

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSAMENTO DE MATERIAIS E
CATÁLISE

Felipe de Souza Miranda

**ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO PLASMA EM LÍQUIDOS**

São José dos Campos

2013

Felipe de Souza Miranda

**ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO PLASMA EM LÍQUIDOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado Profissional em Processamento de Materiais e Catálise, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de mestre em Processamento de Materiais e Catálise.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Vieira Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa

São José dos Campos

2013

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Miranda, Felipe de Souza
ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO PLASMA EM LÍQUIDOS / Felipe de Souza Miranda;
orientadora, Lúcia Vieira Santos; co-orientador Rodrigo Sávio
Pessoa. - São José dos Campos, SP, 2013.
1 CD-ROM, 90 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em
Processamento de Materiais e Catálise.

Inclui referências


1. Processamento de Materiais e Catálise. 2. Bioetanol. 3.
Cana-de-açúcar. 4. Hidrólise. 5. Plasma. I. Vieira Santos, Lúcia,
orient. II. Sávio Pessoa, Rodrigo, co-orient. III. Universidade
do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de
Materiais e Catálise. IV. Título.

Eu, Felipe de Souza Miranda, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 25 de Novembro de 2013.

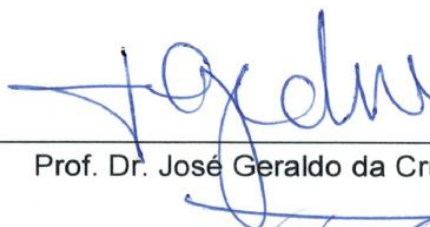


Autor(a) do Obra

Data da defesa: 04 / 11 / 2013

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO PLASMA EM LÍQUIDOS

Dissertação de Mestrado aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processamento de Materiais e Catálise, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais e Catálise, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora.



Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella (CTBE)



Prof. Dr. Homero Santiago Maciel (UNIVAP)



Prof. Dr. Rodrigo Sávio Pessoa (UNIVAP)



Profa. Dra. Lúcia Vieira Santos (UNIVAP)

Profa. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa.
Diretora do IP&D – UNIVAP.
São José dos Campos, 4 de novembro de 2013.

Dedicatória

À minha família

À minha mãe Mathilde, por sempre me dar forças para continuar, me apoiando e sempre me incentivando a continuar lutando pelos meus objetivos, ao Fernando meu irmão, melhor amigo e muitas vezes meu pai, pois ao contrário do que parece é ele quem sempre cuidou de mim. Ao Elias meu padrasto por cuidar da minha família e de mim como um verdadeiro pai. À Aline minha namorada por me amar, entender e estar ao meu lado em todas as dificuldades pelas quais passei.

Amo todos Vocês

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por me dar forças em momentos de dificuldades.

À Professora Dra. Lúcia Vieira Santos por ter me aceitado como seu aluno e ter me ensinado tanto durante esses anos. Muito obrigado pela confiança que depositou em mim.

Ao Professor Dr. Rodrigo Sávio Pessoa por sempre estar disposto a ajudar, colaborando muito para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Homero Santiago Maciel pelos conselhos e por sempre confiar no meu potencial.

Ao Roberson José da Silva por sempre estar disposto a tirar dúvidas e me ajudar muito em meu trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), por ter cedido os laboratórios, pesquisadores e técnicos para realização de ensaios, em especial à Sarita Cândida Rabelo e Chanel Moacyr de Carli.

Ao Dr. José Geraldo da Cruz Pradella, pesquisador do CTBE, por todo ensinamento e atenção dada.

A todos os professores do programa de mestrado profissional em processamento de materiais e catálise, principalmente ao coordenador Professor. Dr. Liu Yao Cho.

Aos meus colegas de laboratório do grupo NanoTecPlasma, em especial a Fernanda por sempre ter me ajudado em meu trabalho, pela atenção e paciência.

Aos meus colegas de turma.

Ao Engenheiro Marco Antônio pela oportunidade, pois sem você não teria conhecido todas estas pessoas maravilhosas.

Ao professor João Luiz Teixeira Pinto pelos conselhos e ensinamentos.

A todos os funcionários da Universidade do Vale do Paraíba, em especial aos funcionários do IP&D.

À Priscila Leite pelos ensaios de MEV.

Finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR UTILIZANDO PLASMA EM LÍQUIDOS

Resumo

A necessidade mundial de obtenção de novas fontes de energias vem motivando diversos tipos de pesquisas a fim suprir a escassez eminente dos combustíveis fósseis, nesse cenário tornou-se promissor o uso dos materiais lignocelulósicos, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar que tem demonstrado grande potencial, já que a partir deles é possível obter o etanol de segunda geração. Este trabalho apresenta os resultados referentes ao estudo da utilização de uma nova tecnologia de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, por meio de um reator de descarga por barreira dielétrica com incidência em líquidos, que diferentemente da técnica de plasma a seco explorado na literatura, possibilita tratar a biomassa presente como um todo e não apenas sua superfície. Essa modificação de processamento faz com que o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado se torne mais acessível às enzimas hidrolíticas garantindo, dessa maneira, uma maior solubilização dos açúcares a serem utilizados no processo de obtenção do etanol de segunda geração. Além da utilização do reator de plasma por barreira dielétrica, também foram feitas variações no pH das soluções utilizadas para o pré-tratamento. As amostras foram tratadas com três diferentes tipos de pH (3, 10 e 12), o que possibilitou a análise da influência do pH no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, pois como visto na literatura, cada pH torna possível a remoção de um determinado componente da biomassa. Para cada amostra tratada no reator de plasma por barreira dielétrica foram feitos três tratamentos correspondentes denominados Brancos. Os Brancos das amostras são ensaios executados com as mesmas condições de tempo, temperatura, massa e pH das soluções, porém sem a ação do plasma. Conseqüentemente, tornou-se possível avaliar, mediante a comparação dos resultados, o efeito do plasma sobre biomassa tratada. Amostras do bagaço de cana-de-açúcar foram submetidas à análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com a finalidade de detectar as modificações morfológicas decorrentes do pré-tratamento. Foi feita a caracterização química das amostras utilizando Cromatografia Líquida de Alta

eficiência (CLAE), para quantificar cada componente que permaneceu na biomassa e nos líquidos resultantes após o pré-tratamento. Por fim, todas as amostras com e sem pré-tratamento a plasma passaram pelo processo de hidrólise enzimática, o que permitiu verificar a quantidade de açúcar liberado, onde alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, período no qual o processo de hidrólise atinge o ponto máximo de conversão. A utilização da tecnologia de plasmas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos mostrou-se como uma promissora ferramenta a ser utilizada no processo de produção de etanol de segunda geração. Os resultados obtidos com o pré-tratamento a plasma juntamente com a solução de pH 12 demonstraram uma grande modificação na biomassa, que alcançou o maior grau de extração de lignina, propiciando assim maior liberação de glicose durante processo de hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Bioetanol, Cana-de-açúcar, Hidrólise, Lignocelulósicos, Plasma.

STUDY OF PRETREATMENT OF SUGAR CANE BAGASSE USING PLASMA IN LIQUIDS

Abstract

The worldwide necessity to obtain new sources of energy has motivated many types of research to supply the imminent shortage of fossil fuels. In this scenario, lignocellulosic materials such as bagasse and sugar cane have shown great potential, because from them is possible to obtain the second generation ethanol. This thesis presents the study of a new technology for pre - treatment of sugar cane bagasse through a reactor discharge based on dielectric barrier leading to plasma incidence in liquid, different from the dry plasma technique explored in the literature. This reactor makes possible the treatment of the biomass present as a whole and not just the material surface. This modification of process makes the pretreated sugarcane bagasse becomes more accessible to hydrolytic enzymes thereby ensuring a greater solubilization of sugars to be used in the process of obtaining the second-generation ethanol. In addition to the use of the plasma reactor by dielectric barrier, changes in the pH of the solutions used for pre- treatment were made, the samples being treated with three different pH (3, 10, 12), allowing analysis of influence of pH in the pretreatment of sugarcane bagasse. As seen in the literature for each pH, a particular component of the biomass it possible to remove. For each sample treated in the plasma reactor by dielectric barrier were made three corresponding treatments called Whites. Whites were samples tests performed under the same conditions of time, temperature, mass and pH of the solutions, but without the action of the plasma. This makes possible to evaluate the results by comparing the effect of plasma on treated biomass. Samples of sugar cane were analyzed by Scanning Electron Microscopy (SEM), in order to detect morphological changes resulting from pretreatment. Plasma pretreated bagasse was analyzed regarding its chemical composition using a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) to quantify each component that remained in liquid and in biomass resulting after pre-treatment. Finally all the samples with and without plasma pretreatment were

submitted to enzymatic hydrolysis , which allowed verifying the amount of sugar released, at times 0 , 24, 48 and 72 hours. The use of plasma technology for pretreatment of lignocellulosic materials proved to be a promising tool to be used in the production of second generation ethanol. The results obtained with the plasma pretreatment with the solution under pH 12 showed a large change in biomass, which reached the highest degree of extraction of lignin, which resulted in higher glucose release during enzymatic hydrolysis process.

Key-words: Bioethanol, cane sugar, hydrolysis, Lignocellulosic, Plasma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Constituintes da cana-de-açúcar.....	6
Figura 2. Estrutura química dos materiais lignocelulósicos.....	9
Figura 3. Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar.....	11
Figura 4. Representação da estrutura química da molécula de celulose.	11
Figura 5. Ligações de hidrogênio intra e intermolecular na celulose.....	12
Figura 6. Açúcares componentes das hemiceluloses	14
Figura 7. Formação de compostos a partir da hemicelulose após os processos de pré-tratamento e hidrólise ácida	16
Figura 8. Unidades básicas de lignina.....	17
Figura 9. Estrutura de lignina de <i>Fagus sp</i>	18
Figura 10. Esquema da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.....	23
Figura 11. Representação das microdescargas na superfície do Líquido.	31
Figura 12. Amostras separadas após quarteamento.	35
Figura 13. Desenho esquemático do reator a plasma DBD: (1) porta de entrada de amostras, (2) eletrodos (x4), (3) tampa de teflon, (4) recipiente de vidro, (5) placa de metal aterrada, (6) Entrada de gases e (7) saída de gases.....	42
Figura 14. Reator de plasma DBD em funcionamento.	42
Figura 15. Representação do esquema elétrico do sistema de pré-tratamento.....	43
Figura 16. Volume total da amostra tratada.....	45
Figura 17. Amostras sólidas e líquidas separadas.....	47
Figura 18. Foto do microscópio eletrônico de varredura do IP&D/Univap.	48
Figura 19. Foto do CLAE do CTBE	49
Figura 20. Foto do CLAE Waters com detector de UV.....	50
Figura 21. Representação dos plasmas gerados para três diferentes distâncias entre o eletrodo e a superfície do líquido: (A) 60 mm, (B) 40 mm e (C) 20 mm.....	51
Figura 22. Variação do pH da solução de NaOH em relação ao tempo.	52
Figura 23. Imagem de MEV do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento a plasma.....	53
Figura 24. Fibra de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.....	54
Figura 25. Resultados de hidrólise enzimática.	55
Figura 26. Foto do osciloscópio utilizado para medição de consumo energético	59
Figura 27. Medidas de tensão, corrente e potência do sistema.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição física média do bagaço de cana-de-açúcar	7
Tabela 2. Composição média do bagaço de cana-de-açúcar.....	20
Tabela 3. Relação e nomenclatura das amostras.	46
Tabela 4. Nomenclatura e condições de pré-tratamento.....	55
Tabela 5. Composição química e rendimento das amostras.	56
Tabela 6. Composição química dos líquidos resultantes dos pré-tratamentos.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX = Explosão de fibra com amoníaco

CLAE = Cromatografia líquida de alta eficiência

CO_x = Óxido de Carbono

CNPEM = Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CTBE = Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol

DBD = Descarga por Barreira Dielétrica

EDS = *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*

HMF = Hidroxometilfurfural

IP&D = Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

NO_x = Óxido de Nitrogênio

NREL = *National Renewable Energy Laboratory*

pH = Potencial de Hidrogênio

UV = Ultravioleta

UNIVAP = Universidade do Vale do Paraíba

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1.	Objetivo	2
1.2.	Estrutura da dissertação	3
2.	Revisão Bibliográfica	5
2.1.	Cana-de-açúcar	6
2.1.1.	Produtos da cana-de-açúcar	8
2.2.	Materiais lignocelulósicos e sua constituição.....	9
2.2.1.	Celulose.....	11
2.2.2.	Hemicelulose	13
2.2.3.	Lignina.....	16
2.3.	Bagaço de cana-de-açúcar	19
2.3.1.	Características.....	21
2.3.2	Pré-tratamentos	22
2.3.2.1.	Pré-tratamento Físico/Mecânico.....	24
2.3.2.2.	Pré-tratamento físico/químico (explosão a vapor).....	24
2.3.2.3.	Explosão de fibra com amoníaco	25
2.3.2.4.	Explosão com dióxido de carbono.....	26
2.3.2.5.	Peróxido de hidrogênio alcalino	27
2.3.2.6.	Ozonólise como pré-tratamento	28
2.4.	Plasma elétrico	29
2.4.1.	Plasmas atmosféricos: descarga por barreira dielétrica	30
2.4.2.	Plasmas em líquidos e efeito sobre a biomassa	31
2.5.	Hidrólise de materiais lignocelulósicos	32
3.	Materiais e métodos.....	34
3.1.	Matéria prima.....	34
3.2.	Preparação das amostras	34
3.2.1.	Separação das amostras.....	35
3.2.2.	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	36
3.2.2.1.	Teor de cinzas	36
3.2.2.2.	Determinação dos extrativos	37
3.3.	Reagentes utilizados no pré-tratamento	41
3.4.	Reator a plasma (sistema de pré-tratamento).....	41
3.4.1.	Esquema elétrico	43
3.5.	Condições experimentais investigadas.....	44

3.5.1.	Tempo de tratamento do bagaço.....	44
3.5.2.	Massa máxima de bagaço a ser tratado	45
3.6.	Metodologia de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	46
3.7.	Métodos de análise do material após o tratamento a plasma.....	48
3.7.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
3.7.2.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	49
3.7.3.	Hidrólise Enzimática	50
4.	Resultados e discussões.....	51
4.1.	Distância dos eletrodos em relação à superfície do líquido.....	51
4.2.	Variação do pH das soluções em relação ao tempo de exposição ao plasma	52
4.3.	Avaliação da modificação estrutural da biomassa	53
4.5.	Análise da composição química e rendimento das amostras	56
5.	Conclusões	61
5.1.	Trabalhos futuros	62
6.	Trabalhos apresentados em congressos	63
6.1.	Pedido de patente	63
7.	Referências bibliográficas	64

1. Introdução

O desenvolvimento social e a necessidade de locomoção fazem com que a demanda por energia cresça cada vez mais, aumentando o interesse da sociedade e principalmente das indústrias em novas formas de obtenção de fontes de energias, tornando crescente, também, a preocupação pela utilização de fontes energéticas que causem menos impactos ao meio ambiente. Além disso, tem se tornado cada vez mais oneroso e difícil o acesso aos combustíveis fósseis, que também são responsáveis por grande parte dos resíduos poluentes lançados no meio ambiente acarretando uma série de problemas ecológicos pelo mundo. Por esse motivo, a obtenção de biocombustíveis começa a ganhar força no cenário mundial, gerando também debates a respeito das vantagens e possíveis desvantagens de sua produção.

Uma questão importante que deve ser levada em consideração é a disponibilidade de terras para cultivo de alimentos e produção de biocombustíveis. A utilização de terras agricultáveis para produção de biocombustíveis e os impactos que serão gerados na disponibilidade futura para geração de alimentos, tendo em vista o crescimento população mundial, tornaram-se assunto constante de debates na comunidade científica [1].

O incremento de novas tecnologias empregadas no setor agrícola desencadeou um aumento na obtenção de produtos e subprodutos. Atualmente, pesquisas em laboratório estão voltadas para utilização desses subprodutos, como alternativa econômica para produção de biocombustíveis [2].

A utilização de variados tipos de biomassas vegetais como fontes de energia renovável, mesmo não sendo capaz de substituir completamente o consumo de petróleo e de seus derivados, pode ser considerada como um importante auxílio na redução dos impactos ambientais causados pelo incessante consumo destes. Várias nações vêm se organizando estrategicamente para a obtenção desse novo meio de geração de energia, e ao mesmo tempo em que buscam aumentar a sua oferta visando à diminuição dos custos, crescem as preocupações com o meio ambiente [3].

Nesse sentido, as biomassas residuais, de natureza lignocelulósica, assumem um papel indispensável para solução do problema de disponibilização de terras

agricultáveis e suprimento da demanda energética. Resíduos agrícolas e agroindustriais, que antes eram utilizados como adubo, combustível de caldeiras ou ficavam ao relento gerando impactos ambientais, hoje, representam uma fonte de oportunidades inestimável para produção de biocombustíveis e outros compostos de extensa faixa de valores [1].

Materiais lignocelulósicos possuem um bom potencial para a produção de etanol, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos mais utilizados no Brasil. Isso se deve ao fato de que o bagaço apresenta várias vantagens, como já se encontra em uma forma processada pelas moendas das usinas, e em grandes quantidades, podendo ser utilizado no local, o que reduz os custos de transporte, tornando sua produção mais acessível e de baixo custo [4].

O uso do bagaço, para fins energéticos, pode ser feita através de processos de combustão e gaseificação onde seus polissacarídeos podem ser liberados por meio da hidrólise [5]. A hidrólise da celulose executa a quebra das ligações por pontes de hidrogênio nas frações de hemicelulose e de celulose em seus componentes do açúcar: pentoses e hexoses. Esses açúcares podem então ser fermentados para a produção do bioetanol. Diversos processos de hidrólise da biomassa lignocelulósica estão sendo estudados e empregados em nível de pesquisa quanto uma escala industrial para fins diversos [6].

Porém, para se ter um bom aproveitamento desses materiais, faz-se necessário aperfeiçoar processos anteriores a hidrólise para que a mesma consiga ter um bom rendimento e assim possibilite uma maior produção do biocombustível. O maior obstáculo existente para um processo eficiente ainda é um bom pré-tratamento da biomassa.

1.1. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, aplicação e a avaliação de um método de pré-tratamento de biomassa do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando um reator de plasma em líquidos, a fim de aumentar a eficiência do processo de conversão de biomassa em etanol.

Para alcançar esse objetivo o trabalho foi dividido em algumas etapas:

- 1) Projeto e desenvolvimento do reator.
- 2) Estudo das melhores condições de configuração de distância e distribuição dos eletrodos utilizados para possibilitar maior área de contato da descarga com a massa a ser tratada.
- 3) Estudo das condições do pré-tratamento da biomassa em relação ao tempo, a temperatura de processo e ao pH da solução de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaOH}$.
- 4) Análise da biomassa e líquidos resultantes com e sem a utilização do pré-tratamento a plasma.
- 5) Rendimento de hidrólise enzimática e comparação dos resultados entre os parâmetros variados no processo de pré-tratamento.

1.2. Estrutura da dissertação

Este trabalho está dividido em capítulos cujos conteúdos estão descritos a seguir.

O Capítulo 1, “Introdução”, apresenta a motivação, os objetivos e organização deste trabalho.

No Capítulo 2, “Revisão Bibliográfica”, apresenta as principais características da cana-de-açúcar, sua composição química e estrutural. Além disso, apresenta uma revisão dos principais métodos de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, os métodos de obtenção de açúcares fermentáveis que são utilizados para a produção do etanol de segunda geração e também as características do plasma utilizado neste trabalho para o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

No Capítulo 3, “Materiais e métodos”, é apresentada a descrição detalhada do procedimento experimental.

No Capítulo 4, “Resultados e discussões”, são apresentados os resultados obtidos após os procedimentos experimentais.

No Capítulo 5, “Conclusões e Trabalhos futuros”, encontra-se a conclusão do trabalho e sugestões de aprimoramentos do sistema para utilização em trabalhos futuros.

Por fim, no Capítulo 6, “Trabalhos apresentados em congressos e Pedidos de Patente”, apresenta os trabalhos apresentados em congressos e também o pedido de patente gerado a partir deste trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

A cana-de-açúcar é cultivada em todas as regiões geográficas do Brasil. O seu cultivo continua crescendo em áreas próximas às usinas e em dezenas de novos empreendimentos que estão sendo instalados nas últimas safras, em áreas do oeste de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, norte e nordeste brasileiro. A tecnologia aplicada no setor agrícola canavieiro é notável e inclui vários fatores como: desenvolvimento de variedades para ambientes e manejos específicos, métodos de preparo e conservação do solo, desenvolvimento de plantio e colheita mecanizada e aplicação de técnicas gerenciais específicas na produção [7].

O incremento de novas tecnologias empregadas no setor agrícola desencadeou um aumento na obtenção de produtos e subprodutos. Atualmente, pesquisas em laboratório estão voltadas para utilização de um destes subprodutos, o bagaço da cana-de-açúcar (gerado em grande quantidade pela agroindústria brasileira) como alternativa econômica para produção de biocombustível em um processo que envolve várias etapas, tais como, pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica.

Um dos desafios da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica consiste em determinar o melhor processo para obtenção dos monossacarídeos. O processo de hidrólise escolhido deve ser economicamente viável, em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado.

No Brasil, o bagaço de cana é um dos subprodutos disponíveis em maior quantidade. Estima-se que, a cada tonelada de cana moída, obtém-se 280 kg de bagaço, sendo que a cada ano são produzidos de 5 a 12 milhões de toneladas desse material correspondendo a cerca de 30% do total da cana moída. O bagaço de cana é uma abundante fonte de material lignocelulósico, sendo uma alternativa significativa para o aumento da produção de etanol. Apresenta também as seguintes características: facilidade de obtenção e transporte, alta concentração de carboidratos e baixo custo de colheita e armazenagem [8].

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma gramínea originária da Índia e introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país. As gramíneas constituem uma grande família de plantas da classe das monocotiledôneas, de folhas envoltentes e caule em geral oco. Desde a sua origem até os dias atuais ela vem passando por modificações, o que resultou em várias espécies, as quais diferem entre si principalmente quanto ao conteúdo de fibras e açúcares. Hoje, a maior parte da cana-de-açúcar cultivada é um híbrido de planta original com outras espécies da mesma família [9]. Como a maior parte das plantas, a cana-de-açúcar apresenta um eixo principal, denominado talo, de onde emergem as raízes, as folhas e as inflorescências (Figura 1). Dos constituintes da cana-de-açúcar, apenas o talo vem apresentando valor econômico por sua capacidade de acumulação de açúcares e produção de fibras.

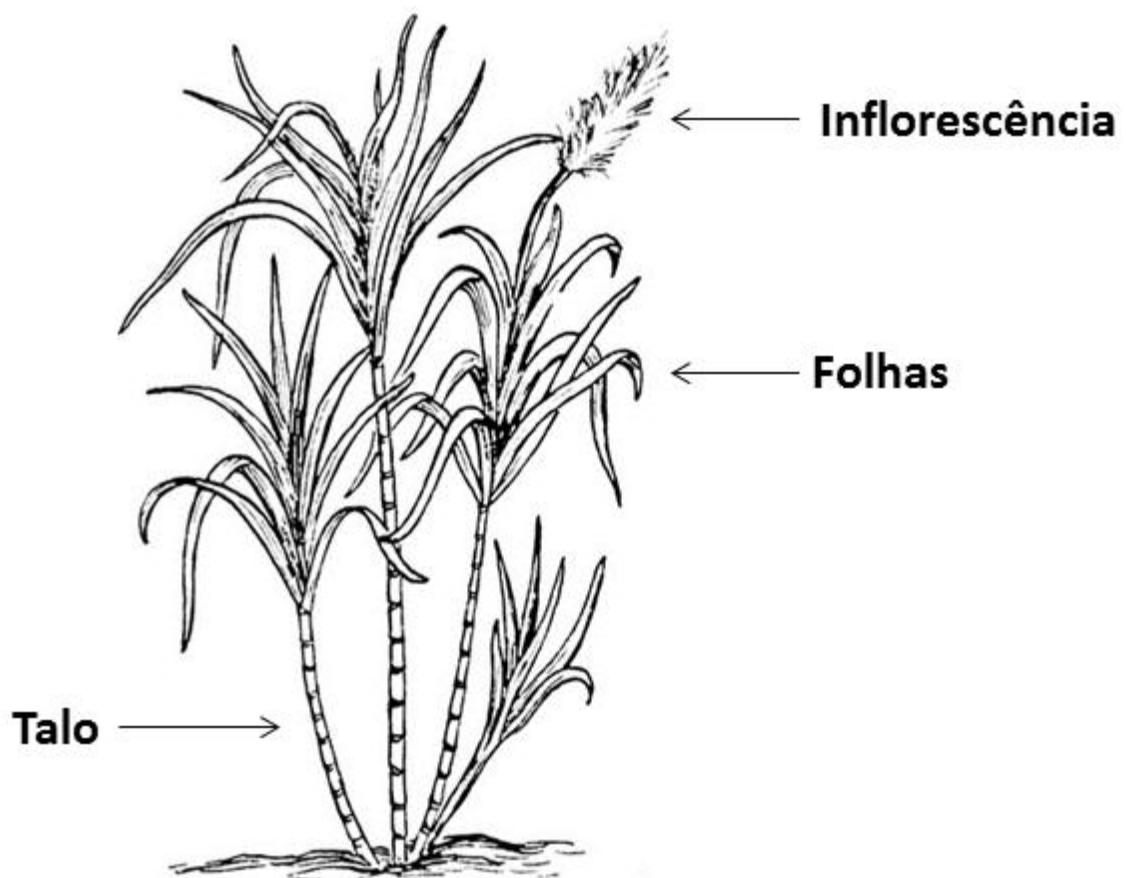


Figura 1. Constituintes da cana-de-açúcar adaptado [10].

Estruturalmente, a cana consiste de vários tipos de tecidos, tais como o córtex (ou casca), tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. O córtex é composto de fibras muito lignificadas, sendo caracterizado pela espessura da parede celular, comprimento e rigidez de suas fibras. Esse tecido confere proteção contra os efeitos mecânicos externos, servindo de suporte para a planta. A parte interior do talo é constituída por um tecido parenquimatoso (medula) de caráter não fibroso, o qual possui como principal função o armazenamento do suco adocicado produzido pela planta. Imerso dentro desse tecido encontram-se as hastes fibrovasculares, compostas de fibras curtas e vasos que atuam na sustentação e condução dos alimentos e outros produtos ao longo da planta [11].

De um modo geral, o bagaço consiste de fibras e medula, nas proporções de aproximadamente 65% e 35%, respectivamente, conforme mostrado na Tabela 1. As células que constituem as frações de fibra e de medula são bastante diferentes fisicamente.

Tabela 1. Composição física média do bagaço de cana-de-açúcar [12].

Fibras	Casca	50%
	Vasos e vasculares	15%
Material não fibroso	Medula	30%
	Epiderme não fibrosa	5%

As fibras possuem uma grande razão comprimento/diâmetro (cerca de 70) e um elevado coeficiente de expansão e contração sob processos de umedecimento e secagem. Isso ocasiona forte integração entre as fibras e contribui para força e coesão necessárias para a produção de papel. As células da medula são de formas e tamanhos irregulares com a razão diâmetro/comprimento por volta de cinco.

Assim como outros materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana-de-açúcar é constituído principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, podendo ser utilizado na produção de polpas celulósicas, das quais podem ser obtidos diversos produtos como, por exemplo, o etanol.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar para a indústria de açúcar e álcool. Após a separação da garapa, da qual são produzidos o açúcar e o álcool etílico, o bagaço que sobra é em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina [13] e, atualmente, vem sendo comercializado para reduzir os problemas da crise no fornecimento de energia elétrica.

Devido ao excedente, foi estimado que as usinas de açúcar e álcool, podem liberar de 30 a 50% do bagaço produzido para usos alternativos [14]. Dessa forma, o uso do bagaço de cana como matéria-prima para a produção de celulose e outros produtos de maior valor agregado tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, particularmente em países onde há pouca ou quase nenhuma disponibilidade de madeira, como Cuba, Índia e China [15].

2.1.1. Produtos da cana-de-açúcar

Açúcar e álcool são os principais produtos da agroindústria canavieira, sendo que o açúcar atende o mercado alimentício e o álcool pode ser utilizado como anidro, quando adicionado à gasolina, e hidratado, quando é usado em carros bicompostíveis, que podem ser movidos à gasolina ou a álcool. Nos últimos anos, cerca de 50% da cana-de-açúcar produzida no Brasil destinou-se à produção de açúcar e os outros 50% à produção de álcool [16]. As estimativas mostram que nos próximos anos, a produção de açúcar alcançará 40 milhões de toneladas, 14% a mais que à safra 2011/2012, que foi de 35 milhões. Para o álcool anidro, a produção na safra anterior foi de 8,5 bilhões de litros, 15% a menos que o previsto para os próximos anos, que será de 9,8 bilhões de litros. Porém, a produção de etanol hidratado será 5,09% menor, atingindo 13,382 bilhões de litros contra um volume anterior de 14,101 bilhões de litros [17]. Conforme salientado, a cana é a principal matéria-prima para produção de açúcar e álcool combustível, mas não é a única maneira de se obter etanol [18]. Existem outros meios de fabricação desse combustível, que pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos da cana-de-açúcar, gerado por usinas sucroalcooleiras, como o bagaço de cana [19].

2.2. Materiais lignocelulósicos e sua constituição

Materiais lignocelulósicos são formados por um emaranhado de biopolímeros de estruturas cristalinas e amorfas compostas de três frações principais (Figura 2). A mais abundante é a celulose, um homopolissacarídeo linear, formado por unidades de glicose fortemente ligadas. Uma fração, denominada hemicelulose, constituída por diversos açúcares, principalmente por xilose, está configurada em uma cadeia facilmente hidrolisável.

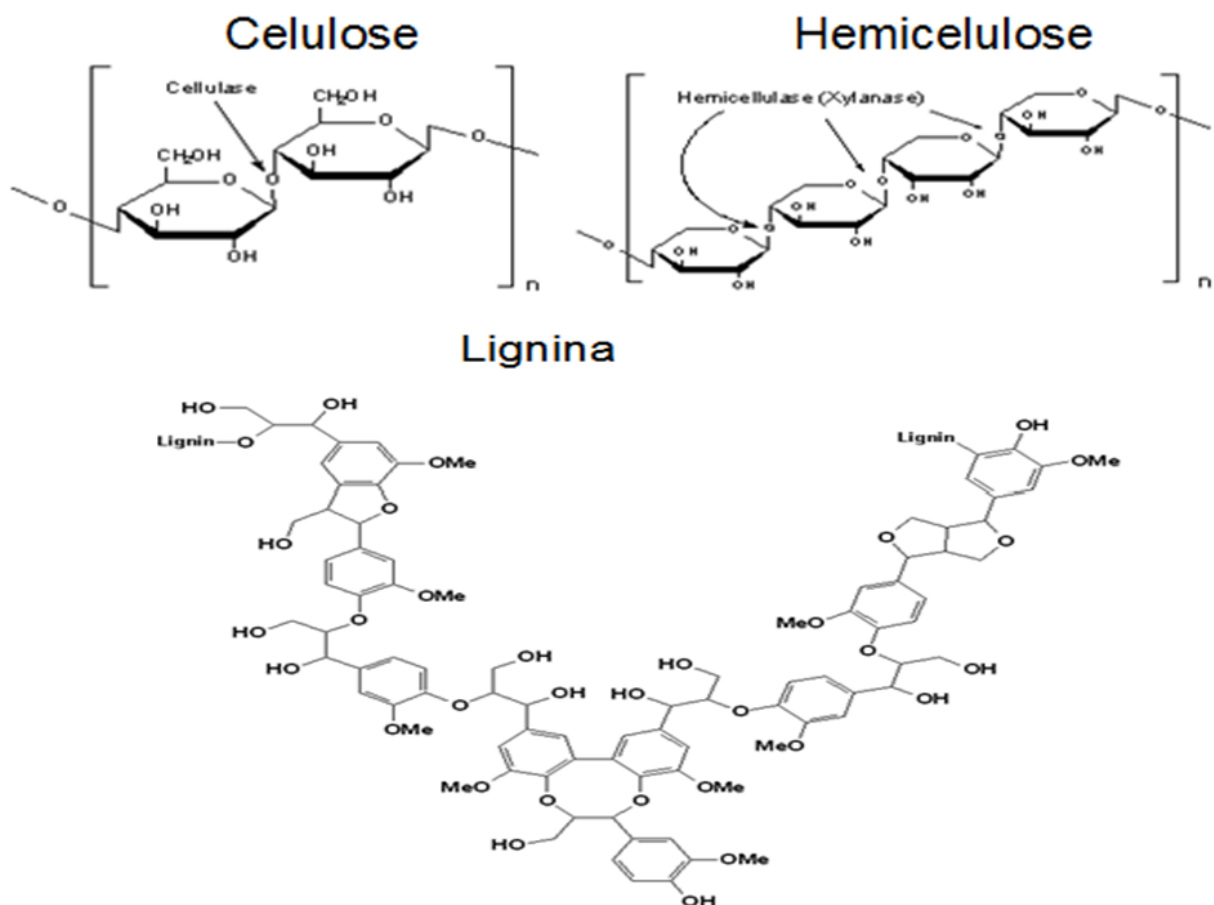


Figura 2. Estrutura química dos materiais lignocelulósicos [30].

Por último, encontra-se uma série de álcoois aromáticos polimerizados, fração denominada Lignina, que, ligada à hemicelulose, envolve a celulose e a protege de ataques hidrolíticos, químicos ou enzimáticos [20].

Sua estrutura íntegra representa um obstáculo à ação de microrganismos, os quais não possuem a capacidade de assimilar agregados moleculares tão grandes.

A natureza e o homem se encarregaram de encontrar soluções para o problema, criando uma série de formas de desestruturar tais compostos, tornando-os acessíveis ao processo de transformação [1].

No entanto, consideráveis melhorias técnicas ainda são necessárias antes de se obter processos de produção de bioetanol eficientes e economicamente viáveis baseados em biomassas lignocelulósicas. Uma das maiores limitações ainda continua sendo o custo elevado e permanente de enzimas envolvidas na conversão da componente de celulose em açúcares fermentáveis [21]. Conseguir uma rápida e completa hidrólise de biomassa lignocelulósica a cargas baixas de proteínas ainda continua sendo um grande desafio técnico na comercialização de etanol proveniente de biomassa lignocelulósica [22]. A eficiência da sacarificação enzimática da celulose está correlacionada aos pré-tratamentos e a acessibilidade às microfibrilas.

A Figura 3 mostra um desenho esquemático das paredes estruturais da cana-de-açúcar e a posição das microfibrilas compostas por cadeias de biopolímeros a serem acessadas por enzimas celulolíticas durante o processo de hidrólise. O desempenho da hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar com coquetel enzimático normalmente atinge seu ponto de saturação após algumas horas. A saturação ocorre porque durante o curso de tempo de hidrólise a concentração de açúcares como a glucose e celobiose é mantida constante, pois os materiais residuais do processo são mais de 50% de sua massa inicial, isto ocorre devido à recalcitrância natural da biomassa [23].

Muitos artigos relataram estudos sobre a recalcitrância da biomassa da cana-de-açúcar, gerando diversos estudos referentes a diferentes tipos de pré-tratamentos [24,25]. No entanto, há uma lacuna entre os estudos relacionados com a recalcitrância da cana-de-açúcar e possíveis tipos de pré-tratamentos a partir de micro a nano escala, tornando-se necessária uma compreensão mais profunda da estrutura da celulose para saber qual tipo de pré-tratamento é mais eficiente para superar a recalcitrância natural dos materiais lignocelulósicos [26].

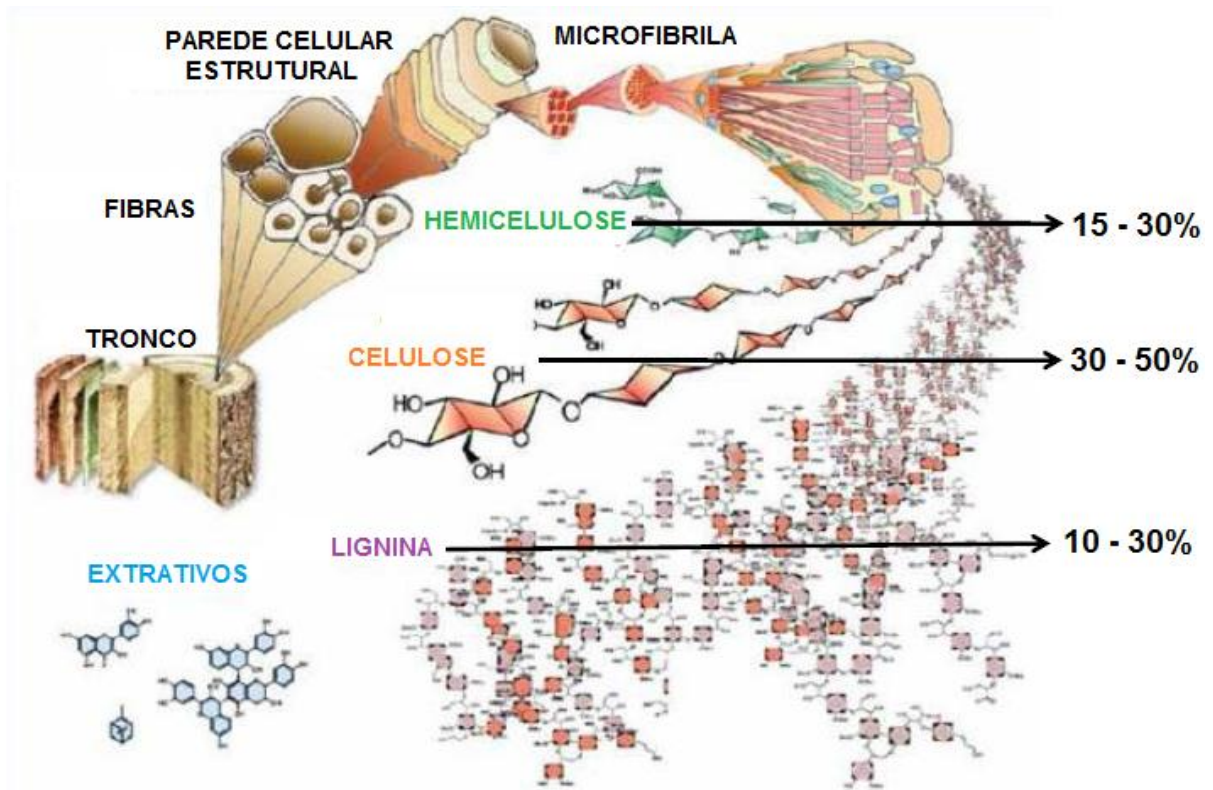


Figura 3. Estrutura do bagaço de cana-de-açúcar [27].

2.2.1. Celulose

A celulose, cuja estrutura química é representada na Figura 4, é o homopolissacarídeo mais abundante na natureza, sendo base estrutural das células das plantas. É uma das mais importantes substâncias naturais produzidas pelos organismos vivos e está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos. Seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99%.

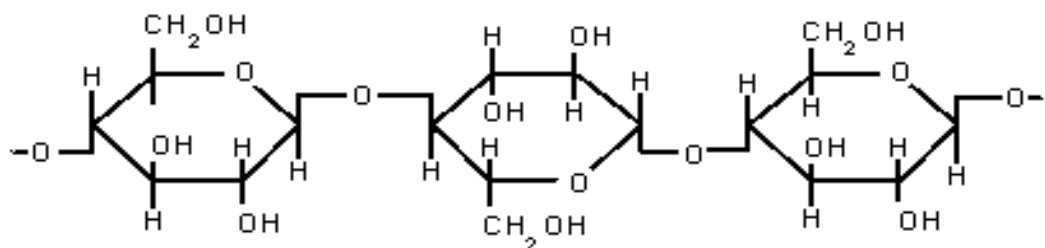


Figura 4. Representação da estrutura química da molécula de celulose.

O seu isolamento é fortemente influenciado pelas substâncias que acompanham a celulose na parede celular. Compostos como gorduras, ceras, proteínas e pectina (também conhecidos por extrativos) podem ser facilmente removidos por extração com solventes orgânicos e álcalis diluídos. Sua cadeia se constitui de unidades de anidroglicose, unidas por meio de ligações β -1, 4 – glicosídicas, resultando num polímero de alto peso molecular [28].

As cadeias de celulose nas paredes celulares das plantas são arranjadas compactamente, onde os grupos OH das moléculas de celulose são capazes de formar dois tipos de ligações de hidrogênio (Figura 5). Há ligações de hidrogênio entre unidades de glicose adjacente formando ligações intramoleculares, e ligações de hidrogênio entre unidades de glicose de cadeias de celulose adjacentes formando ligações intermoleculares. As interações intramoleculares são responsáveis por certa rigidez das cadeias unitárias e as ligações intermoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal [29].

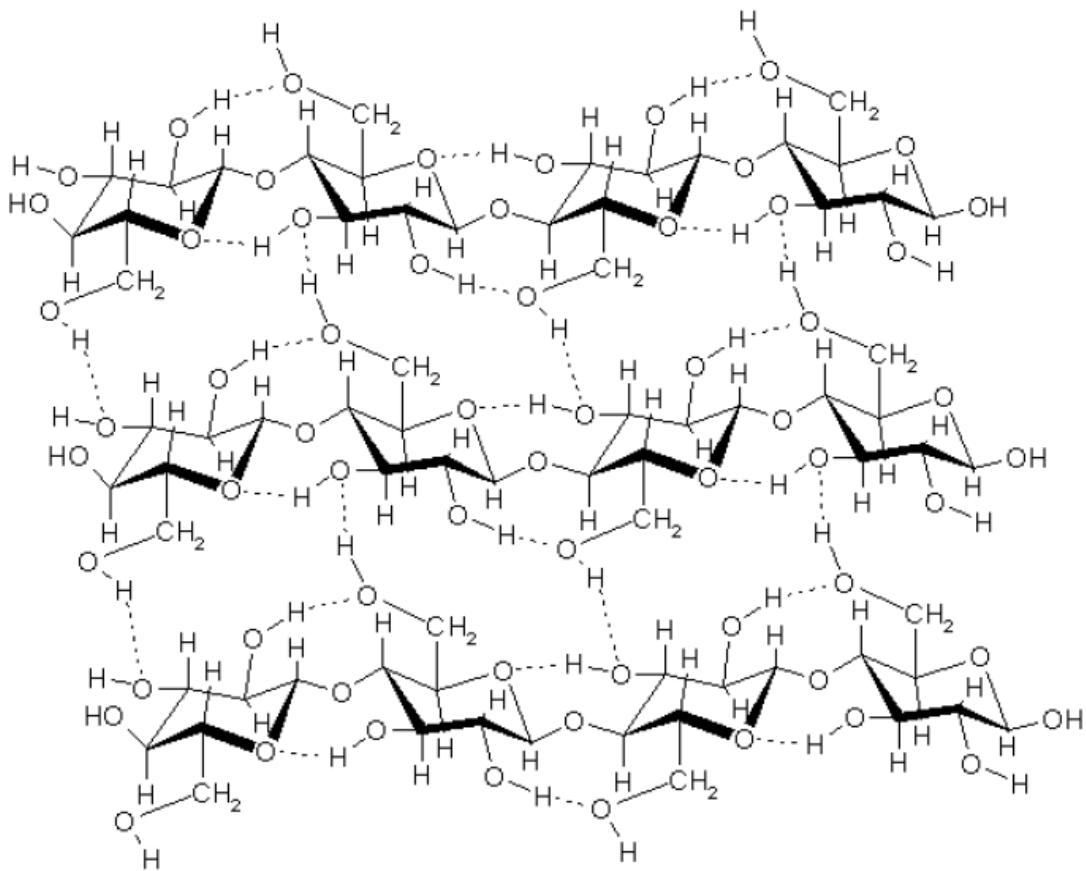


Figura 5. Ligações de hidrogênio intra e intermolecular na celulose.

Por esse polímero possuir uma tendência em formar ligações de hidrogênio, isto resulta numa forte interação entre suas moléculas, de maneira que as cadeias se unem formando feixes que apresentam regiões nitidamente cristalinas, além de regiões amorfas. Essas duas estruturas, cristalina e amorfa, apresentam diferenças quando se trata da digestibilidade da biomassa mediante ataque enzimático [30]. A degradação da celulose cristalina é muito lenta quando comparada à porção amorfa, por isto, a degradação é iniciada nas partes amorfas, já que são mais susceptíveis de serem hidrolisadas.

Os processos de dissolução da celulose começam com a degradação das fibras e estruturas fibrilares e resulta na completa desintegração modificando o comprimento das cadeias [22]. A degradação da estrutura supramolecular pode ocorrer pela inserção de grupos químicos que efetuam a quebra das ligações intermoleculares e solvatação das moléculas deslocadas da cadeia [20].

Pelo fato da celulose responder isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera, ela é considerada a fonte mais abundante deste elemento base dos componentes orgânicos. A principal vantagem da celulose quando comparada com derivados de petróleo, por exemplo, é sua grande disponibilidade, uma vez que ela provém de matéria-prima renovável.

2.2.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo estrutural ramificado, heteropolímero, complexo, com peso molecular mais baixo que o da celulose, varia entre 25.000 a 35.000. Estão associadas à celulose e a lignina nos tecidos vegetais e também é o segundo polissacarídeo natural mais abundante depois da celulose.

A hemicelulose é amorfa em seu estado natural e se difere da celulose pela composição de várias unidades de açúcar, com cadeias moleculares menores e ramificadas. Enquanto a celulose, como substância química, contém exclusivamente a *D*-glicose como unidade fundamental, a hemicelulose são polímeros, cuja composição pode aparecer condensada em proporções variadas, as seguintes unidades de açúcar: β -*D*-xilose, β -*D*-manose, β -*D*-glicose, α -*L*-arabinose, α -*D*-galactose, ácido β -*D*-glicourônico, β -*D*-galactourônico e ácido α -*D*-4-

metilglicourônico, os quais são polímeros complexos que, juntos, conferem resistência aos materiais lignocelulósicos [31]. A estrutura da hemicelulose confere propriedades biofísicas e biomecânicas sobre os tecidos vegetais, como também sobre os produtos provenientes destes tecidos. Esta estrutura compreende cerca de um quarto a um terço dos materiais vegetais, variando esta proporção conforme as espécies [32]. As hemiceluloses são frações não homogêneas e definidas como um material solúvel alcalino. As estruturas principais estão representadas na Figura 6.

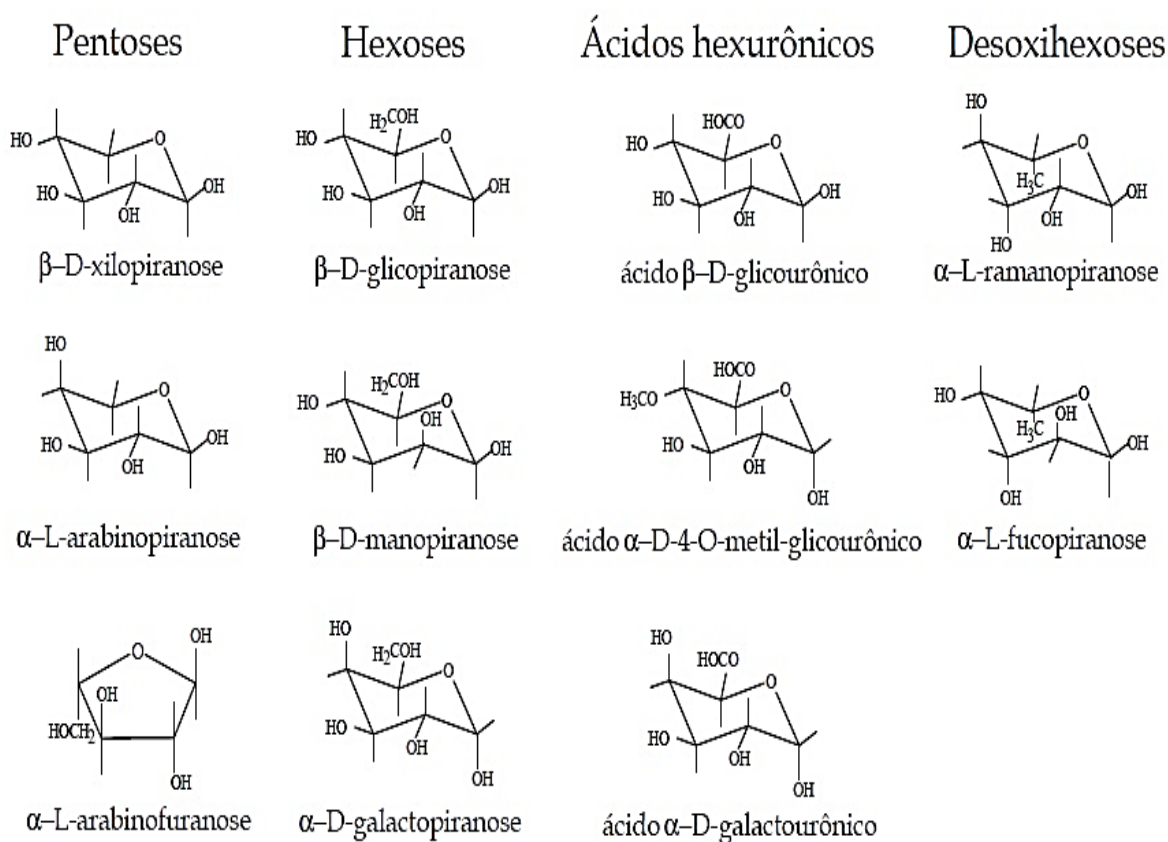


Figura 6. Açúcares componentes das hemiceluloses [34].

Como mostrado na Figura 6, algumas das unidades de açúcares que compõem a hemicelulose possuem cinco átomos de carbono, sendo denominadas pentoses, outras possuem seis átomos de carbono denominadas hexoses. Os polímeros formados pela condensação de pentoses e hexoses são chamados de pentosanas e hexosanas respectivamente. As hemiceluloses não são, portanto, um composto químico definido, mas, sim, uma classe de compostos poliméricos presentes em

vegetais fibrosos, possuindo cada uma destes componentes propriedades características.

Madeiras folhosas (eucalipto) e coníferas (pinheiros) diferem não só na porcentagem do total de hemiceluloses, mas, também, na porcentagem individual de cada açúcar que compõem as hemiceluloses. Coníferas possuem uma maior proporção de unidades de manose e galactose, quando comparado às folhosas. Essas, por sua vez, apresentam uma maior proporção de unidades de xilose e grupos acetila que é encontrado em coníferas.

A celulose e hemicelulose apresentam algumas diferenças e, como já citado, a celulose é formada por unidades de glicose. Já as hemiceluloses têm várias unidades de diferentes açúcares como pentoses, hexoses, ácidos-hexurônicos e deoxi-hexoses. Esses açúcares formam polímeros mais curtos e ramificados. Outra diferença importante é que a hemicelulose é mais facilmente hidrolisada, uma vez que sua estrutura ramificada diminui as energias de ligações e a cristalinidade do material.

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27%, quando passam por um processo de pré-tratamento normalmente a sua degradação leva a formação de novos produtos como os açúcares pentoses e hexoses, ácidos de açúcar, ácidos alifáticos (ácido acético, fórmico e levulínico), e furano aldeídos (5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural), (Figura 7), [33]. Após passar pelo processo de hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, e uma parte menor pode ser degradada em fenóis e outros compostos aromáticos [33, 34]. O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose [30].

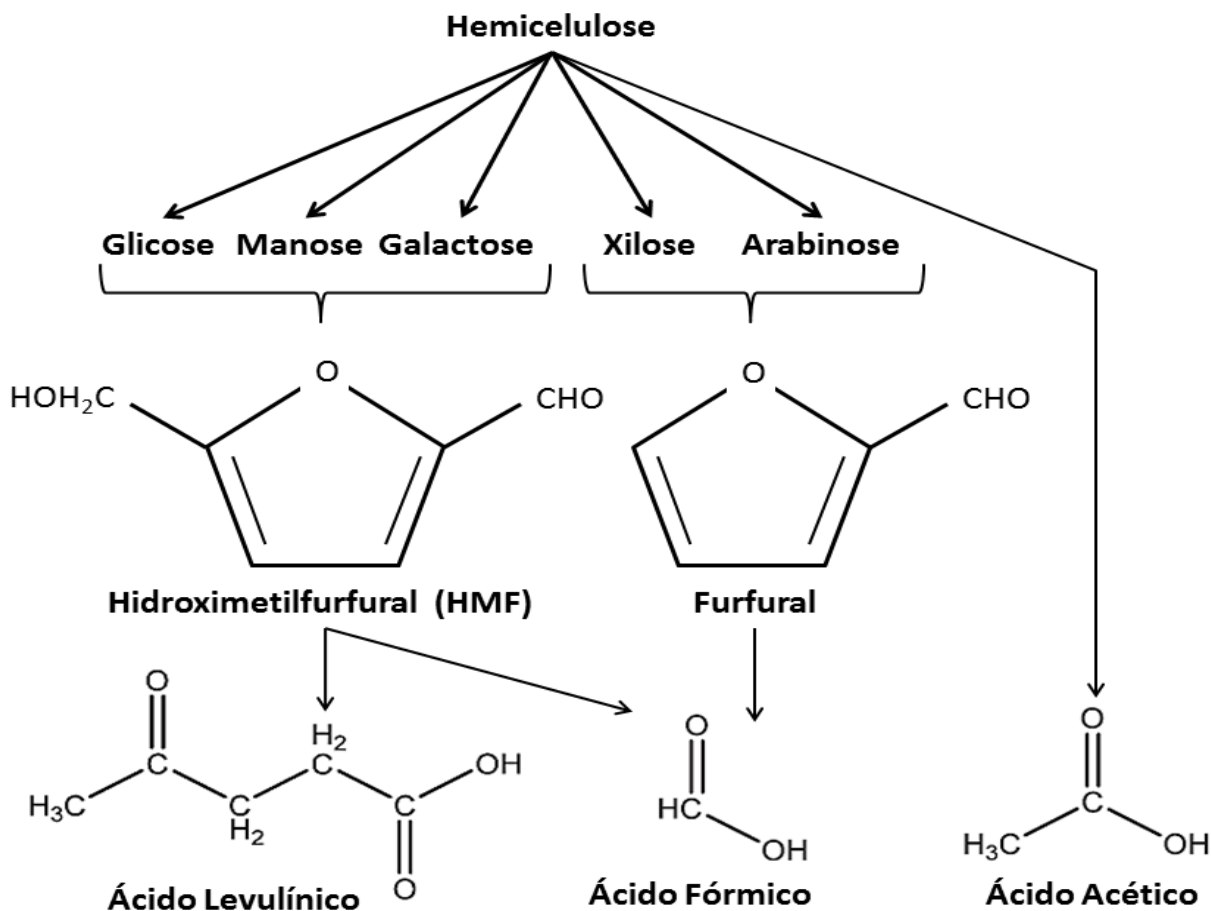


Figura 7. Formação de compostos a partir da hemicelulose após os processos de pré-tratamento e hidrólise ácida (adaptado de [33]).

2.2.3. Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades do polímero fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa. A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico [35].

Diferentemente da celulose e hemicelulose, sua estrutura não pode ser representada por uma combinação de unidades monoméricas ligadas pelo mesmo tipo de ligação química. São formadas por moléculas de massa molar elevada que atuam como suportes para as fibras de celulose e também são constituídas por unidades básicas guaiacil e sinapil que podem ser observadas na Figura 8.

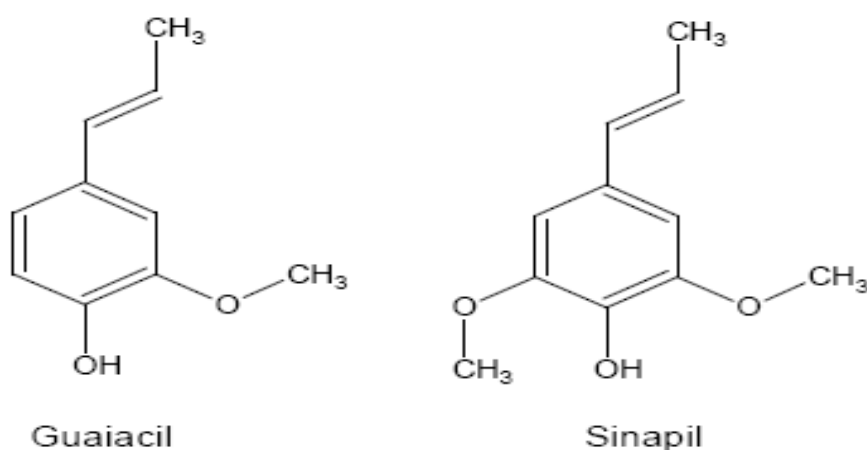


Figura 8. Unidades básicas de lignina.

A presença da lignina nos materiais lignocelulósicos representa o principal interferente para o processo de conversão da biomassa, já que é uma substância que atua como uma barreira. Essa estrutura, juntamente com a celulose, apresenta-se como uma molécula capaz de fornecer rigidez às plantas, sendo que a lignina apresenta grande resistência ao ataque de microrganismos comuns [36].

Pesquisas evidenciam que quanto maior a remoção da lignina maior será a digestibilidade da biomassa, entretanto, a extensão da deslignificação é diferenciada dependendo da origem do substrato [23].

A degradação da lignina envolve múltiplas reações bioquímicas que ocorrem simultaneamente. Rupturas das ligações, hidroxilações e demetilações, dentre outras reações, devem acontecer para que essa estrutura seja perturbada [37,38,39]. A seguir, tem-se a Figura 9, demonstrando a complexidade dessa estrutura.

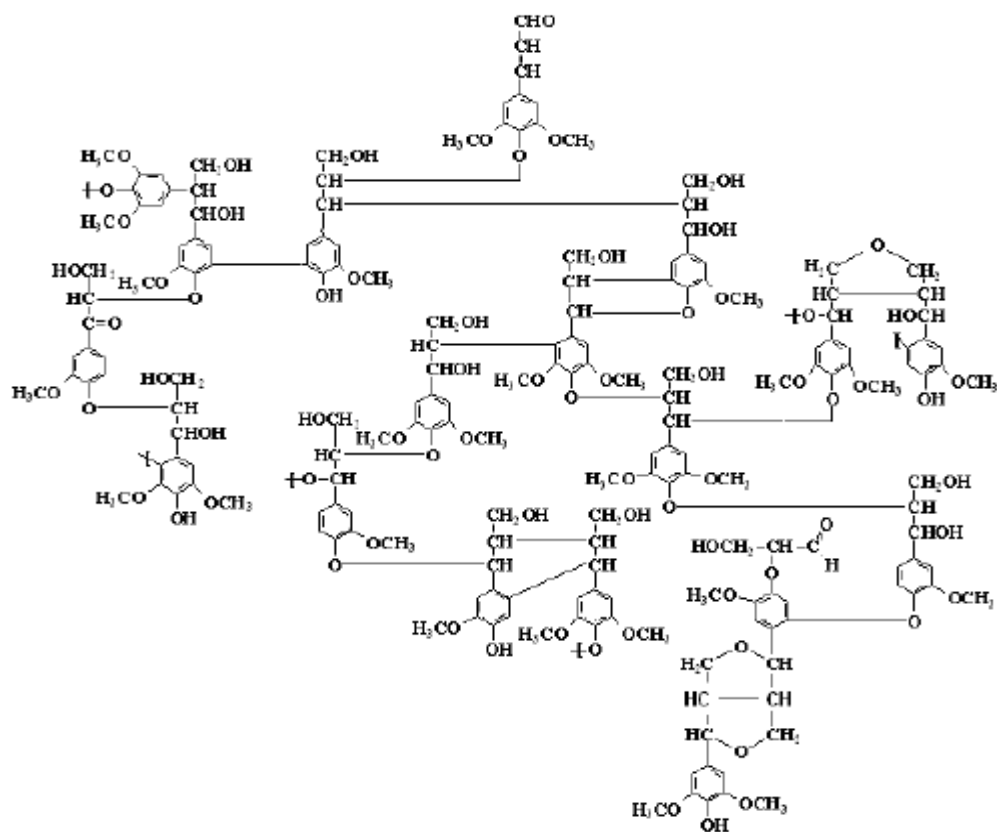


Figura 9. Estrutura de lignina de *Fagus* sp [3030].

A lignina é insolúvel em água, tem características de um termoplástico fundido e é empregada como fonte de energia [40]. Eletricidade e calor podem ser produzidos pela queima da lignina para auxiliar o setor sucroalcooleiro na produção de etanol, o que pode aumentar a eficiência energética de todo o sistema. Tem sido empregado na produção de resinas fenólicas [40,41], suprimento animal [42], adesivos [41] e estabilizante para plásticos e borrachas [43] dentre outras aplicações.

A concentração de lignina e sua distribuição na biomassa podem ser analisadas por meio de microscopia ultravioleta. Sua máxima absorção é em 212 e 280 nm e nenhum outro componente de grande ocorrência presente na madeira absorve no UV com as mesmas propriedades [44].

2.3. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar representa a principal biomassa utilizada em países tropicais, principalmente por ser um material de grande disponibilidade em destilarias sem custo adicional, além de apresentar alto teor de carboidrato e baixo de lignina. Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, o bagaço tem grande potencial para gerar etanol combustível e outros produtos.

É um material não homogêneo, contém a maior parte do material fibroso presente na cana e é obtido durante processo de moagem da cana-de-açúcar como resíduo após a extração do caldo nas moendas. Sua composição química depende da variedade da cana-de-açúcar, tipo de solo, técnicas de colheita e manuseio [19].

Por se tratar de um material lignocelulósico, é constituído por lignina, celulose e hemicelulose, sendo que a lignina impede a hidrólise das camadas mais internas. Quimicamente, o bagaço apresenta aproximadamente 50% de α -celulose, 30% de pentoses e 2,4% de cinzas. Comparando-se o seu teor de cinzas com o de outros resíduos de colheita como casca de arroz e palha de trigo, que apresentam teor de cinzas de 17,5 e 11%, respectivamente, o bagaço de cana apresenta vantagens para sua bioconversão [45, 8]. Apresenta baixa densidade e, por ser muito fibroso, é difícil tratá-lo como um sólido. Não é um material corrosivo, mas contém areia, decorrente da colheita da cana e, por este motivo, pode ser abrasivo. O bagaço úmido tem teor de umidade em torno de 50 g água/100 g bagaço, mas, dependendo das condições de manuseio, pode variar na faixa de 47 a 55 g/100 g bagaço [19].

Sua composição e estrutura morfológica variam de acordo com procedimentos empregados no campo de cultivo da cana-de-açúcar como tipo de solo, variedade da cana, técnica de colheita e manuseio com maior ou menor arraste de terra, areia e resíduo vegetal e emprego ou não da queima da cana. Seu armazenamento também é um fator determinante no aspecto do bagaço [46]. Segundo Liu et al. (2007), aproximadamente 54 milhões de toneladas são produzidas anualmente no mundo. O processamento do bagaço é vantajoso, pois os custos da colheita e da lavagem deste material já estão incluídos no processo de extração do açúcar [47].

Sua estocagem gera uma ação microbiológica de fermentação exotérmica, dada à presença de açúcar residual e umidade, além de haver possibilidade de ocorrer

combustão espontânea [46]. A Tabela 2 demonstra a composição média do bagaço de cana-de-açúcar, englobando aspectos químicos e físicos.

Tabela 2. Composição média do bagaço de cana-de-açúcar [46, 48].

Composição Química Média	%
Carbono	39,7 – 49,0
Oxigênio	40,0 – 46,0
Hidrogênio	5,5 – 7,4
Nitrogênio e Cinzas	0,0 – 0,3
Propriedades físico-químicas	
Umidade	50,0
Fibras	46,0
Brix	2,0
Impurezas minerais	
Composição média da fibra do bagaço	
Celulose	26,6 – 54,3
Hemicelulose	14,3 – 24,4
Lignina	22,7 – 29,7

A utilização do bagaço como as demais biomassas, pode ocorrer de diferentes formas. Pode ser queimado para produzir calor ou eletricidade ou, ainda, pode ser convertido em combustíveis através de fermentação. Para se produzir etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, uma transformação deve ser feita: conversão de celulose e hemicelulose em seus monômeros constituintes (glicose e xilose) e posterior conversão destes monômeros por meio da ação de microrganismos. As características estruturais do bagaço e demais substratos têm sido divididas em dois grupos e classificadas como físicas ou químicas. As químicas englobam a porcentagem da celulose, hemicelulose e lignina. As físicas consistem na acessibilidade da área superficial, cristalinidade, dureza, abrasividade, distribuição

física da lignina na biomassa, grau de polimerização, volume dos poros e tamanho da partícula da biomassa (fibras, agulhas e medula).

2.3.1. Características

Uma das características quando se trata de bagaço, dentre outras biomassas, é a sua cristalinidade. O grau de cristalinidade da biomassa lignocelulósica é considerado um fator importante para influenciar o andamento da hidrólise. O índice de cristalinidade, para materiais lignocelulósicos, tem como função medir a quantidade de celulose cristalina relativa em todo o substrato. Segundo Chang e Holtzaple (2000), após pré-tratamento, o índice de cristalinidade pode sofrer diminuição [49].

Sabe-se que, primeiramente, a região amorfa da celulose é hidrolisada, resultando em acumulação de celulose cristalina, fazendo com que seja mais difícil hidrolisar o material. Em grande parte dos estudos que estabeleceram uma correlação entre cristalinidade e hidrólise foram utilizados substratos de celulose pura, que muito provavelmente não representam de maneira real um material lignocelulósico, já que se trata de um substrato heterogêneo, ao contrário da celulose pura, que é um material homogêneo [50].

Sabe-se também que o tamanho das partículas da biomassa, mesmo as partículas exageradamente grandes, não tem efeito sobre as conversões enzimáticas do bagaço [51].

Alguns autores relatam diminuições na área superficial acessível de produtos da hidrólise sem afetar significativamente a cristalinidade, ao passo que outros dizem que diminuições na cristalinidade ocorrem quando há também aumento na área superficial acessível durante a hidrólise. A discrepância nos conceitos na alteração ou não da cristalinidade do substrato pode ser atribuída às variações em sua constituição e às técnicas utilizadas para a sua caracterização [52, 53].

Outro fator importante, quando se fala em biomassa como o bagaço, é a sua digestibilidade. Estudos mostraram que pode ser afetada diretamente por conta de área superficial acessível da biomassa. Gharpuray et al. (1983) e Sinitsyn et al. (1991) determinaram que a área superficial específica fosse um dos fatores limitantes da hidrólise enzimática [54].

Mesmo se um alto teor de enzima for utilizado, a digestibilidade enzimática da celulose em biomassa nativa é baixa (< 20%). Isso se deve às características estruturais da biomassa lignocelulósica, que é um complexo de polímeros de carboidratos e lignina [55]. Em contrapartida, outros estudos mostram resultados conflitantes quando se trata do efeito da área superficial acessível na digestibilidade da biomassa [56]. As divergências referentes à digestibilidade da biomassa são ocasionadas por existir diferentes métodos utilizados para determinar a área superficial do material que se deseja estudar [57]. Sabe-se que a digestibilidade do bagaço, dentre outros substratos, é alterada quando este material passa por um processo denominado pré-tratamento. Na seção a seguir serão destacados alguns tipos de pré-tratamentos utilizados, os quais facilitam processos posteriores destinados à produção de etanol.

2.3.2 Pré-tratamentos

Para converter carboidratos em etanol, estes polímeros devem ser quebrados em açúcares de menor peso molecular, basicamente monômeros, antes que microrganismos empregados na fermentação entrem em contato com o material. Entretanto, a biomassa lignocelulósica, em geral, é resistente à ação da enzima celulase devido a: sua cristalinidade, presença de lignina, hemicelulose, área superficial inacessível e caráter heterogêneo das partículas da biomassa. Por esse motivo, pré-tratamentos são utilizados com o objetivo de alterar a matriz lignocelulósica da biomassa, com aumento da porosidade do material, redução da cristalinidade e, conseqüentemente, aumento da digestibilidade da celulose, tornando-a mais acessível para o ataque enzimático.

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo de conversão de biomassa a açúcares fermentescíveis [45, 58]. A Figura 10 mostra como o pré-tratamento atua sobre os materiais lignocelulósicos.

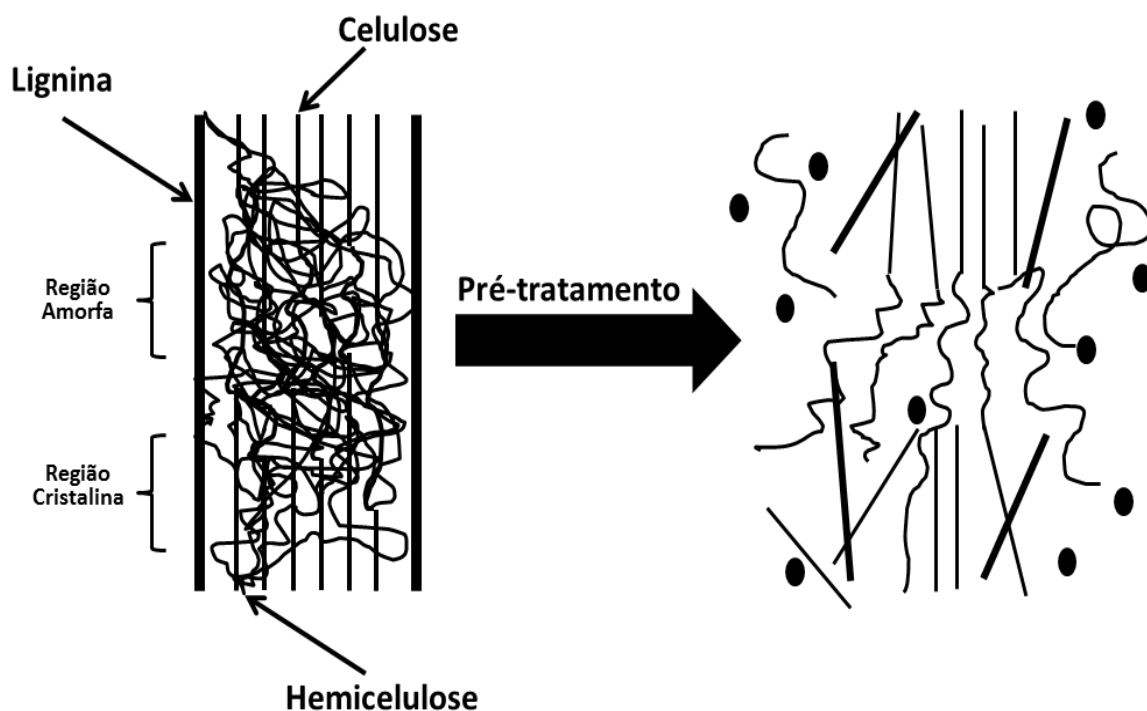


Figura 10. Esquema da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de [58]).

Um pré-tratamento eficaz e económico deve satisfazer os seguintes requisitos: (a) produção de fibras celulósicas acessíveis para ataque enzimático; (b) evitar a destruição da hemicelulose e celulose; (c) evitar a formação de possíveis inibidores de enzimas hidrolíticas e microrganismos de fermentação; (d) minimizar o consumo de energia; (e) reduzir o custo da redução de tamanho de matérias-primas; (f) redução do custo de materiais para a construção de reatores de pré-tratamento; (g) produzir menos resíduos; (h) consumo de pouco ou nenhum produto químico [59].

Os métodos de pré-tratamento podem ser divididos em diferentes categorias: físicos (moagem e trituração), pirólise, físico-químicas (pré-tratamento a vapor / auto-hidrólise, hidro-termólise, e oxidação), químicos (ácido, álcali diluído, agentes oxidantes, e solventes orgânicos), biológico, elétrico, ou uma combinação destes [60]. Esses métodos estão apresentados a seguir:

2.3.2.1. Pré-tratamento Físico/Mecânico

As duas tecnologias de pré-tratamento físico/mecânico que seguem abaixo são exemplos dos processos mais comuns utilizados para produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica.

Trituração: a trituração de materiais lignocelulósicos através de uma combinação de estilhaçamento, trituração e/ou de moagem pode ser aplicado para reduzir a cristalinidade de celulose. O tamanho dos materiais é geralmente 10-30 mm depois de estilhaçamento e 0,2-2 mm após moagem ou trituração [20].

Moagem: o uso de moinho de bolas vibratório foi considerado mais eficaz do que a moagem normal na redução da cristalinidade da celulose e de aumento da sua digestibilidade [61]. O tamanho final da partícula e as características da biomassa determinam a potência necessária para trituração mecânica dos materiais agrícolas [62]. O consumo de energia para a redução do tamanho de madeira dura e de resíduos agrícolas, em função do tamanho de partícula final e o índice de fragmentação (redução de tamanho) foi quantificada por Cadoche et al. (1979) que propôs que, se o tamanho das partículas finais são mantidas a faixa de 3 -6 mm, a energia utilizada para a pulverização pode ser mantida abaixo de 30 kWh por tonelada de biomassa. O consumo de energia é mais elevado do que o teor de energia teórica disponíveis na biomassa, na maioria dos casos. A irradiação de celulose por raios γ , que leva à clivagem da β -1,4-glicosídicas e oferece uma área de superfície maior e uma menor cristalinidade, também tem sido testada [63]. Este método é muito mais caro, no entanto, pode ser utilizado em processos de grande escala [64].

2.3.2.2. Pré-tratamento físico/químico (explosão a vapor)

Explosão a vapor é o método mais comumente utilizado para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos [65]. Nesse método, a biomassa é tratada com alta pressão de vapor saturado, e, em seguida, a pressão é subitamente reduzida, o que faz com que os materiais submetidos a uma descompressão explosiva. Explosão a

vapor é tipicamente iniciada a uma temperatura de 160-260°C (pressão correspondente, 0,69-4,83 MPa) durante alguns segundos a alguns minutos, antes de o material ser exposto à pressão atmosférica [20]. A mistura de biomassa / vapor é mantida durante um período de tempo para promover a hidrólise da hemicelulose, e o processo é finalizado por uma descompressão explosiva. O processo provoca a degradação da hemicelulose e a transformação lignina devido à temperatura elevada, aumentando assim o potencial de hidrólise da celulose. A hemicelulose é hidrolisada por ácidos acéticos liberados durante o pré-tratamento de explosão a vapor. Grous et al. relataram que a eficiência de 90% da hidrólise enzimática foi atingido em 24 horas para biomassas pré-tratadas por explosão de vapor, em comparação com apenas 15% de hidrólise de biomassa não tratada [66]. Acredita-se que a remoção das hemiceluloses das microfibrilas expõe a superfície da celulose e aumenta a acessibilidade da enzima para nas microfibrilas de celulose [67]. A lignina é removida apenas numa extensão limitada, durante o pré-tratamento, mas é redistribuída sobre as superfícies das fibras, como resultado de reações de fusão e de despolimerização / repolimerização [68]. O afastamento e da redistribuição de hemicelulose e lignina aumenta o volume da amostra pré-tratada. A exposição rápida e intermitente a pressão atmosférica em um fluxo turbulento causa a fragmentação do material, aumentando, assim, a área de superfície acessível [69]. Dependendo da intensidade do pré-tratamento, alguma degradação da celulose em glicose pode acontecer [70].

2.3.2.3. Explosão de fibra com amoníaco

Explosão de fibra com amoníaco (*Ammonia Fiber Explosion (AFEX)*) é um processo de pré-tratamento físico-químico em que a biomassa lignocelulósica é exposta ao amoníaco líquido à temperatura e pressão elevadas durante um período de tempo e, em seguida, a pressão é subitamente reduzida. O processo AFEX é muito semelhante à explosão a vapor e trata-se da dosagem de amoníaco líquido entre 1-2 kg de amoníaco / kg de biomassa seca, a temperatura é de 90 ° C, e o tempo de permanência são de 30 min. O pré-tratamento AFEX pode melhorar significativamente a taxa de fermentação de biomassas diversas. A tecnologia AFEX

tem sido utilizada para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, incluindo alfafa, palha de trigo, entre outros tipos [71]. Durante o pré-tratamento de apenas uma pequena quantidade do material sólido é solubilizado, isto é, é removido quase sem hemicelulose ou lignina. A hemicelulose é degradada em açúcares oligoméricos e desacetilados, que é provavelmente o motivo pelo qual a hemicelulose não se torna solúvel [72]. A estrutura do material é alterada, o que resulta no aumento da capacidade de absorver água, tendo uma maior digestibilidade [64]. O tratamento se mostra eficaz com amostras de baixo teor de lignina, no entanto, o processo não foi muito eficaz para biomassa com maiores teores tais como madeiras e cascas de nozes.

2.3.2.4. Explosão com dióxido de carbono.

Em tentativas para desenvolver técnicas melhoradas de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica, surgiu ideia de utilizar explosão supercrítica de CO₂, o que teria uma temperatura inferior à explosão de vapor e, eventualmente, um custo reduzido em relação a uma explosão de amoníaco. Nesse processo um fluido supercrítico refere-se a um fluido que está na forma gasosa, mas é comprimido a temperaturas acima do seu ponto crítico a uma densidade de líquido. Postula-se que o dióxido de carbono forma ácido carbônico, quando dissolvido em água, o ácido aumenta a taxa de hidrólise. Moléculas de dióxido de carbono são de dimensão comparável à água e amônia e deve ser capaz de penetrar os poros acessíveis a pequenas moléculas de água e amoníaco. O dióxido de carbono foi sugerido para ser útil na hidrólise da hemicelulose, assim como a celulose. Além disso, a baixa temperatura evita a decomposição de monossacáridos pelo ácido. Após uma libertação de pressão explosiva de dióxido de carbono, a disrupção da estrutura celulósica aumenta a área de superfície acessível do substrato para a hidrólise. Dale et al.(1982) utilizaram esse método de pré-tratamento para tratar alfafa (4 kg de CO₂/kg de fibra a uma pressão de 5,62 MPa) e obtiveram 75% de glucose liberada durante 24 horas da hidrólise enzimática [73]. Os rendimentos foram relativamente baixos em comparação com os de pré-tratamentos a vapor de amônia ou de explosão, mas elevadas em comparação com a da hidrólise enzimática, sem pré-

tratamento. Zheng et al.(1998) fizeram comparações entre os métodos de explosão CO₂, explosão a vapor e explosão de amônia para pré-tratamento de uma mistura de papel reciclado, bagaço de cana, resíduos de papel reciclado e descobriram que a explosão de CO₂ foi mais rentável do que a explosão de amônia [74]. Além disso, não causou a formação de compostos inibitórios que poderiam ocorrer em explosão de vapor. Um aumento rápido da pressão facilitou a penetração das moléculas de CO₂ nas estruturas cristalinas, produzindo mais glucose após a explosão; pois a explosão de CO₂ é operada a temperaturas baixas, que não causa degradação dos açúcares, tais como a degradação de açúcares observada com explosão a vapor, devido à alta temperatura envolvida.

2.3.2.5. Peróxido de hidrogênio alcalino

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é um pré-tratamento químico. Como tal, tem como finalidade remover a lignina presente nos materiais lignocelulósicos, mas sem afetar a cadeia celulósica. Sabe-se que pré-tratamentos oxidativos degradam ou removem mais lignina que um pré-tratamento alcalino. Quando se fala em pré-tratamento com peróxido, tem-se um tratamento que engloba tanto aspecto alcalino quanto oxidativo e apresenta a capacidade de remover, aproximadamente, metade da lignina presente no material em que é aplicado [75].

Segundo Azzam (1989), cerca de 50% da lignina e da hemicelulose do bagaço de cana podem ser solubilizados com 2% de peróxido de hidrogênio a 30°C no decorrer de 8 h [76]. Na etapa seguinte, quando empregada sacarificação pela ação da celulase a 45°C durante 24 h, obtêm-se 95% de eficiência na produção de glucose a partir da celulose. Isso demonstra que o pré-tratamento oxidativo pode ser um meio eficiente quando se deseja quebrar as cadeias lignocelulósicas, visando às etapas posteriores de hidrólise e fermentação.

Outros trabalhos também tratam da aplicação do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio. Segundo Gould (1984), cerca de metade da lignina e grande quantidade de hemicelulose de materiais lignocelulósicos, como palha e outros resíduos de agricultura, foram solubilizados quando aplicado pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino com concentração de 1% (v/v) e pH ajustado em

11,5, a uma temperatura ajustada de 25°C por um período de 18 às 24h, obtendo-se rendimento em glicose de 100% [77]. Krishna et al.(1998) obtiveram resultados satisfatórios quando folhas de cana-de-açúcar foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio alcalino [78]. Esse estudo resultou em rendimento de 92% na hidrólise de substrato pré-tratado a 50 °C e pH 4,5, utilizando-se celulase de *Trichoderma reesei* à 40 FPU/g substrato em 48h. No trabalho de Rabelo (2007), o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com peróxido de hidrogênio com concentração de 7,355% (v/v) e pH ajustado em 11,5, temperatura de 25°C e tempo de reação de 1h, sendo possível obter resultados com rendimento de 84,07% [35].

2.3.2.6. Ozonólise como pré-tratamento

O tratamento com ozônio é uma forma de reduzir o teor de lignina de resíduos lignocelulósicos. Isso resulta em um aumento da digestibilidade *in vitro* do material tratado, e ao contrário de outros tratamentos químicos, ele não produz resíduos tóxicos. O ozônio pode ser utilizado para degradar lignina e hemicelulose, em muitos materiais lignocelulósicos, tais como palha de trigo [79], o bagaço, o verde de feno, amendoim de pinho [29], palha e algodão [80]. A degradação é principalmente limitada a lignina. Hemicelulose é um pouco afetada, mas a celulose não é. A taxa de hidrólise enzimática aumentada por um fator de 5 a 60% após a remoção da lignina da palha de trigo usando o pré-tratamento por ozonização. O rendimento da hidrólise enzimática aumentou de 0% a 57% e a porcentagem de lignina diminuiu de 29% para 8%, após pré-tratamento de ozonólise [81]. O pré-tratamento de ozonólise tem uma vantagem de que as reações são realizadas à temperatura ambiente e à pressão normal. Além disso, o fato de que o ozônio pode ser facilmente decomposto por meio de um leito catalítico, ou aumentando a temperatura significa que os processos podem ser desenvolvidos para minimizar a poluição ambiental [82]. Um inconveniente da ozonólise é que uma grande quantidade de ozônio é necessário, o que pode tornar o processo caro.

Embora todos estes tipos de pré-tratamentos tenham pontos fortes, eles não conseguem atender toda ou boa parte dos requisitos necessários para que seja um processo eficiente e com baixo custo operacional, tornando-se necessário o

desenvolvimento de um novo tipo de pré-tratamento, que preencha as necessidades exigidas nestes processos.

2.4. Plasma elétrico

Plasma é um gás parcialmente ionizado, podendo-se afirmar que se trata do quarto estado da matéria. O termo “ionizado” significa que pelo menos um elétron não está ligado a um átomo ou molécula, convertendo-os em íons carregados positivamente. Conforme a temperatura do ambiente aumenta, os átomos/moléculas começam a se tornar mais energéticos proporcionando a transformação da matéria na seguinte sequência: sólido, líquido, gás e, finalmente, plasma, justificando o termo quarto estado da matéria.

As cargas elétricas livres – elétrons e íons – fazem o plasma eletricamente condutivo (algumas vezes até mais que ouro e cobre), internamente interativo, e fortemente influenciável por campos eletromagnéticos.

O estado de plasma pode ocorrer naturalmente, mas também pode ser gerado pelo homem em laboratórios e indústrias, os quais podem ser utilizados em inúmeras aplicações, incluindo síntese de materiais, geração de energia (termonuclear controlada), lasers, lâmpadas fluorescentes, dentre outras.

O Plasma é normalmente obtido quando há energia suficiente das espécies do gás, maior que a energia de ionização, causando a partir de colisões, a ionização e produção de íons e elétrons. Paralelamente e simultaneamente a ionização ocorre o processo inverso, que é a recombinação de elétrons e íons de átomos neutros ou moléculas. Precisando também da excitação das espécies atômicas e moleculares.

Embora o plasma seja comumente produzido por descargas elétricas nos gases, ele também pode ser obtido em sólidos e líquidos, necessitando energia suficiente para sua vaporização e ionização. Em sólidos e líquidos pode-se obter plasma mediante altas concentrações de energias por meio de laser. No caso de plasma em meio gasoso ele pode ser gerado e sustentado por energia eletromagnética que pode ser obtida por diversas fontes, como: corrente contínua, corrente alternada, radiofrequência e micro-ondas.

Conforme sua taxa de ionização, o plasma pode ser classificado em quente ou frio. É definido plasma quente quando gás é quase totalmente ionizado como no sol (adquirindo temperaturas acima de 10^7 K) ou em reatores tokamak de fusão nuclear (temperaturas maiores que 10^8 K).

Já os plasmas frios, com menor grau de ionização e temperaturas mais baixas, se dividem em dois subtipos, plasma térmico e não térmico, diferenciando-se quanto ao equilíbrio térmico das espécies do gás [83].

2.4.1. Plasmas atmosféricos: descarga por barreira dielétrica

A descarga por barreira dielétrica (DBD) pode ser usada para produzir um grande volume de plasma não térmico à pressão atmosférica. Tais plasmas são fontes de espécies altamente reativas (radicais, ozônio, átomos e moléculas excitadas) que podem ser usadas no tratamento de superfícies poliméricas e lignocelulósicas, na redução catalítica de NO_x e CO_x em processos industriais, na oxidação de compostos orgânicos voláteis e na produção de ozônio [84, 85, 86]. Essas descargas têm demonstrado um grande potencial em aplicações industriais de larga escala, pois realizadas à pressão atmosférica, apresentam baixos custos de operação e manutenção, devido à ausência de sistemas de vácuo. Além disso, a presença de um dielétrico permite operar em altas tensões alternadas, sem a ocorrência de arcos, tal fato é consequência do acúmulo de cargas no dielétrico, originando dessa forma, um campo elétrico contrário ao estabelecimento da descarga em arco. Contrariamente à situação onde ocorre a descarga em arco, onde toda a energia se concentra num volume muito restrito, na configuração DBD, a energia é transferida na forma de microdescargas, distribuídas ao longo do volume inteiro do sistema [87]. Esse aspecto é extremamente atraente para a utilização dessa configuração no pré-tratamento de materiais.

2.4.2. Plasmas em líquidos e efeito sobre a biomassa

A configuração de plasma por DBD gera microdescargas por todo volume do reator, afetando toda a superfície das amostras a serem tratadas, mas no caso de materiais lignocelulósicos para obtenção de etanol segunda geração não é necessário apenas o tratamento superficial, mas, também, em sua estrutura interna. Para atingir o interior da biomassa é possível se utilizar uma solução líquida como meio de transporte das espécies reativas produzidas pelo plasma; neste caso, o plasma age como um catalisador iniciando as reações com a sua incidência na superfície do líquido presente, como mostrado na Figura 11.

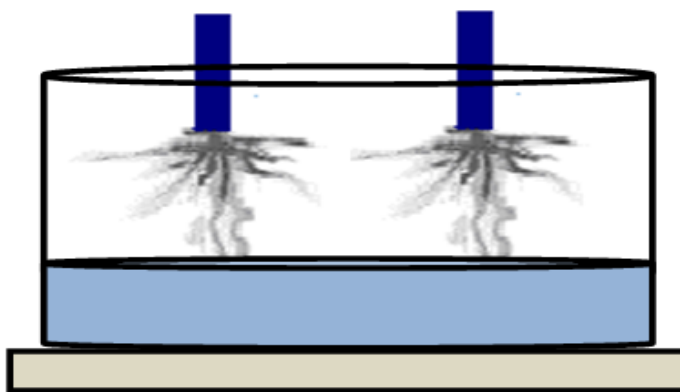


Figura 11. Representação das microdescargas na superfície do Líquido.

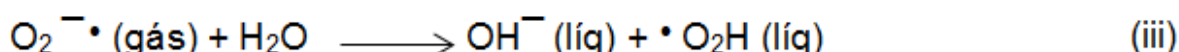
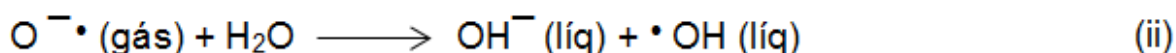
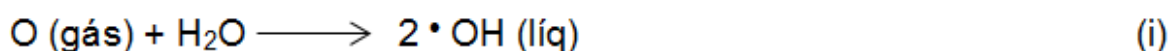
Uma vez que toda a biomassa estará submersa na solução líquida durante o processo, isto assegura a interação destas espécies reativas com o interior da biomassa e não apenas com a sua superfície, fazendo com que ocorra a remoção de lignina, hemicelulose diminuindo a cristalinidade da celulose e aumentando sua porosidade, e desta forma permite a biomassa restante sólida esteja mais acessível para as enzimas durante a hidrólise do material.

2.4.3. Reações decorrentes da incidência do plasma em meio líquido

Descargas elétricas geradas diretamente em líquido demonstram que iniciam uma variedade de efeitos químicos e físicos, incluindo alto campo elétrico, radiação

intensa de ultravioleta, ondas de choque de sobrepressão e, em particular, a formação de varias espécies químicas reativas como os radicais ($H\bullet$, $O\bullet$, $OH\bullet$) e espécies moleculares como (H_2O_2 , H_2 , O_2 , O_3) [88].

A produção dessas espécies químicas também foi demonstrada em descargas elétricas geradas na superfície do líquido. Essas espécies reativas e as condições físicas desse tipo de descarga demonstraram serem efetivas na degradação de componentes orgânicos e, também, na inativação de microrganismos [89]. As principais espécies reativas produzidas em descargas elétricas com incidência na superfície do líquido são: oxigênio atômico, radicais hidroxílicos e ozônio. Além de produzir íons positivos e negativos como: O_2^+ , H_3O^+ , O_2^- , O_3^- , e seus clusters com moléculas neutras de água e ar [90]. Quando a descarga é aplicada sobre a superfície de uma solução aquosa, é de esperar que estas espécies reativas se transfiram para o líquido, reagindo diretamente com materiais ou poluentes presentes no líquido, podendo produzir radicais secundários, como mostrado nas reações (i) - (iii) [91].



O ozônio também é conhecido por dar origem à produção de radicais OH, em água, em especial quando o pH da solução é básica.

2.5. Hidrólise de materiais lignocelulósicos

Desde o século XIX vem sendo estudado a produção de etanol pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósico. Porém, nos últimos anos os esforços para assegurar processos mais eficientes vêm aumentando e com ele o êxito na produção do etanol de segunda geração. Com este cenário promissor em um futuro muito próximo será possível produzir o etanol de segunda geração em quase todas

as regiões do mundo, podendo ser aproveitado a grande quantidade de resíduos orgânicos das mais diversas fontes tendo ainda como contrapartida a diminuição dos impactos ambientais causados por estes resíduos.

Existem duas diferentes técnicas de obtenção de açúcares fermentáveis a partir de biomassas lignocelulósicas que são: hidrólise ácida, que possui dois tipos onde uma utiliza ácido concentrado, o outro ácido diluído, e a hidrólise enzimática.

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (<100°C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais [92].

No processo com ácido diluído, partes da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Dessa forma, as condições de hidrólise, tanto para a hemicelulose quanto para a celulose, podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel são degradadas levando a uma inibição durante o processo de fermentação [93, 94, 95].

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada através das enzimas celulasas. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para atingir uma alta conversão da celulose são necessárias altas concentrações da enzima, o que aumenta o custo de produção [96].

3. Materiais e métodos

Os materiais e métodos estão discriminados da seguinte forma: matéria prima; preparação de amostras; separação de amostras; caracterização química do bagaço, teor de cinzas, determinação dos extrativos, Determinação da Lignina total e carboidratos, Reagentes, reator a plasma esquema elétrico, condições experimentais investigadas, metodologia do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e métodos de análise do material após o tratamento a plasma.

3.1. Matéria prima

O material utilizado no processo estudado neste trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar *in-natura*, denominado *lignocell 80*, proveniente da usina de Santa Rosa localizada na cidade de Boituva estado de São Paulo, fornecido pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE).

3.2. Preparação das amostras

Antes que a biomassa possa ser submetida ao processo de pré-tratamento, primeiramente, é necessário determinar sua massa seca, por meio do cálculo do teor de umidade, o qual foi determinado utilizando o procedimento padrão do National Renewable Energy Laboratory (NREL) denominado “Determination of Total Solids in Biomass” [97] e o procedimento executado por Rabelo (2010), [98].

Para o procedimento, foram utilizados béqueres de 100 mL que foram previamente secos a 105°C em uma estufa, deixados em um dessecador para esfriarem, posteriormente pesados em uma balança analítica (M1). As amostras foram pesadas utilizando os béqueres e suas massas foram anotadas (M2). As amostras foram levadas a uma estufa a 105°C onde permaneceram por 12 horas, após este período foram retiradas e colocadas em um dessecador para esfriarem. Os béqueres contendo o bagaço seco foram pesados tendo suas massas anotadas (M3).

$$\% \text{ umidade} = \left(1 - \left(\frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right) \right) \times 100 \quad (1)$$

M1: massa do béquer vazio, em gramas;

M2: massa do béquer + amostra úmida, em gramas;

M3: massa do béquer + amostra seca, em gramas.

3.2.1. Separação das amostras

Para garantir que todas as partes que compõem o bagaço fossem tratadas, foi necessário a homogeneização das amostras por meio de quarteamento (Figura 12). O quarteamento é o processo de redução da amostra em pequenas porções representativas da amostra inicial. Essa operação pode ser manual ou mecânica.

Uma das formas de se proceder ao quarteamento é:

- colocar a amostra em cima de uma superfície limpa, de modo que a amostra se disponha em forma de um cone;
- dividir o cone em partes iguais (geralmente 4 ou 8); e
- retirar metade das partes obtidas (uma sim, uma não), misturando-as e recomeçar o processo até se reduzir a amostra ao peso desejado, que neste caso foram de 10 gramas cada.



Figura 12. Amostras separadas após quarteamento.

3.2.2. Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

Os procedimentos para análise da composição química das amostras utilizadas neste trabalho, conforme relatadas a seguir, foram feitas pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), segundo protocolo do NREL.

Para a análise da composição química do bagaço de cana-de-açúcar, uma quantidade de cada amostra foi passada por moinho de facas até conseguir um material com partículas inferiores a 0,5 mm, que foram selecionadas através de uma peneira de 20 mesh. Partículas retidas na peneira eram novamente moídas para que a composição química do material não fosse alterada.

Após a moagem dos materiais e separação granulométrica, estes foram analisados quanto ao teor de cinzas, extrativos, lignina total (lignina solúvel e lignina insolúvel), celulose e hemicelulose [99].

3.2.2.1. Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas na biomassa, foi utilizado como base o procedimento padrão do NREL denominado “*Determination of Ash in Biomass*” [100] e no procedimento executado por Rabelo (2010), [98].

Para o procedimento, cadinhos de porcelana de 50 mL foram numerados e pesados em uma balança analítica tendo suas massas anotadas (M1). Pesou-se cerca de 1g do material, descontando o teor da umidade, nos cadinhos previamente pesados (M2). O material foi carbonizado em mufla a 800°C por 20 minutos. Após esse período, a mufla foi desligada e esperou-se cerca de 1 hora até que o material esfriasse. Posteriormente os cadinhos foram transferidos para um dessecador e foi efetuada a pesagem do material. A calcinação foi repetida por mais 15 minutos para se verificar a constância do peso (M3).

Para o cálculo temos:

$$\% \text{ CINZA} = \left(\frac{M3 - M1}{M2 - M1} \right) \times 100 \quad (2)$$

M1: massa do cadinho calcinado vazio, em gramas;

M2: massa do cadinho + massa do bagaço descontando teor de umidade, em gramas;

M3: massa do cadinho com cinza, em gramas.

3.2.2.2. Determinação dos extrativos

Para a determinação dos extrativos, foi utilizado como base o procedimento padrão do NREL “*Determination of Extractives in Biomass*” [101] e no procedimento executado por Rabelo (2010), [98].

Para o procedimento adicionou-se aproximadamente 4 g da amostra, descontando o teor de umidade, ao cartucho de extração tendo sua massa devidamente anotada (M1), em seguida adicionou-se 200 mL de água destilada em cada balão do extrator juntamente com pérolas de vidro. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento ajustado para que fornecesse, no mínimo, 10 sifonações por hora. A extração ocorreu até que o solvente em torno do cartucho de extração se tornasse incolor.

Após a extração em água, as amostras foram novamente submetidas à extração, utilizando aproximadamente 200 mL de álcool etílico em cada balão do extrator. A extração foi mantida até o desaparecimento total da coloração.

Ao término da extração, os sólidos foram transferidos, tão quantitativamente quanto possível, para um funil de Buchner, lavados com aproximadamente 100 mL de etanol, filtrados a vácuo e seco em uma estufa a 105°C até a massa constante, determinada em balança analítica (M2).

Para o cálculo do teor de extrativos no bagaço temos:

$$\% \text{ EXTRATIVOS} = \left(\frac{M1 - M2}{M1} \right) \times 100 \quad (3)$$

M1: massa do bagaço descontado o teor de umidade, em gramas;

M2: massa do bagaço livre de extrativos, em gramas.

3.2.2.3. Determinação da lignina total e carboidratos

Para a determinação da lignina total, celulose e hemicelulose, foram utilizados como base o procedimento padrão do NREL “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass” [102] e o procedimento executado por Rabelo (2010), [98].

Esse procedimento é dividido em algumas etapas que serão listadas a seguir:

1) Hidrólise ácida concentrada

Na hidrólise ácida pesa-se aproximadamente 0,30 g de cada amostra de bagaço (M1), descontando o teor de umidade, em tubos de ensaio devidamente etiquetados. Adiciona-se 3 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m) em cada tubo. Os tubos foram encubados em um banho termostático a 30°C por 1 hora. Usando um bastão de vidro, as amostras foram agitadas a cada 5-10 minutos sem remover os tubos do banho.

2) Hidrólise ácida diluída

Depois de decorrido o tempo da hidrólise ácida concentrada, os tubos foram removidos do banho termostático e o conteúdo transferido quantitativamente para erlenmeyers de 250 mL, utilizando, para isto, 84 mL de água destilada, sendo a concentração ácida do meio diluída para 4%. Foi preparado um “branco” com ácido sulfúrico a 4%. Para a completa hidrólise dos oligômeros, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e colocados em uma autoclave. As amostras e o branco foram autoclavadas por 1 hora a 121°C e 1,1 bar. Após a descompressão da

autoclave, os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio.

3) Análise da lignina insolúvel

Os hidrolisados ácidos foram filtrados em funis utilizando papéis filtro. As frações líquidas foram armazenadas para quantificação da lignina e dos carboidratos. Os sólidos retidos foram lavados com água destilada em abundância, aproximadamente 1,5 L, transferidos para pesa-filtros e secos em estufa a 100°C até a massa constante; após esse período, eles foram removidos e deixados esfriar até temperatura ambiente dentro de um dessecador, determinando posteriormente suas massas. Parte desse material insolúvel é constituída de cinzas, uma vez que estas não são solúveis em ácido. Para que não haja uma superestimação dos dados de lignina insolúvel, o teor de cinzas foi determinado para cada material de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.2.1.

4) Análise da lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância em espectrofotômetro UV-visível. Transferiu-se 1 mL de cada hidrolisado ácido para balões volumétricos de 100 mL que tiveram o volume aferido com água destilada. A leitura da solução foi realizada a 280 nm utilizando celas de quartzo. A leitura deve ser realizada até 6 horas após a hidrólise.

5) Preparação das amostras para curva de calibração dos carboidratos e produtos de decomposição

Curvas de calibração são necessárias para quantificação dos carboidratos e produtos de decomposição para a utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A curva foi realizada utilizando soluções de concentrações conhecidas correlacionadas com suas respectivas áreas sob curvas obtidas dos espectros coletados após a injeção no cromatógrafo. Os resultados são utilizados para calcular uma concentração desconhecida de açúcares.

6) Análise dos carboidratos

Alíquotas de cada hidrolisado, obtido após a etapa de filtração da hidrólise ácida, foram neutralizadas com carbonato de cálcio a pH entre 5-6. O carbonato deve ser adicionado lentamente para evitar a formação de espuma. Os hidrolisados neutralizados foram filtrados diretamente em frascos tipo vials utilizando filtros de membranas GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Milipore).

As amostras foram injetadas no cromatógrafo, utilizando para análise a coluna Sugar-Pak I (Waters). As áreas dos picos correspondentes às hexoses e às pentoses foram utilizadas para calcular as massas de glicana e xilana, respectivamente. Os fatores usados para converter açúcares monoméricos em anidromônômeros são: 0,90 para glicose e 0,95 para a celobiose. De maneira similar, xilose e arabinose tiveram suas correções efetuadas utilizando um fator de 0,88. Esses fatores são calculados baseados na adição de água nos polissacarídeos durante a hidrólise ácida [103, 104].

As concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose foram determinadas a partir de curvas de calibração obtida com padrões analíticos descritos no item (e).

As condições de análise foram:

- Volume de injeção: 10 µL;
- Fase móvel: água deionizada filtrada e desgaseificada;
- Taxa de fluxo: 0,5 mL/min;
- Temperatura do forno: 90°C;
- Temperatura do detector: 40°C;
- Detector: índice de refração;
- Tempo de execução: 15 min.

Caso houvesse a detecção de celobiose, em concentrações maiores que 3mg/mL, as análises eram repetidas uma vez que isso significa uma hidrólise incompleta. Picos que apresentam tempos de retenção abaixo da celobiose podem indicar altos níveis de produtos de degradação dos açúcares na amostra e isto está diretamente relacionado com a etapa de hidrólise.

3.3. Reagentes utilizados no pré-tratamento

Para a realização dos experimentos a plasma, utilizou-se água destilada, carbonato de sódio (Na_2CO_3) e hidróxido de sódio (NaOH).

Foram utilizadas três soluções de NaOH com diferentes pH, sendo pH ácido (3), dois valores de pH básico (10 e 12). A variação do pH da solução para o tratamento é muito importante visto que para cada pH é possível à extração de diferentes tipos de componentes do bagaço de cana-de-açúcar.

O Na_2CO_3 foi utilizado como solução tampão para que o NaOH mantivesse os valores de pH constantes em todas as soluções utilizadas.

3.4. Reator a plasma (sistema de pré-tratamento)

O reator que gera um plasma frio atmosférico tipo DBD para pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar é mostrado na Figura 13. O reator é um recipiente de vidro e tem uma tampa de teflon com dois eletrodos passantes com regulagem de altura, para que possa ser definida melhor distância entre os eletrodos e a superfície do líquido. A superfície exterior da base do reator é coberta por um filme de prata que, por sua vez, é ligado a uma placa de metal aterrada. O reator é alimentado por um transformador de alta tensão (14kV), com frequência de 60 Hz e corrente de 30 mA. O reator possui entrada e saída de gases de engate rápido que ficam localizadas em sua tampa, que podem ser utilizados para possíveis mudanças de atmosferas. Possui uma porta para entrada/retirada de amostras que serve também para execução de medições como temperatura, pH da solução líquida e para retirada de líquidos para análise química. Durante os experimentos a tensão aplicada e a corrente da descarga elétrica foram mantidas constantes para melhor reprodutibilidade experimental [105].

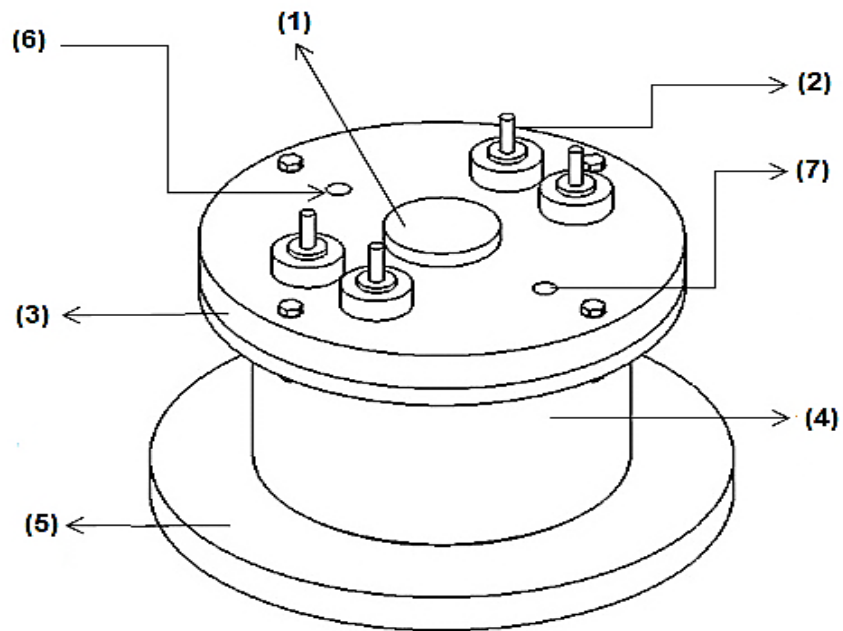


Figura 13. Desenho esquemático do reator a plasma DBD: (1) porta de entrada de amostras, (2) eletrodos (x4), (3) tampa de teflon, (4) recipiente de vidro, (5) placa de metal aterrada, (6) Entrada de gases e (7) saída de gases [105].

A Figura 14 mostra a imagem do reator a plasma DBD em pleno funcionamento, com bagaço de cana-de-açúcar recebendo o pré-tratamento.



Figura 14. Reator de plasma DBD em funcionamento.

3.4.1. Esquema elétrico

O circuito elétrico do sistema de pré-tratamento apresentado na Figura 12 é composto por:

- Um filtro passa-baixas (1), o qual tem a função de permitir a passagem de baixas frequências e rejeitar frequências acima da frequência de corte. Assim, ele auxilia na medição de tensão e corrente de alimentação do transformador atenuando o retorno de ruído das oscilações do plasma para a rede elétrica local. Esses ruídos podem interferir diretamente nos sinais medidos no osciloscópio.
- Uma resistência variável de 0 a 100 Ω (2), que atua como uma segurança para que a corrente utilizada não ultrapasse os limites do transformador.
- Um variac (3), que é um autotransformador, possui um cursor para ajuste e controle da tensão na entrada do transformador de alta tensão.
- Um transformador de alta tensão (4), de 450 W, é alimentado com uma tensão de 127 V rms e corrente de 30 mA máximos, na frequência de 60 Hz; ele possui duas saídas secundárias de 7,5 + 7,5 kV com derivação central.
- Por último o reator (5) para a realização do pré-tratamento.

A Figura 15 mostra a representação do esquema elétrico utilizado no sistema de pré-tratamento, com a enumeração dos itens descritos anteriormente.

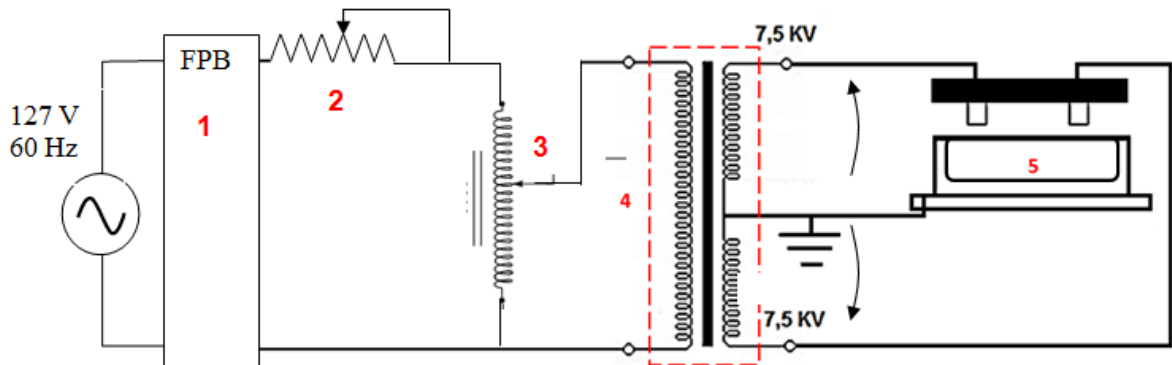


Figura 15. Representação do esquema elétrico do sistema de pré-tratamento.

3.5. Condições experimentais investigadas

Antes de definir o procedimento experimental para a realização do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, foi necessário investigar quais seriam as melhores condições do pré-tratamento com o reator de plasma em líquidos, como: distâncias dos eletrodos em relação à superfície do líquido, tempo de tratamento, massa a ser tratada e a variação do pH das soluções utilizadas. Dessa forma, foi possível manter um padrão experimental, garantindo que todos os ensaios realizados mantivessem as mesmas variáveis.

3.5.1. Tempo de tratamento do bagaço

Para poder definir o tempo que iria ser usado para tratar o bagaço de cana-de-açúcar, foram feitos ensaios com variação de 1 até 5 horas, com isto foi possível verificar o comportamento do processo para estes diferentes tempos.

Para os tempos de 1-2 h, não foi necessária nenhuma intervenção para o processo de pré-tratamento prosseguir, no entanto, para tempos superiores a 2 h, a solução utilizada começa a evaporar causando a interrupção da descarga na superfície do líquido, pois a distância entre os eletrodos se torna menor do que em relação à superfície do líquido. Para que o tratamento pudesse prosseguir foi necessário abastecer o reator com mais solução líquida, o que conseqüentemente alteraria as condições do tratamento; tal fato não garantiria as mesmas condições para todos os ensaios.

As alternativas de ensaios então foram fixadas entre 1 e 2 h, no qual o tempo escolhido para compor procedimento experimental foi o ensaio de 2 h.

3.5.2. Massa máxima de bagaço a ser tratado

Para a alimentação do reator com o bagaço de cana-de-açúcar foi adotado o padrão de relação líquido/bagaço de 10 para 1, ou seja, 10 ml de solução para 1 g de bagaço a ser tratado.

Devido ao reator ainda ser de nível laboratorial, a quantidade de bagaço a ser tratado com plasma ficou limitada a 10 g. Para cada ensaio, foram utilizados 10 g de bagaço e 100 ml de solução, gerando um volume total de 150 ml para cada amostra tratada como mostrado na Figura 16.

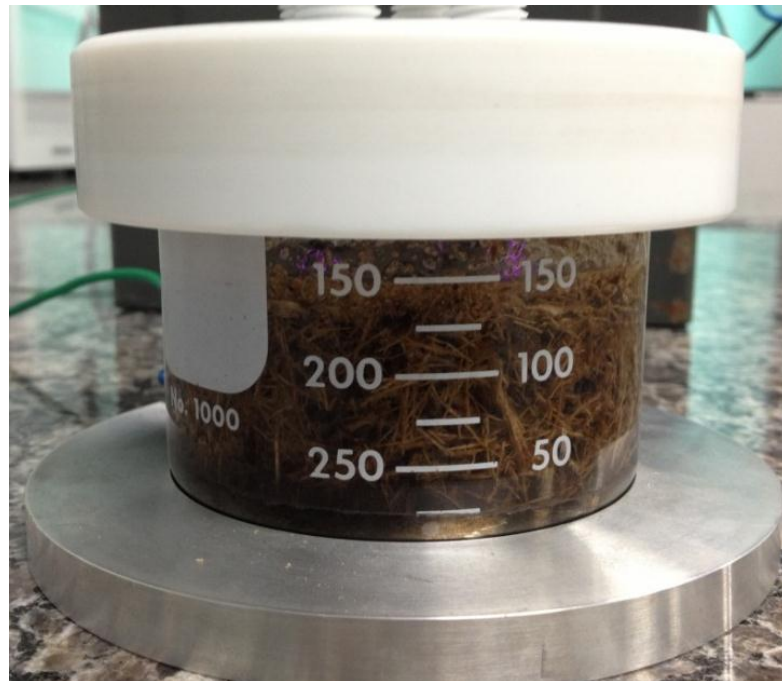


Figura 16. Volume total da amostra tratada.

3.6. Metodologia de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Para a execução dos experimentos, foram tratadas amostras com três diferentes tipos de pH (3, 10 e 12) e para cada amostra tratada no reator de plasma por barreira dielétrica foram feitos três tratamentos correspondentes denominados “Branco”, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Relação e nomenclatura das amostras.

Amostra	Líquido	Sólido	pH	Tempo (h)	Peso (g)	Tratamento
1	L1	S1	12	2	10	PLASMA
2	L2	S2	10	2	10	PLASMA
3	L3	S3	3	3	10	PLASMA
4	L4	S4	12	2	10	BRANCO
5	L5	S5	10	2	10	BRANCO
6	L6	S6	3	2	10	BRANCO

Os Brancos das amostras são ensaios executados com as mesmas condições de tempo, temperatura, massa e pH das soluções, porém sem a ação do plasma. Dessa forma é possível avaliar, por meio da comparação dos resultados, a influência do plasma sobre biomassa tratada.

Para cada tratamento foram utilizadas amostras com 10 gramas de bagaço, já descontados a umidade, o volume da solução de $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{NaOH}$ utilizada foi de 100 ml, mantendo a proporção de 1g de material para 10 ml de solução.

Cada amostra permaneceu sobre o tratamento a plasma por um período de 2 h consecutivas. Após o tratamento foi feita a separação das amostras sólidas e dos líquidos resultantes dos tratamentos (Figura 17).

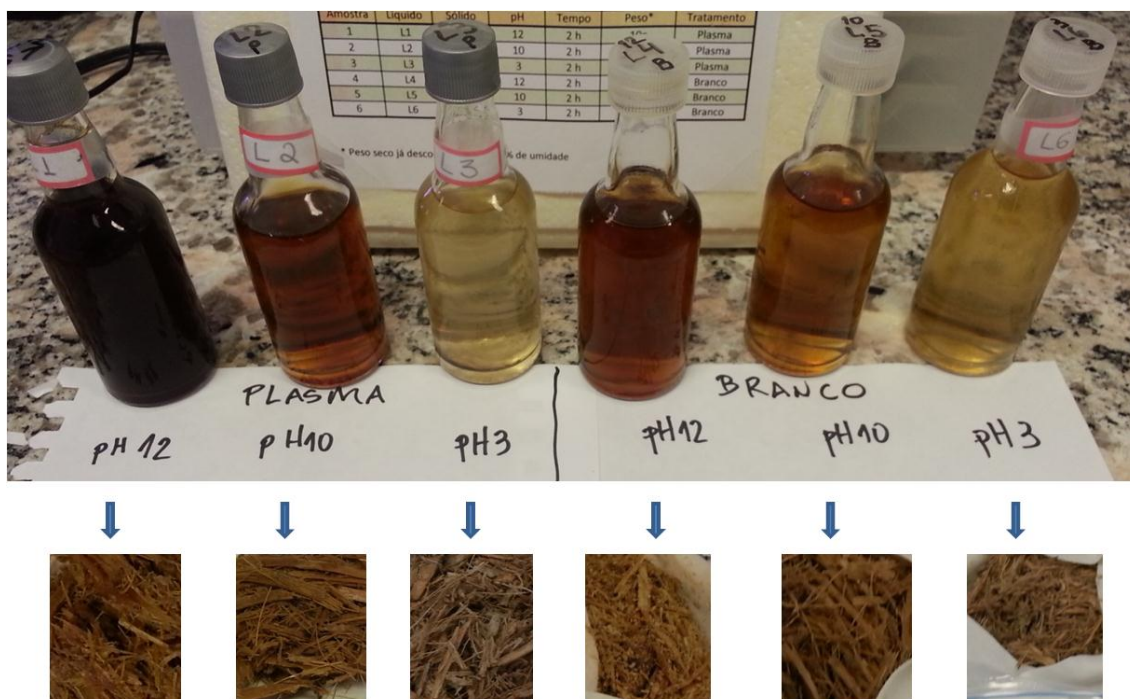


Figura 17. Amostras sólidas e líquidas separadas.

O bagaço foi lavado por diversas vezes com água destilada, monitorando o seu pH até que o mesmo atinja pH 7.

Posteriormente a lavagem, o bagaço é novamente levado à estufa onde permanece por 12 horas consecutivas a uma temperatura de 102°C para a sua secagem. Após a secagem, o bagaço é pesado para mensurar a perda de massa depois do tratamento. Esse procedimento foi realizado para todas as amostras tratadas e não tratadas para assim fazer a avaliação do pré-tratamento proposto neste trabalho.

3.7. Métodos de análise do material após o tratamento a plasma

3.7.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As modificações na superfície das amostras tratadas a plasma foram observadas por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV), que é um tipo de microscópio eletrônico capaz de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra.

O microscópio utilizado para esta análise foi o MEV-EDS da Oxford Instruments, modelo Carl Zeiss EVO MA15, do laboratório de análise de materiais do IP&D/Univap (Figura 18). Durante as análises foi utilizada uma tensão de aceleração de elétrons da ordem de 20kV; tais tensões causam a degradação da fibra da amostra prejudicando sua análise. Para que fosse possível a obtenção das imagens das amostras sem danificá-las, estas foram submetidas a um processo de deposição de uma fina camada de ouro para que as mesmas se tornassem condutoras. Após esse procedimento, as amostras foram analisadas empregando-se um detector de elétrons retroespalhados.

Para a confirmação das mudanças na superfície da fibra do bagaço de cana-de-açúcar, foram feitas imagens de amostras sem tratamento o que possibilitou a comparação com as que foram pré-tratadas utilizando o reator de plasma.



Figura 18. Foto do microscópio eletrônico de varredura do IP&D/Univap.

3.7.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica cromatográfica usada para separar os componentes de uma mistura, identificá-los, e assim quantificar cada um deles. CLAE é considerada uma técnica instrumental de química analítica. Em geral, o método envolve uma amostra líquida que passa por um material sólido adsorvente que é colocado dentro de uma coluna usando um fluído ou um solvente (eluente) líquido. Cada componente da amostra interage de uma forma com o material adsorvente tornando possível por meio de picos característicos, que são previamente estabelecidos pela calibração do equipamento, a identificação dos elementos que compõe a amostra.

Para análise de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois foi utilizado o CLAE do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) da marca Agilent modelo 1260 Infinity com detector de índice de refração (Figura 19); o conjunto de pré-coluna e coluna utilizadas foram Coluna de guarda Micro-Guard Cation PC H Refill Cartridges marca Bio-rad e a coluna analítica utilizada foi a Aminex HPX-87H da Bio-rad. Para a determinação dos açúcares, ácidos orgânicos e álcoois foi utilizado o ácido sulfúrico (H_2SO_4) como eluente, com concentração molar de 5 mM/L.



Figura 19. Foto do CLAE do CTBE

A análise de Hidroximetilfurfural (HMF) e Furfural foi feita utilizando o CLAE Waters com detector de UV, com conjunto de coluna Acclaim 120, c18, 3 μ m Analítica (4.6 x 150 mm) da marca Dionex (Figura 20). O eluente utilizado foi o acetonitrila+H₂O com proporção de 1:8 e 1% de ácido acético.



Figura 20. Foto do CLAE Waters com detector de UV.

3.7.3. Hidrólise Enzimática

A execução dos processos de hidrólise enzimática de todas as amostras geradas a partir do pré-tratamento estudado neste trabalho foram feitas nas instalações do CTBE, por técnicos e pesquisadores responsáveis por este tipo de procedimento.

A hidrólise enzimática foi efetivada em frascos roller de acordo com de Carli e Pradella, (2011) com coquetel celulolítico comercial, durante o período de 72h de processamento atingindo a máxima conversão da biomassa.

A concentração de sólidos foi de 5%, com carga enzimática de 10 FPU por grama de bagaço em base seca, o pH do processo enzimático foi mantido em 4,8 e a temperatura do processo de hidrólise enzimática foi de 50 °C.

Para a análise dos resultados da liberação de açúcares durante o processo foram retiradas amostras para os tempos de 0, 24, 48 e 72 h para cada tipo de pré-tratamento executado.

4. Resultados e discussões

4.1. Distância dos eletrodos em relação à superfície do líquido

Primeiramente, foram analisadas três diferentes distâncias entre os eletrodos e a superfície do líquido (60, 40 e 20 mm). A Figura 21 demonstra uma representação esquemática dos plasmas gerados em função das distâncias analisadas. Foi verificada a influência dessas distâncias em relação à distribuição dos plasmas gerados. Para a maior distância (60 mm), o plasma não chegou a incidir na superfície do líquido, apenas entre os eletrodos, visto que a distância entre os eletrodos foi menor do que a distância entre cada eletrodo e a superfície do líquido. Com a distância média (40 mm), as microdescargas foram bem distribuídas e também atingiram uma maior área do líquido, possibilitando uma maior reação entre o plasma, o líquido e a amostra tratada. Por último, foi testada a menor distância (20 mm) e foi constatado que os plasmas gerados ficam mais concentrados em uma pequena região da superfície do líquido, não promovendo uma área de contato comparável a condição de 40 mm. Depois dos ensaios, a configuração que demonstrou melhores características para o tratamento proposto foi a de 40 mm.

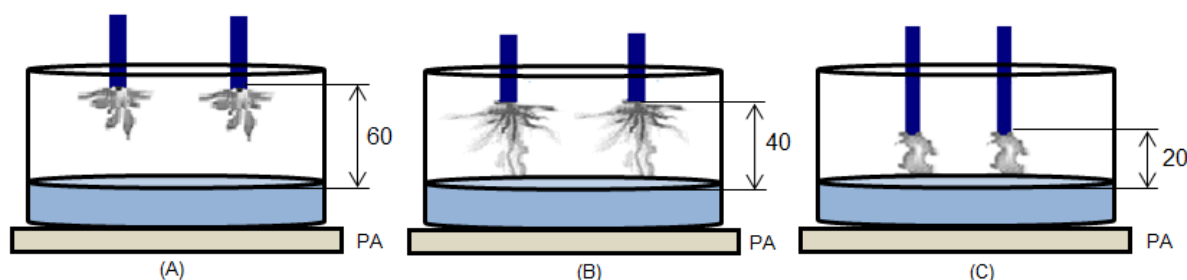


Figura 21. Representação dos plasmas gerados para três diferentes distâncias entre o eletrodo e a superfície do líquido: (A) 60 mm, (B) 40 mm e (C) 20 mm.

4.2. Variação do pH das soluções em relação ao tempo de exposição ao plasma

Para analisar variação do pH, foi preparada uma solução de NaOH com pH inicialmente em torno de 9,2 e esta solução ficou exposta ao plasma por 20 min consecutivos; o monitoramento do pH foi feito constantemente para poder acompanhar sua variação.

A variação do pH dessa solução pode ser vista na Figura 22, na qual mostra os valores das medições do pH durante todo o tempo do ensaio. Conforme pode ser observado, o pH da solução diminui rapidamente sobre o efeito do plasma onde, com aproximadamente 13 min. de ensaio, começa a atingir uma saturação de seu valor.

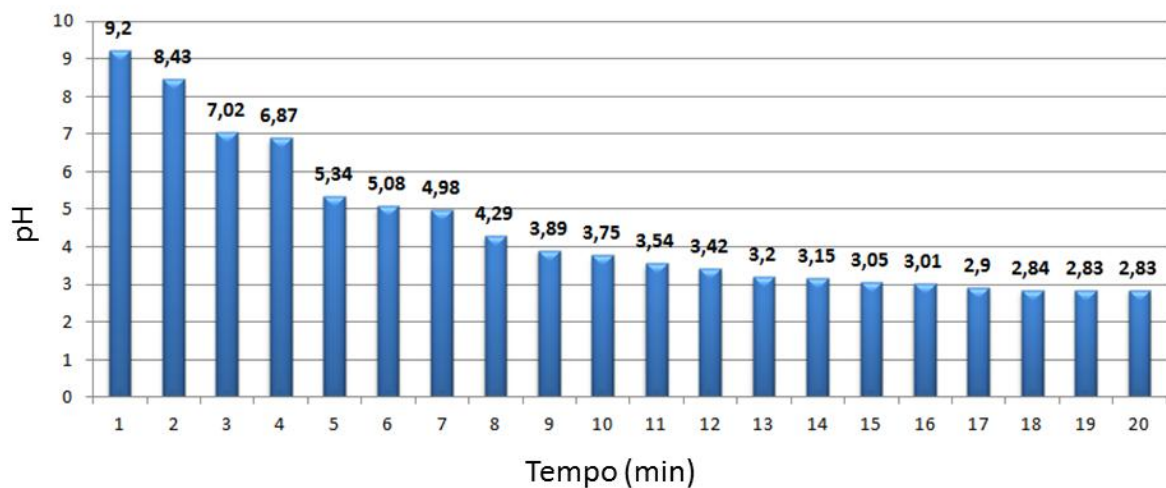


Figura 22. Variação do pH da solução de NaOH em relação ao tempo.

4.3. Avaliação da modificação estrutural da biomassa

Para avaliar as possíveis alterações nas fibras do bagaço de cana-de-açúcar que ocorreriam devido ao pré-tratamento com plasma por barreira dielétrica, foram feitas imagens da amostra sem tratamento (*in-natura*) e após o tratamento a plasma. Na Figura 23, é possível observar a fibra do bagaço de cana-de-açúcar recoberta por uma cera que provavelmente trata-se de um tipo de hemicelulose chamada xiloglucana. A xiloglucana envolve toda a fibra do vegetal, com uma maior concentração em sua superfície em torno de 5 % do peso seco, no interior apresentam uma menor concentração [31].

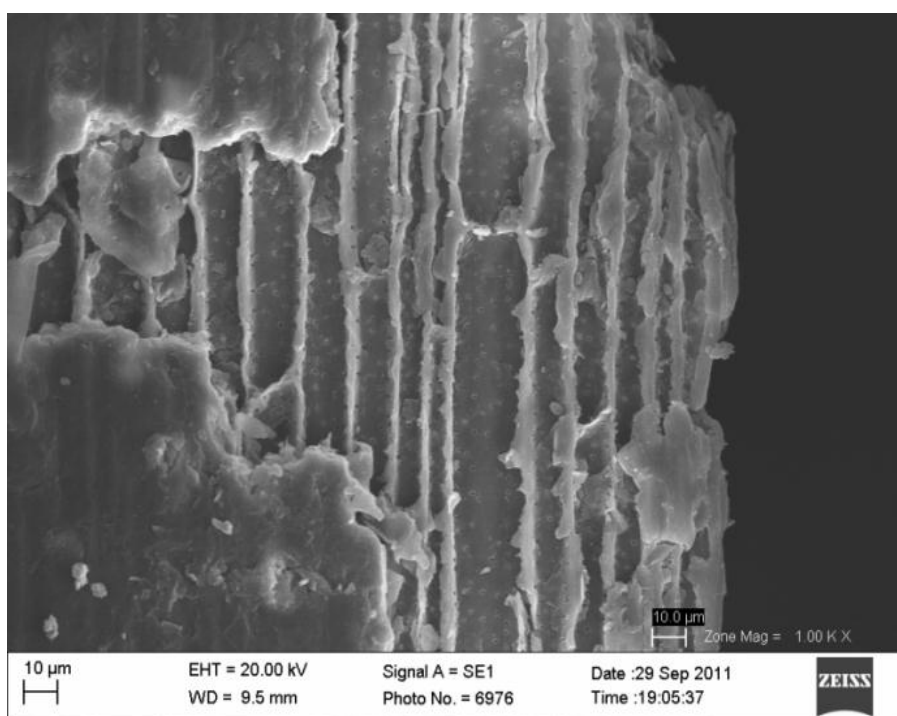


Figura 23. Imagem de MEV do bagaço de cana-de-açúcar sem tratamento a plasma.

A Figura 24 mostra imagem de MEV da fibra de bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento a plasma; esse bagaço permaneceu em tratamento por 2h em uma solução de NaOH+Na₂CO₃ e temperatura de aproximadamente 60 °C. Nota-se que a exposição da fibra é bem acentuada, onde toda a cera anteriormente presente foi removida devido à ação catalítica do plasma sobre a solução de NaOH+Na₂CO₃ mais bagaço-de-cana, proporcionando a remoção eficiente da xiloglucana. Após o pré-tratamento é possível observar os poros existentes na amostra.

Com esse resultado é possível afirmar que o plasma realmente age na fibra, modificando-a, porém com esta imagem não se pode confirmar a ocorrência de algum tipo de modificação da estrutura interna do bagaço, mas, pelo tratamento ser executado em meio líquido, é provável que aconteça essa modificação a qual só poderá ser confirmada nos resultados de hidrólise enzimática que ainda serão apresentados no próximo item.

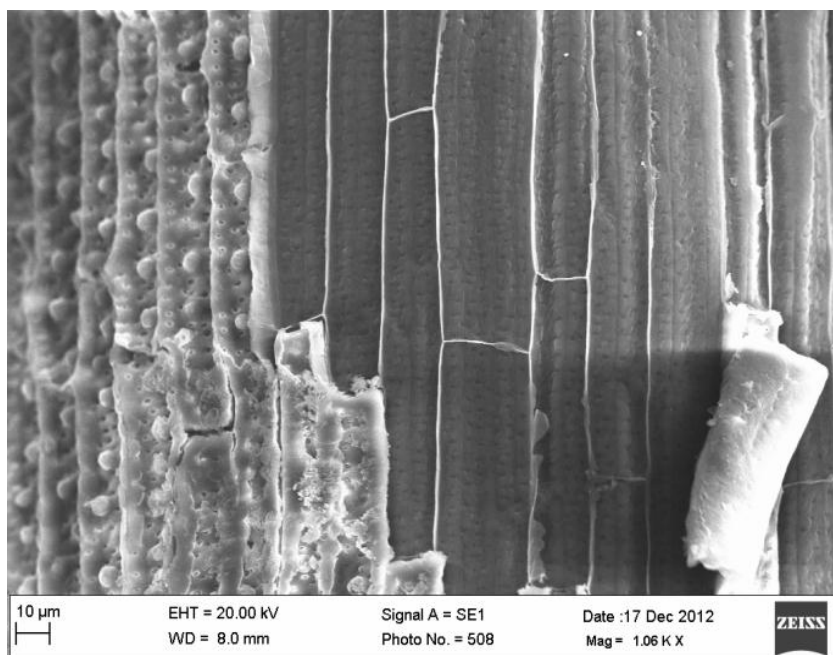


Figura 24. Fibra de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento.

4.4. Resultados de hidrólise enzimática

Para a avaliação do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com plasma por barreira dielétrica em meio líquido, as amostras foram submetidas ao processo de hidrólise enzimática, utilizando as condições descritas no item 3.7.3, além das amostras tratadas a plasma, também foram submetidas à hidrólise enzimática amostras sem o tratamento a plasma para que fosse possível mensurar a influência do pré-tratamento na biomassa. Essas amostras sem tratamento foram denominadas previamente, como BRANCOS, os quais foram mantidos com as mesmas condições do tratamento a plasma (tempo, temperatura, pH e solução líquida utilizada); foi feito o tamponamento das soluções para que não ocorressem variações no pH durante os processos de pré-tratamento, tanto com plasma como

para os BRANCOS (sem plasma). A descrição das amostras e as condições do tratamento serão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Nomenclatura e condições de pré-tratamento.

Amostras	pH	Tempo(h)	Peso (g)	Tratamento
S1	12	2	10	Plasma
S2	10	2	10	Plasma
S3	3	2	10	Plasma
S4	12	2	10	Branco
S5	10	2	10	Branco
S6	3	2	10	Branco

Na Figura 25, são mostrados os resultados de hidrólise enzimática para todas as amostras provenientes dos ensaios realizados neste estudo, além da amostra sem nenhum tratamento na qual foi denominada *in-natura*.

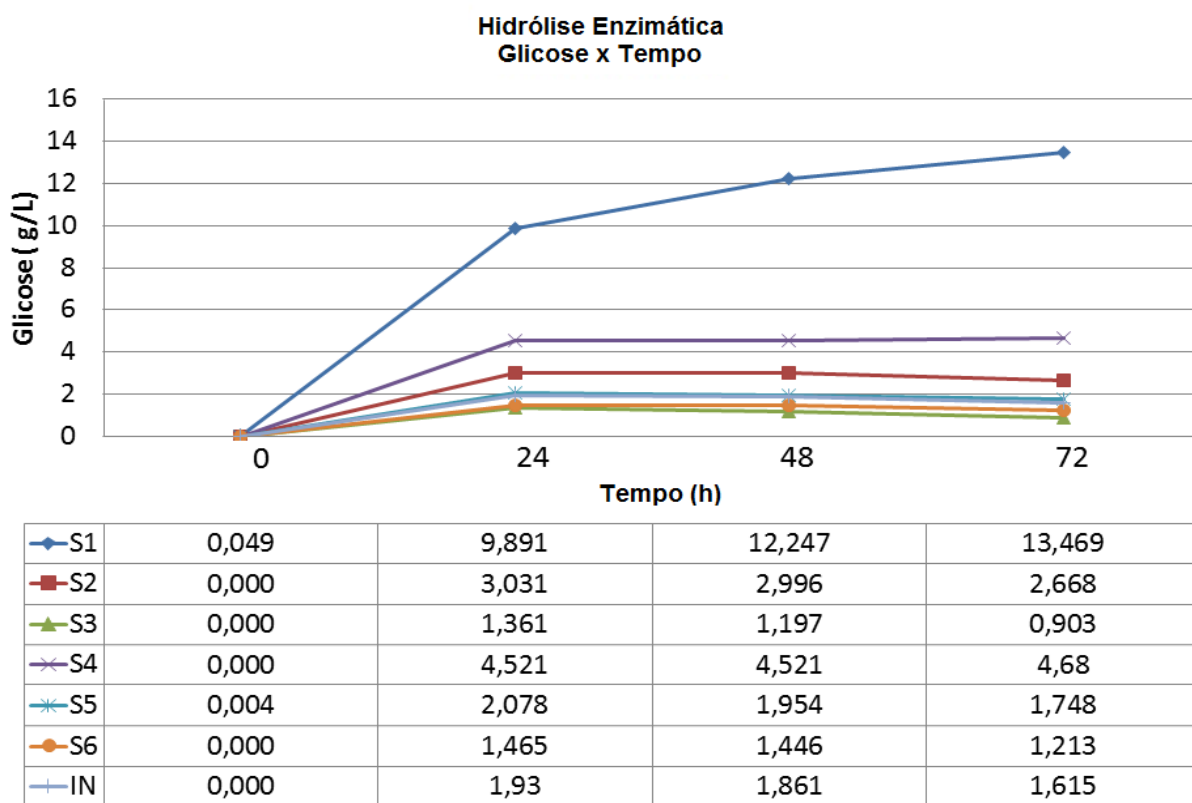


Figura 25. Resultados de hidrólise enzimática.

Observa-se, na Figura 25, que a amostra com maior liberação de glicose foi a amostra S1 com valor de 13,469 g/L após o período de 72 h de hidrólise enzimática; essa amostra foi tratada com pH 12 juntamente com o plasma.

A amostra S1 foi muito superior a sua amostra equivalente S4 (BRANCO com pH12), que obteve após as 72 h de hidrólise enzimática a liberação de 4,68 g/L de glicose, em nível de comparação a amostra S1 chegou a um rendimento de 2,88 vezes superior a amostra S4.

Se compararmos a amostra S1 com a amostra in-natura chegamos a um rendimento de 8,4 vezes superior, pois a amostra in-natura alcançou apenas a liberação de 1,615 g/L de glicose após as 72 h de hidrólise enzimática.

Por meio dessas comparações, no geral, as amostras tratadas a plasma obtiveram rendimento superior em relação as amostras sem plasma. Também foi possível confirmar a influência do pH no tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, como no caso da amostra S4 que não foi tratada a plasma, porém alcançou resultados superiores as outras amostras, com exceção a amostra tratada a plasma S1, que alcançou melhor resultado global.

4.5. Análise da composição química e rendimento das amostras

As composições químicas com a porcentagem dos elementos mais relevantes para o estudo proposto e o rendimento de todas as amostras geradas neste trabalho estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5. Composição química e rendimento das amostras.

Amostras	Rendimento (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)
<i>In-natura</i>	100	23,27	43,15	28,69
S1 – pH 12	77,26	9,66	30,84	16,13
S2 – pH 10	94,73	21,37	42,13	23,63
S3 – pH 3	96,83	22,15	43,14	28,16
S4 – pH 12	86,15	20,72	38,49	22,49
S5 – pH 10	97,79	23,33	40,46	26,99
S6 – pH 3	98,24	24,93	40,39	27,24

Antes da discussão dos resultados apresentados nesta seção, faz-se necessário definir como é avaliado o rendimento de uma amostra; o rendimento trata-se de quanto material ou amostra sólida permaneceu após o processo de pré-tratamento, qual a porcentagem de material que foi solubilizada em cada amostra. A amostra *in-natura* teve um rendimento de 100%, ou seja, esta amostra não perdeu massa após o tratamento a que ela foi sujeita claro que isso se torna justificável, pois a amostra *in-natura* não passou por nenhum tipo de tratamento, logo toda sua massa foi sujeita ao processo de hidrólise enzimática e aos ensaios de caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. Para melhor entendimento, pode-se observar uma amostra que recebeu tratamento, como a amostra S1 que obteve rendimento de 77,26 %, o que leva a compreensão de que após o tratamento foi solubilizado 22,74% da massa inicial desta amostra.

Por meio da Tabela 5, pode ser observado a composição e rendimento das amostras, em especial da amostra *in-natura*, que a partir dela é possível comparar as outras que receberam pré-tratamento a plasma e seus respectivos BRANCOS. A amostra que alcançou novamente os melhores resultados foi a amostra S1, que, após o seu tratamento, a porcentagem em peso de lignina foi de 9,66 %, também restou 30,84 % de celulose e 16,13% de hemicelulose. Essas concentrações, comparadas as da amostra *in-natura* que foram de 23,27% de lignina, 43,15% de celulose e 28,69% de hemicelulose, demonstram qual grau de solubilização da biomassa após o pré-tratamento a plasma; em especial, deve-se observar o decréscimo da lignina que, como descrito na literatura se trata de um dos maiores inibidores no processo de hidrólise enzimática, e este resultado justifica o melhor rendimento da amostra S1 durante a sua hidrólise.

Como o principal objetivo deste trabalho é avaliar o pré-tratamento a plasma, pode-se comparar a amostra S1 com seu respectivo BRANCO, a amostra S4. A amostra S4, obteve um rendimento de 86,15% de massa, 20,72% de lignina, 38,49% celulose e 22,49% de hemicelulose em peso, resultados bem inferiores em relação à amostra S1.

4.6. Análise das amostras líquidas

A Tabela 6, apresenta os resultados da análise de composição química, utilizando o CLAE do CTBE. No líquido resultante da amostra S1, que foi tratada a plasma, foram encontrados as maiores concentrações de monossacarídeos e oligossacarídeos como ácido acético (1,965 g/L), ácido fórmico (0,0990 g/L), celobiose (0,0330 g/L) entre outros, estas concentrações foram bem superiores as demais amostras analisadas.

Provando novamente a grande interação que o plasma tem com a biomassa durante o pré-tratamento, fazendo com que ocorra extração destes elementos, além de facilitar o processo posterior a esta etapa.

Tabela 6. Composição química dos líquidos resultantes dos pré-tratamentos.

Descrição da amostra	pH	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Celobiose (g/L)	Ácido fórmico (g/L)	Ácido acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
L1 - monossacarídeos	13,34	0,0000	0,0000	0,0000	0,0330	0,0990	1,9650	0,0000	0,0000
L1 - mono e oligossacarídeos	13,34	0,0260	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,2260	0,0030	0,0040
L2 - monossacarídeos	10,81	0,0000	0,0000	0,0000	0,0180	0,0270	1,3160	0,0000	0,0000
L2 - mono e oligossacarídeos	10,81	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
L3 - monossacarídeos	4,95	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
L3 - mono e oligossacarídeos	4,95	0,0000	0,0000	0,0780	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
L4 - monossacarídeos	10,95	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,3130	0,0000	0,0000
L4 - mono e oligossacarídeos	10,95	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,1770	0,0040	0,0050
L5 - Monossacarídeos	10,17	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
L5 - mono e oligossacarídeos	10,17	0,0000	0,0000	0,0140	0,0000	0,0000	0,2250	0,0000	0,0000
L6 - monossacarídeos	5,48	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
L6 - mono e oligossacarídeos	5,48	0,0000	0,0000	0,0410	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0030

4.7. Consumo elétrico

O consumo elétrico do sistema de pré-tratamento foi medido por meio de um osciloscópio da marca Tektronix, modelo TDS 2002B, (Figura 26).

As medições foram feitas a partir da entrada primária do transformador de alta tensão que compõe a fonte energética do sistema. Essas medições não puderam ser feitas nos secundários do transformador devido ao alto campo elétrico e interferências eletromagnéticas oriundas das oscilações da descarga, que resultavam em sinais muito ruidosos, de baixa confiabilidade, mesmo utilizando atenuação e filtragem.



Figura 26. Foto do osciloscópio utilizado para medição de consumo energético

A Figura 27 mostra o resultado das medições durante o processo de pré-tratamento. O valor no CH1 corresponde à tensão medida na entrada do transformador, atenuada em 1000x para um valor de 43,8 V rms. O valor no CH2 corresponde à corrente de 500 mA rms, medida com uma ponteira de corrente. O valor “Matem” corresponde ao valor médio da multiplicação, da tensão pela corrente indicada, e, portanto, refere-se à potência consumida pelo transformador. Como a tensão indicada está atenuada em 1000x, a potência média indicada também estará. Essa potência de 30,5 W refere-se ao que é consumido na descarga e perdido na conversão do transformador de alta tensão.

Os valores apresentados na Figura 27 foram mantidos na menor variação possível, em $\pm 10\%$, entre os pré-tratamentos.

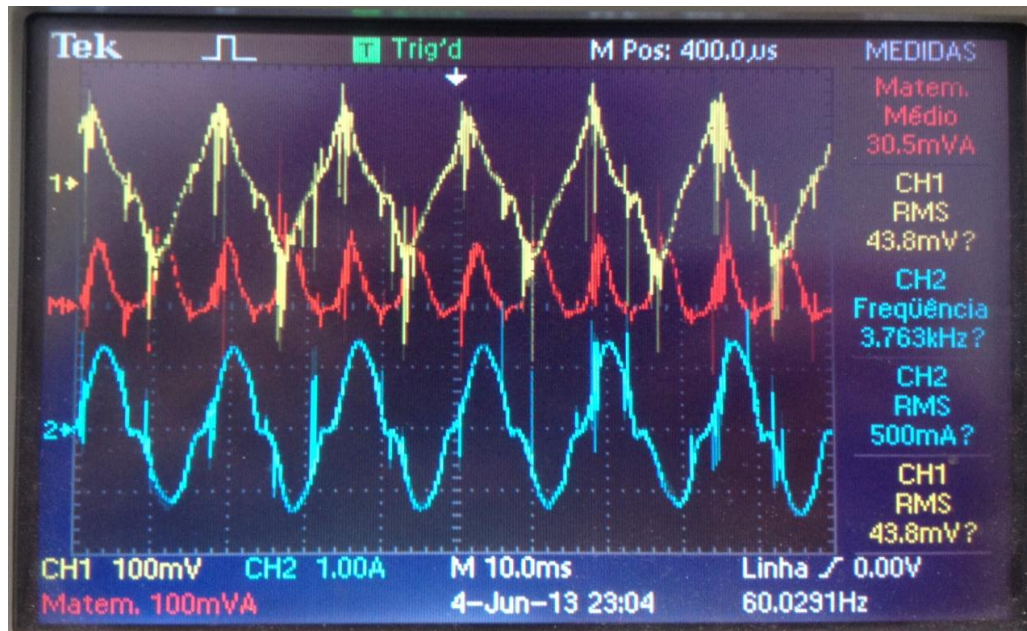


Figura 27. Medidas de tensão, corrente e potência do sistema.

Os valores médios de entrada do sistema utilizada foram na ordem de 438 V, com corrente de 500 mA e potência de 30,5 W.

Levando em consideração o valor cobrado pela empresa de distribuição de energia elétrica do estado de São Paulo, que é aproximadamente R\$0,37 por 1 kW/h, o valor de cada pré-tratamento realizado equivale a R\$0,01, com o tempo de 2 h por processo.

5. Conclusões

A modificação do bagaço de cana-de-açúcar que ocorreu durante o pré-tratamento a plasma, não foi apenas superficial, como pode ser observado nas análises realizadas com MEV, mas, também, estrutural; isso foi confirmado por meio da caracterização química onde a solubilização de componentes inibidores do processo enzimático foi mensurada, como no caso da lignina que é um dos maiores obstáculos para obtenção do etanol de segunda geração, verificou-se que a melhor condição de pré-tratamento alcançou a redução de lignina em valor de 9,66% em peso na amostra S1 quando comparado com o bagaço *in-natura* que possuía 27,23% de lignina em peso.

Devido a essa redução de concentração de lignina em peso, a amostra S1, que foi tratada com pH 12 e plasma, obteve o melhor resultado de liberação de glicose, alcançando 13,469 g/L de glicose, após o término de processo de hidrólise enzimática que foram de 72 h, este resultado comparado as outras amostras com todas as variações de pH, com ou sem aplicação do plasma, foi 88% superior quando comparado a amostra *in-natura*, que liberou apenas 1,6 g/L de glicose.

Sabendo que um bom pré-tratamento deve atender alguns requisitos para se tornar viável, em especial a energia gasta e os resíduos que são gerados após o processo, a utilização do reator DBD para pré-tratamento atendeu estes requisitos, pois o processo gerou pouco resíduo devido à baixa concentração de produtos químicos na solução líquida utilizada, além do baixo consumo energético, aonde chegou a ser gasto R\$0,01 por hora de pré-tratamento, considerando os valores cobrados atualmente por kW/h, que gira em torno de R\$ 0,37, sabendo-se que o pré-tratamento teve duração de 2 h.

O bagaço de cana-de-açúcar mostrou ser uma biomassa lignocelulósica promissora para a obtenção de etanol de segunda geração, por conter um alto teor de celulose (em torno de 40%), além de apresentar bons rendimentos na liberação de glicose (13,469 g/L) após a hidrólise enzimática. Rendimento que ainda pode ser melhorado com a otimização do processo de pré-tratamento a plasma.

5.1. Trabalhos futuros

- Melhoria na fonte energética, com variação de frequência e melhor caracterização elétrica.
- Escalonamento do reator para execução de pré-tratamento de uma maior massa, possibilitando projeto em escala industrial.
- Utilização de um gerador de ozônio para auxílio no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.
- Utilização do reator para tratamento de outros materiais.

6. Trabalhos apresentados em congressos

MIRANDA, F. S.; SILVA, R.J.; PRADELLA, J. G.C.; CARLY, C.M.; RABELO, S.C., ROSSEL, C. E. V.; MACIEL, H.S.; PESSOA, R.S.; SANTOS, L. V. Pretreatment and refining of sugarcane bagasse through plasma in liquid. In XII encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2013, Campos do Jordão.

MIRANDA, F. S.; LUCAS, F. L.C.; SILVA, M.O.; SILVA, R.J.; PRADELLA, J. G.C.; MACIEL, H.S.; PESSOA, R.S.; SANTOS, L. V. Recalcitrance of sugarcane bagasse before and after water plasma pretreatment. In 8th International Conference on Plasma Assisted Technologies, 2013, Rio de Janeiro.

SANTOS, L. V.; MIRANDA, F. S.; SAKANE, K. K.; SANTOS, M.P.; PESSOA, R.S.; LEITE, P. M. S. C.; ROCHA, M.R.; PRADELLA, J. G.C.; MACIEL, H.S.; Recalcitrance of sugarcane bagasse plasma pretreated before and after lignocellulose hydrolysis. In XI encontro da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2012, Florianópolis.

6.1. Pedido de patente

MIRANDA, F. S.; ENSINO, F. V.; SANTOS L. V.; PESSOA, R. S.; SAKANE, K.; MACIEL, H. S.; SANTOS, P.; SILVA, R. J. Reator de plasma de descarga por barreira dielétrica, processo e sistema de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica compreendendo o uso do referido reator. 2012 Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI0313642 data de depósito: 30/11/2012, título: "Reator de plasma de descarga por barreira dielétrica, processo e sistema de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica compreendendo o uso do referido reator", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Referências bibliográficas

-
- [1] SCHLITTLER, L. A. F. S.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicas: Pré-tratamento e estratégias de processamento. **Diálogo & Ciência – Revista Rede de Ensino FTC**, v.7, p. 25-28, 2008.
- [2] SILVA, O. G. **Produção de etanol com a utilização do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 44 f. Trabalho de Graduação (Curso de Tecnologia de Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010.
- [3] PEREIRA, B, F. **Produção de bioetanol a partir do material celulósico e hemicelulósico**. 39 f. Trabalho Graduação (Curso de Tecnologia de Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2011.
- [4] D' ALMEIDA, M.L.O. Composição Química dos Materiais Lignocelulósicos. In: CELULOSE E PAPEL – TECNOLOGIA DE FABRICAÇÃO DA PASTA CELULÓSICA, 1998, São Paulo. **Anais**. São Paulo: IPT, 1998. 2ª. Ed., v.1, p. 45-105.
- [5] PITARELO, A. P.; ALESSANDRE, T.; RAMOS, L.P. Efeito do ácido fosfórico sobre o pré-tratamento a vapor do bagaço de cana-de-açúcar e sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2008, Rio de Janeiro. **Anais IIX Enzitec**. Rio de Janeiro: HWB, 2008.
- [6] MACHADO, D. **Seleção de fungos capazes de hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar**. 92 f. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- [7] DINARO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2008.
- [8] PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.
- [9] JOAQUIM, A. P. **Estudo das etapas de ativação no processo de benzilação da polpa de medula de bagaço de cana-de-açúcar**. 78 f. 1997. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- [10] TRIANA, O.; LEONARD, M.; SAAVEDRA, F. **Atlas: Del bagazo de la caña de azucar**. México: GEPLACEA, 1990, 143p.
- [11] PATURAU, J. M. **By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization**. 3ª. Ed. Amsterdam: Elsevier, 1989, 435p.
- [12] CARASCHI, J. C. **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivação de polpa de bagaço de cana-de-**

açúcar. 188f. 1997. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

[13] ARMAS, C. M., BIANCHI, E. Aporte energético da indústria em usina sucroalcooleira viabilidade econômica. **STAB, Álcool e subprodutos**, v.8, n.5/6, p.41-45, 1990.

[14] MARTIN, C. et al. Preparation of sugarcane bagasse hydrolysates for alcoholic fermentation by yeasts. In: Brazilian Symposium Chemistry Lignins and other Wood Components, VI, 1999, Guaratinguetá. **Livro de Resumos**. Guaratinguetá: 1999. p. 24-27.

[15] FERNANDEZ, N. Pulp and paper development from sugar cane bagasse. In: 3th International Non-Wood Fiber Pulping and Papermaking Conference, 3, 1996, Pequim. **Proceedings**. Pequim: 1996, v.1, p.231-240.

[16] CARVALHO, E. P. Perspectivas da agroenergia. SEMINÁRIO BM & F Perspectivas para o Agro business. Disponível em <<http://www.fiesp.com.br/agronegócio>>, acessado em 14/10/2013 às 10h00min.

[17] ÚNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar). Disponível em <<http://www.unicadata.com.br>>, acessado em 17/11/2013 às 14h21min.

[18] MACEDO, I. C. et.al. A energia da cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.unicadata.com.br>>, acessado em 15/08/2013 às 15h51min.

[19] REIN, P. W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. In: Proc. Int. Soc. Sugar Cane Technol, XXVI, 2007, South Africa. **Proceedings**. South Africa: 2007, p.44-60.

[20] SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.

[21] LYND, L. R. et. al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnol**, v. 26, p. 169-172, 2008.

[22] ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v.3, p. 1-4, 2010.

[23] KOULLAS, D.P. et al. Effect of alkali delignification on wheat straw saccharification by fusarium oxysporum cellulases. **Biomass Bioenergy**, p. 9-13, 1992.

[24] LIN, K.W. et.al. Review on effect of pretreatment on digestibility of cellulosic materials. **AIChE Symp Series**, v.77, p. 102-106, 1981.

[25] TAHERZADEH M. J.; KARIMI, K. Bioethanol: Market and Production Processes. **Biofuel Refining and Performance**, United States, v.1, n.3, p. 69-106, 2008.

[26] SANTOS, L. V. et. al. Recalcitrance of Sugarcane Bagasse Before and After Hydrolysis. In: ENCONTRO DA SBPMAT, 11., 2012, Florianópolis. **Anais eletrônicos**. Florianópolis, 2012. Disponível em: <<http://www.sbpmat.org.br/11encontro/>>. Acessado em: 20/10/2012.

[27] NEVELL, T. P.; ZERONIAN, S. H. Cellulose Chemistry and its Applications. **Journal of Polymer Science**, New York, v. 25, n. 2, p.87-88, fevereiro de 1987.

[28] MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de cana-de-açúcar**. 2009. 197 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

[29] NEELY, W. C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. **Biotechnol Bioeng**. Bethesda, v. 26, n. 1, p. 59-65, Janeiro de 1984.

[30] FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

[31] SAKA, S. **Chemical composition and distribution**. 2ª Ed. New York: Dekker, 1991. p. 410.

[32] SUN, R. C.; SUN, X. F. Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p.415-423, 2002.

[33] Jönsson, L. J.; Alriksson, B.; Nilvebrant, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, V.6, p.16, 2013.

[34] PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. **3ª. Ed. Amsterdam, Elsevier**, 435p, 1989.

[35] RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 200 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

[36] VÁSQUEZ, M. P. et. al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 141-153, 2007.

[37] TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin – degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, v. 221, p. 661-663, 1983.

[38] KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. **Ann. Rev. Microbiol**, v. 41, p. 465-505, 1987.

-
- [39] LEISOLA, M. S. A. et. al. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. **J. Biol. Chem**, v. 262, p. 419-424, 1987.
- [40] BENAR, P. et. al. Hidroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of the products. **Bioresouse Technology**, v. 79, p. 103-111, 2001.
- [41] ROHELA, R. S. et. al. Thermal studies on isolated and purified lignin. **Thermochim. Acta**, v. 287, p. 131-138, 1996.
- [42] EL GAMMAL, A. A. et.al. Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. **Polym. Degrad. Stabil.** v. 61, p. 535-542, 1998.
- [43] ALEXY, P.; KOSIKOVÁ, B.; PODSTRÁNSKA, G. The effect of blending lignin with polyethylene and polypropylene on physical properties. **Polymer**, v. 41, p. 4901-4908, 2000.
- [44] ANGYROPOUPOS, D. S.; MENACHEM, S. B. Lignin. **Adv. Biochem. Eng. Biotech.**, v. 57, p. 127-158, 1997.
- [45] WHEALS, A. E. et. al. Fuel ethanol after 25 years. **Tibtech**, v. 17, p. 482-487, 1999.
- [46] PERES, S. Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural. In: XV SNPTEE SEMINÁRIO NACIONAL DE PRODUÇÃO E TRANSMISSÃO DE ENERGIA ELÉTRICA, 1999, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu, 1999.
- [47] LIU, C. F. et. al. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. **Industrial Crops and Products**, v. 26, p. 212-219, 2007.
- [48] MELLO, Jr. C. A. et. al. Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação in vitro e digestibilidade in vivo. **Livestock Research for Rural Development**, v.1, n. 1, 1989.
- [49] CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass Enzymatic reactivity. **Applied Biochem. Biotechnology**, v. 86, p. 5-37, 2000.
- [50] PU, Y., ZIEMER, C., RAGAUSKAS, A. J. Analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp. **Carbohyd Res**, v. 341, p. 591-597, 2006.
- [51] SINITSYN, A. P.; GUSAKOV, A. V.; VLASEN, E. Y. Effect of structural and physicochemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 30, p.43-59, 1991.
- [52] GARDNER, P.T. et. al. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. **J Sci Food Agric.**, v. 79, p. 11-18, 1999.

-
- [53] MEUNIER-GODDIK, L. et. al. Physicochemical properties of pretreated poplar feedstocks during simultaneous saccharification and fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 10, p. 667- 674, 1999.
- [54] GHARPURAY, M.M. et. al. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 25, n.1, p. 157- 172, 1983.
- [55] WRIGHT, J.D. Ethanol from lignocellulosic: an overview. **Energy Progress**, v.8, p. 71-78, 1988.
- [56] FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y.H. **Cellulose Hydrolysis (Biotechnology Monographs, vol. 3)**. Berlin: Springer 1987. p. 57.
- [57] ZHU, L. et. al. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3817-3828, 2008.
- [58] HSU, T. A. et. al. Alcohol from cellulose. **Chemical Technology**, v. 10, p. 315–319, 1980.
- [59] MOHAMMAD, J.; TAHERZADEH, K.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.
- [60] KUMAR, P. et. al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 48, p. 3713-3729, 2009.
- [61] MILLET, M. A.; BAKER, A. J.; SCATTER, L. D. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. **Biotech. Bioeng. Symp.**v. 6, p. 125–153, 1976.
- [62] CADOCHE, L.; LOPEZ, G. D. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. **Biol. Wastes**, v.30, p. 153–157, 1989.
- [63] TAKACS, E. et. al. Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cottoncellulose. *Radiat. Phys. Chem.* v. 57, p. 399–403, 2000.
- [64] GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.** v. 108, p. 41–65, 2007.
- [65] MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. (eds.). **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington, D. C.: American Chemical Society, 1994. p. 292-324, (American Chemical Society Symposium Series, n. 566).

-
- [66] GROUS, W. R.; CONVERSE, A. O.; GRETHLEIN, H. E. Effect of steam explosion pretreatment on pore size and enzymatic hydrolysis of poplar. **Enzyme Microb. Technol.** v.8, p. 274-280, 1986.
- [67] KABEL, M. A. et. al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresour. Technol.** v. 98, p-2034–2042, 2007.
- [68] LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresour. Technol.**, v. 16, p. 3061-3068, 2007.
- [69] DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review, **Bioresour. Technol.**, v. 55, p. 1-33, 1996.
- [70] JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. **Biofuels, Bioprod. Bioref.**, v.1, p. 119-134, 2007.
- [71] MES-HARTREE, M.; DALE, B. E.; CRAIG, W. K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 462-468, 1988.
- [72] GOLLAPALLI, L. E.; DALE, B. E.; RIVERS, D. M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98, p. 23-35, 2002.
- [73] DALE, B. E.; MOREIRA, M. J. A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** v. 12, p. 31–43, 1982.
- [74] ZHENG, Y. Z.; LIN, H. M.; TSAO, G. T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion. **Biotechnol. Prog.** v. 14, p. 890– 89, 1998.
- [75] GARCIA, D. R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** 2009. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- [76] AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for Enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 24, p. 421-433, 1989.
- [77] GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 46-52, 1984.
- [78] KRISHNA, S. H. et. al. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 825-830, 1998.

-
- [79] BEN-GHEDALIA, D.; MIRON, J. The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. **Biotechnol. Bioeng.**v.23, p. 823–831, 1981.
- [80] BEN-GHEDALIA, D.; SHEFET, G. Chemical treatments for increasing the digestibility of cotton straw. **J. Agric. Sci.** v. 100, p. 393–400,1983.
- [81] VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of ligninsImprovement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass.** V. 16, p. 1–17, 1988.
- [82] QUESADA, J.; RUBIO, M.; GOMEZ, D. Ozonation of Lignin Rich Solid Fractions from Corn Stalks. **J. Wood Chem. Technol.** v. 19, p. 115–137, 1999.
- [83] FRIDMAN, A. **Plasma Chemistry.** New York: Cambridge University, 2008. 1022 p.
- [84] FRANCK, K.P.; RUDOLPH, R.; MIESSNER, H. Design and Operating Characteristics of a Simple and Reliable DBD Reactor for Use with Atmospheric Air. **Plasma Chem. Plasma Process,** v. 23, p. 47, 2003.
- [85] KOGELSCHATZ, U. Atmospheric-pressure plasma technology. **Plasma Physics and Controlled Fusion,** v. 46, p.63-68, 2004.
- [86] ELIASSON, Baldur; KOGELSCHATZ, Ulrich. Nonequilibrium volume plasma chemical processing. **Plasma Science, IEEE Transactions on.** v.19, n.6, p.1063-1077, Dec 1991.
- [87] JOCHEN, K. et. al. Capacitance and power consumption quantification of dielectric barrier discharge (DBD) plasma actuators. **Journal of Electrostatics,** v. 69, p. 302-312, 2011.
- [88] JOSHI, A. A. et. al. Formation of hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and aqueous electrons by pulsed streamer corona discharge in aqueous solution. **Journal of Hazard. Mater,** v. 41, p. 3–30, 1995.
- [89] ROBINSON, J. et. al. Plasma Assisted Decontamination of Biological and Chemical Agents **Journal. Appl. Phys,** v. 44, p. 72–75, 1973.
- [90] DANG, T. H. et. al. Eur. Phys. Plasma Chemistry and Catalysis in Gases and Liquids. **Journal. Appl. Phys,** v. 47, p. 12-15, 2009.
- [91] SANO, N. K. et. al. Decomposition of organic compounds in water by direct contact of gas corona discharge: influence of discharge conditions. **Ind. Eng. Chem,** v. 41, p. 5906-5911, 2002.
- [92] SZENGYEL, Z. **Ethanol form wood cellulose enzyme production.** 2000. 290 f. Tese (Doutorado) - Dept. of Chemical Engineering 1, Lund University, Sweden, 2000.

[93] CLARK, T. A.; MACKEL, K. L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 34, p.101-110, 1984.

[94] WYMAN, C. E. Economic fundamentals of ethanol production from lignocellulosic biomass. In: SADDLER, J. N., PENNER, M. H. (Eds.). **Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates**. Washington, DC: American Chemical Society, 1996. p. 272–290. (ACS Symposium Series, v. 618).

[95] LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.** v. 24, p. 151-159, 1998.

[96] EKLUND, R.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.** v. 12, p. 225-228, 1990.

[97] SLUITER, B. et. al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Washington, D.C.: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008. 18p. (Technical Report, NREL/TP-510-42618).

[98] RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

[99] SLUITER, B. et. al. **Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid**. Washington, D.C.: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005, 12 p. (Technical Report NREL/TP-510-42623).

[100] SLUITER, B. et. al. **Determination of ash in biomass**. Washington, D.C.: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005, 8 p. (Technical Report NREL/TP-510-42622)

[101] SLUITER, B. et. al. **Determination of extractives in biomass**. Washington, D.C.: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2005, 12 p. (Technical Report NREL/TP-510-42619).

[102] SLUITER, B. et. al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Washington, D.C.: National Renewable Energy Laboratory (NREL), 2008, 16 p. (Technical Report NREL/TP-510-42618).

[103] KAAR, W. E.; BRINK, D. L. Summative analysis of nine common. NORTH AMERICAN WOODS. **Journal of Wood Chemistry and Technology**. V. 11, p. 479 – 494, 1991.

[104] KAAR, W. E. et. al. The complete analysis of wood polysaccharides using HPLC. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 11, p. 447 – 463, 1991.

[105] MIRANDA, F. S. et. al. **Reator de plasma de descarga por barreira dielétrica, processo e sistema de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica compreendendo o uso do referido reator.** Pedido de patente Brasileira **BR PI 0313642**, data de depósito: 30/11/2012, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.