomassa são responsáveis pela melhora do ataque enzimático, sendo que o aumento da drasticidade do pré-tratamento hidrotérmico produz um substrato com maior acessibilidade à ação enzimática.¹⁵

Mantendo a temperatura e o tempo nos maiores valores considerados no planejamento experimental ocorrerá maior liberação de glicose promovida pela hidrólise enzimática. Segundo Garrote,⁸ quanto maior a temperatura e tempo no pré-tratamento hidrotérmico, maior será a liberação de glicose.

Análise do rendimento em glicose

Foi avaliado o efeito das diferentes condições de pré-tratamento hidrotérmico sobre o rendimento de hidrólise da celulose (% de celulose da palha pré-tratada hidrolisada) e de glicose total expresso em gramas de glicose por 100 gramas de palha (Tabela 4). Em geral, os rendimentos em massa seca, após o pré-tratamento, decresceram com o aumento da temperatura do pré-tratamento. Ensaio com temperaturas de 190, 210 e 223,64 °C apresentaram os menores resultados em massa seca, ficando os valores entre 36,04 a 44,79%; 34,65 a 45,02% e 17,37%, respectivamente, independentemente do tempo.

Já em condições de temperatura de 156,36 e 170 °C, foram os que apresentaram maiores rendimentos em massa, ou seja, houve menor perda de palha no pré-tratamento hidrotérmico ficando os valores entre 60,30 a 99,58%, indicando uma menor degradação dos componentes da palha de cana. A baixa perda de massa no pré-tratamento hidrotérmico em temperatura 156,36 e 170 °C pode ser explicado pela menor remoção da hemicelulose e, ao contrário, a grande perda de massa em temperaturas mais elevadas se deve à maior remoção da hemicelulose, característica deste tipo de pré-tratamento, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 4. Rendimentos obtidos através do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar, de acordo com o planejamento experimental

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min.)	Rendimento (%)		
			Após o pré-tratamento ¹	Hidrólise da celulose após o pré-tratamento ²	Glicose total ³
1	170	5	70,90	36,50	12,10
2	210	5	44,79	71,87	18,01
3	170	15	60,30	55,12	15,73
4	210	15	36,44	69,58	12,55
5	170	5	73,60	37,71	12,10
6	210	5	36,04	81,98	16,26
7	170	15	63,62	58,55	17,58
8	210	15	37,80	84,57	18,03
9	156,36	10	99,58	27,26	12,07
10	223,64	10	17,37	83,97	7,88
11	190	1,59	45,02	71,72	16,35
12	190	18,41	34,65	103,53	18,78
13	190	10	42,13	80,70	17,86
14	190	10	36,88	81,44	16,14
15	190	10	40,47	86,17	18,70
16	190	10	39,42	73,34	15,98
17	190	10	42,37	80,68	17,68
18	190	10	41,25	84,61	18,17
19	190	10	41,01	101,69	21,27
20	190	10	41,61	82,85	17,59

1. Gramas de matéria seca/100 g de palha. 2. gramas de glicose/100 g de celulose da palha pré-tratada. 3. gramas de glicose/100 g de palha.

No entanto, os maiores rendimentos em massa seca após o pré-tratamento hidrotérmico, verificado na temperatura de 170 °C, não se caracterizam em maior rendimento de hidrólise da celulose (36,50 a 58,55%) e nem no rendimento total de glicose (12,10 a 17,58%). Por outro lado, em temperaturas maiores (190, 210 e 223,64 °C), observa-se o contrário, ou seja, um menor rendimento em massa seca e um maior rendimento de hidrólise da celulose e em glicose total, com exceção da temperatura 223,64 °C, que embora apresente alto rendimento de hidrólise da celulose (83,97%), o seu rendimento em glicose total foi baixo (7,88%) (Tabela 4). Nota-se que, nessa condição de temperatura, embora 83,97% da celulose tenham sido hidrolisados, o seu rendimento em glicose total foi o menor valor encontrado, isso pode ser justificado pelo seu baixo rendimento em massa seca (17,37%) e que, nessas condições de altas temperaturas, provavelmente a celulose foi parcialmente hidrolisada.

CONCLUSÕES

- As condições edafoclimáticas das regiões avaliadas pouco influenciam na sua composição química, especialmente, em relação à celulose, hemicelulose e lignina.
- O pré-tratamento hidrotérmico mostrou-se bastante eficiente na remoção da hemicelulose da palha de cana-de-açúcar, além de fornecer substratos de alta susceptibilidade à hidrólise enzimática.
- Por meio do Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), foi possível obter um modelo quadrático significativo para explicar as variáveis temperaturas e tempo sobre a liberação de glicose no processo de pré-tratamento hidrotérmico.
- De acordo com o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), a maior liberação de glicose da hidrólise enzimática foi na condição de pré-tratamento hidrotérmico de 190 °C por 18,41 min e relação palha/água de 12,5%.
- As superfícies de resposta demonstraram um contorno elíptico, o que sugere que as condições de operação foram bem definidas

para o processo de otimização do pré-tratamento hidrotérmico para palha de cana-de-açúcar.

- Os ensaios do planejamento experimental com temperaturas de 190 e 210 °C proporcionaram maior rendimento de hidrólise da celulose, chegando a valores próximos de 100%, mostrando a eficiência do pré-tratamento hidrotérmico sobre a recalcitrância da palha de cana-de-açúcar e seu potencial na produção de etanol celulósico.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Disponível na forma de material suplementar no sítio da SBQ (<http://quimicanova.s bq.org.br>), com acesso livre, pode ser encontrada a Figura 1S (perfis da liberação de glicose nos 20 ensaios de pré-tratamento hidrotérmico) citadas no texto.

BIBLIOGRAFIA

1. Santos, F. A.; Queiroz, J. H.; Colodette, J. L.; Fernandes, S. A.; Guimarães, V. M.; Rezende, S. T.; *Quim. Nova* **2012**, *26*, 1004.
2. Ripoli, T. C. C.; *Sci. Agric.* **2000**, *57*, 677.
3. Magalhães, O. S. G.; Braunbeck, O. A. Em: *Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade*; Cortez, L. A. B., ed.; Edgard Blücher Ltda: São Paulo, 2010, cap. 1, parte 3.
4. Rabelo, S. C.; Costa, A. C.; Rossel, C. E. V. Em: *Cana-de-Açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol – Tecnologias e Perspectivas*; Santos, F.; Borem, A.; Caldas, C.; eds.; Ed. da UFV: Viçosa, 2012, cap. 17.
5. Leal, M. R. L. V.; The potential of sugarcane as an energy source. XXVI *International society of sugarcane technologists congress*, Durban, South Africa, 2007.
6. Santos, F.; Queiroz, J. H.; Colodette, J.; Souza, C. J.; Em: *Bioenergia & Biorrefinaria – Cana-de-Açúcar & Espécies Florestais* - Santos, F.; Colodette, J.; Queiroz, J. H.; eds.; Ed. da UFV: Viçosa, 2013, cap. 4.
7. Galbe, M.; Zacchi, G.; *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2007**, *108*, 41.

8. Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J. C.; *Eur. J. Wood and Wood Products* **1999**, *57*, 191.
9. Kabel, M. A.; Bos, G.; Zeevalking, J.; Voragen, A. G. J.; Schols, H. A.; *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 2032.
10. Ohgren, K.; Bura, R.; Lesnicki, G.; Saddler, J.; Zacchi, G.; *Process Biochem.* **2007**, *42*, 834.
11. Laser, M.; Schulman, D.; Allen, S. G.; Lichwa, J.; Antal Jr., M. J.; Lynd, L. R.; *Bioresour. Technol.* **2002**, *81*, 33.
12. Tappi Test Methods. Tappi Press: Atlanta, 1994.
13. Carvalho, D. M. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2012.
14. Hassuani, S. J.; Verde Leal, M. R. L.; Macedo, I. C.; Biomass power generation: sugarcane cane bagasse and trash. Project BRA/96/G31 PNUD – CTC. Piracicaba: Unipress disc records do Brasil, Série Caminhos para Sustentabilidade, 2005.
15. Pitarello, A. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2007.
16. Cardoso, W. S.; Santos, F. A.; Mota, C. M.; Tardin, F. D.; Resende, S. T.; Queiroz, J. H.; *Revista Analytica* **2012**, *56*, 64.
17. Samaniego, M. R. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2007.
18. Sotelo, R. C.; Correa, J. L.; *Instituto cubano de pesquisa dos derivados da cana (ICIDCA)*. Brasília, Brasil, ABIPTI, **1999**, 63-68.
19. Hames, B. R.; Thomas, S. R.; Sluiter, A. D.; Roth, C. J.; Templeton, D. W.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2003**, *105*, 5.
20. Biermann C. J.; Schultz, T. P.; McGinnis, G. D.; *J. Wood Chem. Technol.* **1984**, *4*, 111.
21. Silva, V. F. N.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.
22. Carrasco, F.; Roy, C.; *Wood Sci. Technol.* **1992**, *26*, 189.
23. Canilha, L.; Milagres, A. M. F.; Silva, S. S.; Silva, J. B. A.; Felipe, M. G. A.; Rocha, G. J. M.; Carvalho, W.; *Revista Analytica* **2010**, *44*, 48.
24. Hsu, T. Elm: *HANDBOOK on Bioethanol: Production and Utilization*. Taylor & Francis: Washington, 1996, 179-188.
25. Ramos, L. P. *Quim. Nova* **2003**, *26*, 863.
26. Galbe, M.; Zacchi, G. A.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *59*, 618.