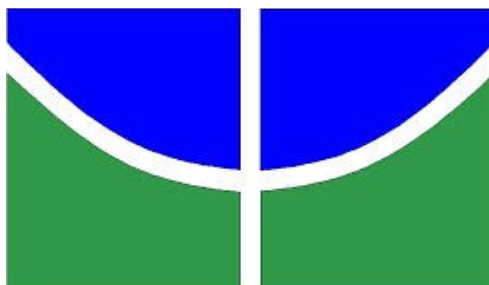


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



ELTON CARLOS GROSSI

**Produção de etanol de segunda geração
a partir de um derivado de celulose**

Brasília-DF
2015

ELTON CARLOS GROSSI

**Produção de etanol de segunda geração
a partir de um derivado de celulose**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum

Brasília-DF
2015

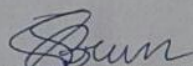
FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

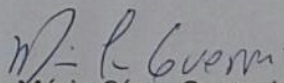
 **Universidade de Brasília**
Instituto de Química (IQ)

COMUNICADO

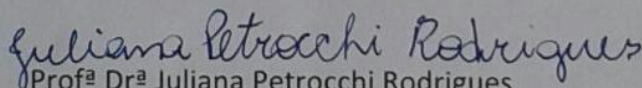
Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Elton Carlos Grossi**, matrícula nº **13/0092177**, intitulada ***“Produção de Etanol de Segunda Geração a partir de Derivado de Celulose”***, apresentada no (a) Auditório Azul do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 6 de março de 2015.



Prof^a Dr^a Sarah Silva Brum
Presidente de Banca (IQ/UnB)



Prof. Dr. Mário César Guerreiro
Membro Titular (UFLA)



Prof^a Dr^a Juliana Petrocchi Rodrigues
Membro Titular (FGA / UnB)

Prof^a Dr^a Andressa Regina Vasques Mendonça
Membro Suplente (IQ / UnB)

Em 6 de março de 2015.

DEDICATÓRIA

“Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, pela presença constante em minha vida. A minha esposa, LUCIANA, pelo companheirismo, paciência e sobretudo, pelo ato de doação plena em prol da nossa família. Aos meus filhos, MURILO e ISADORA, que me fazem entender que o sentido da vida é a busca interminável pela perfeição como ser humano.”

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela minha vida e por me permitir a realização desse sonho.

A minha orientadora, Prof.^a Dra. Sarah Silva Brum pela excelente orientação, apoio e dedicação. Por confiar e acreditar, que mesmo diante das minhas limitações de tempo, o desenvolvimento deste trabalho seria possível. Foi uma honra ser o seu primeiro orientado! Obrigado pelos ensinamentos!

A minha esposa, Luciana, por ser meu porto seguro. Pela paciência, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e me fazendo acreditar que tudo dará certo. Por estar incansavelmente presente e cuidando do nosso lar e da educação de nossos filhos nos momentos em que precisei me ausentar.

Aos meus filhos, Murilo e Isadora, por tanto amor e carinho. Pelos beijinhos e abraços que eram os remédios perfeitos para aliviar o estresse do trabalho.

A meus pais, Maninho e Dalva, pela educação sólida alicerçada nos princípios do amor e da ética, pelas orações e pelo exemplo de pessoas que são.

As minhas irmãs, Alessandra, Adriane e Adelaine, pelo carinho e por sempre me apoiarem e me ajudarem sempre que preciso.

A todos do GPS Brum e tantos outros do LMC, pelos momentos agradáveis de convivência e pela ajuda de cada um de vocês.

A Gisele da Biologia pela disponibilidade em me ajudar com as reações de fermentação.

Ao Manoel e Leandro pelo acolhimento e hospedagem em Brasília.

Aos amigos Toninho, pela companhia e por compartilharmos momentos difíceis durante essa jornada e, Inácio, pelo apoio e por levar meus pequeninos ao colégio nos dias que eu estava para Brasília.

A tantos outros amigos e familiares que torceram por mim. OBRIGADO!

E finalmente, ao Instituto de Química da UnB, especialmente ao LMC e à Central Analítica, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose

RESUMO

O mundo se depara atualmente com a perspectiva de um significativo aumento na demanda por etanol. Para evitar que haja o limite da oferta ou a competição pelo uso da terra para a geração de energia e produção de alimentos, especialmente em locais que não dispõem de clima favorável ou extensão territorial para cultivo, torna-se necessário investir no desenvolvimento de tecnologias de segunda geração de produção de etanol. A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica envolve quatro etapas: pré-tratamento para a remoção da lignina e hemiceluloses, hidrólise da celulose, fermentação da glicose e destilação. Devido à ineficiência dos pré-tratamentos e alto grau de cristalinidade da celulose, o rendimento líquido da conversão desse polímero em glicose tem sido um dos grandes desafios na busca por uma tecnologia que viabilize o processo de hidrólise para torná-lo mais competitivo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi desenvolver tecnologia para a produção de etanol de segunda geração, utilizando como matéria-prima o filtro de cigarro, que é constituído essencialmente por um derivado de celulose obtido do descarte da indústria de cigarro, o acetato de celulose, e dessa forma verificar a influência da substituição dos grupos OH na melhoria do acesso e reatividade da celulose. Os materiais foram analisados pelas técnicas: CHN, DRX, TGA, DSC, FTIR. Os difratogramas de raios X dos materiais mostraram uma grande diferença entre as cristalinidades da celulose e acetato de celulose. As reações de hidrólise foram realizadas em autoclave, à temperatura de 120 °C, variando-se a concentração de H₂SO₄ e o tempo de reação. A quantificação da glicose foi feita a 505 nm no espectrofotômetro UV-vis, através de teste enzimático colorimétrico utilizando um reagente específico. A composição dos hidrolisados foi analisada por HPLC (high performance liquid chromatography). O rendimento máximo em glicose, 92,3%, foi alcançado para a hidrólise do acetato de celulose em solução de H₂SO₄, 5%, por 180 minutos. Os testes de fermentação do hidrolisado com o maior teor de glicose foram realizados em biorreator tipo INFORS HT Multifors 2 Cell utilizando YNB e hidrolisado na proporção de 1/1, os quais foram mantidos sob agitação de 200 rpm, temperatura de 30 °C e sem aeração por 25 horas. Como agente fermentador foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O consumo de glicose e a produção de etanol foram quantificados durante a fermentação a partir de coletas de amostras do meio em intervalos de 2 horas e posterior análise por HPLC. A taxa de conversão da glicose em etanol foi 0,50 g/g e a eficiência da fermentação atingiu valores próximos de 100%. Os resultados encontrados foram extremamente importantes e esse estudo apontou novos caminhos para a hidrólise ácida com base na modificação química da celulose.

Palavras-chave: Acetato de celulose, celulose, etanol 2G, hidrólise, modificação química.

Production second-generation ethanol from a cellulose derivative

ABSTRACT

The world is currently faced with the prospect of a significant increase in demand for ethanol. To avoid having the limit of the offer or competition for land use for energy generation and food production, especially in locations that lack the favorable climate or land area for cultivation, it is necessary to invest in the development of technologies second generation production of ethanol. The production of ethanol from lignocellulosic biomass involves four stages: pre-treatment for the removal of lignin and hemicellulose, hydrolysis of cellulose, glucose fermentation and distillation. Due inefficiency of pre-treatment and high degree of crystallinity of cellulose, the net income from the conversion of glucose polymer has been a major challenge in the search for a technology that enables the hydrolysis process to make it more competitive. Thus, the objective of this work was to develop technologie for second generation ethanol production, using as raw material the cigarette filter, which consists essentially of a derivative of cellulose obtained by discarding the cigarette industry, cellulose acetate, and thereby determine the influence of replacement of OH groups in improving access and reactivity of cellulose. The materials were analyzed by techniques: CHN, XRD, TGA, DSC, FTIR. The diffractograms ray-X of the materials showed a large difference between the crystallinities of cellulose and cellulose acetate. The hydrolysis reactions were performed in an autoclave at a temperature of 120 °C by varying the concentration of H₂SO₄ and the reaction time. Quantification of glucose was carried out at 505 nm UV-vis spectrophotometer, using enzymatic colorimetric test using a specific reagent. The composition of the hydrolysates were analyzed by HPLC (high performance liquid chromatography). The maximum yield of glucose, 92.3% was achieved for the hydrolysis of the cellulose acetate solution of H₂SO₄, 5%, for 180 minutes. The hydrolyzate fermentation tests with the highest glucose content were performed in a bioreactor type INFORS HT Multifors 2 Cell using YNB and hydrolyzed in the ratio of 1/1, were kept under stirring at 200 rpm, temperature of 30 °C and without aeration for 25 hours. As fermenting agent used was *Saccharomyces cerevisiae*. The glucose consumption and ethanol production were quantified during fermentation from the sample collection means at intervals of 2 hours and subsequent HPLC analysis. The rate of conversion of glucose into ethanol was 0.50 g / g and the efficiency fermentation eached values close to 100%. The results were extremely important and this study found new ways to acid hydrolysis based on the chemical modification of cellulose.

Keywords: Acetate cellulose, cellulose, ethanol 2G, hydrolysis, chemical modification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da biomassa lignocelulósica	16
Figura 2 - Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β-D-glucose	18
Figura 3 - Representação esquemática da hemicelulose	19
Figura 4 - Estrutura geral da lignina	20
Figura 5 - Esquema das etapas envolvidas na produção de etanol 2G	21
Figura 6 - Diagrama esquemático do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	22
Figura 7 - Estrutura molecular da celulose	27
Figura 8 - Estrutura do acetato de celulose	30
Figura 9 - Esquema da reação de produção do triacetato de celulose	31
Figura 10 - Representação esquemática descrevendo o início da acetilação de um microcristal de celulose	31
Figura 11 - Esquema representativo do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas da celulose	33
Figura 12 - Tempo de retenção na coluna dos padrões analíticos.....	42
Figura 13 - Representação do mecanismo da reação de saponificação do acetato de celulose	45
Figura 14 - Espectros FTIR (celulose microcristalina e acetato de celulose).....	47
Figura 15 - Curvas de TGA e DTG do acetato de celulose	48
Figura 16 - Curvas de TGA e DTG da celulose	49
Figura 17 - Análises DSC da celulose e do acetato de celulose	50
Figura 18 - Difractogramas de raios-X (celulose e acetato de celulose)..	51
Figura 19 - Representação esquemática da substituição das hidroxilas da celulose por grupos acetil	51
Figura 20 - Produtos das reações de hidrólise após 150 min de reação	53
Figura 21 - Equação química da reação de hidrólise da celulose	54
Figura 22 - Equação química da reação de hidrólise do acetato de celulose.....	55
Figura 23 - Rendimento em glicose x tempo de reação das hidrólises da celulose em soluções 2,5%, 5,0 %, 10%, 15% e 20% de H ₂ SO ₄	55
Figura 24 - Rendimento em glicose x tempo de reação das hidrólises do acetato	

de celulose em soluções 2,5%, 5,0 %, 10%, 15%e 20% de H ₂ SO ₄	56
Figura 25 - Comparação entre os rendimentos em glicose obtidos a partir das reações de hidrólise da celulose e do acetato de celulose, em solução de H ₂ SO ₄ , 5,0% (V/V.)	57
Figura 26 - Gráfico comparativo entre os rendimentos em glicose calculados a partir de teores de glicose medidos por HPLC e por UV-vis	61
Figura 27 - hidrolisados sendo injetados nas dornas contendo YNB para dar início a fermentação.....	63
Figura 28 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado nas dornas 1 e 2.....	64
Figura 29 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio hidrolisado	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química parcial de alguns tipos de biomassa	17
Tabela 2 - Resumo de vários processos utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	22
Tabela 3 - Condições utilizadas nas reações de hidrólise	37
Tabela 4 - Fórmulas percentuais dos compostos de acetato e grau de substituição (GS)	43
Tabela 5 - Resultados das análises de CHN dos materiais	44
Tabela 6 - Volumes de NaOH utilizados na titulação do acetato de celulose, porcentagem de grupos acetila (%GA) e grau de substituição (G.S.).....	46
Tabela 7 - Quantificação de glicose, furfurais e acetato nos hidrolisados.....	58
Tabela 8 - Quantificação dos compostos durante a fermentação na dorna 1	65
Tabela 9 - Quantificação dos compostos durante a fermentação na dorna 2	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Biomassa	15
3.1.1 Material lignocelulósico	17
3.1.1.1 Celulose	17
3.1.1.2 Hemicelulose	18
3.1.1.3 Lignina	19
3.2 Produção de etanol de segunda geração (2G)	20
3.2.1 Pré-tratamentos	21
3.2.1.1 Explosão a vapor ou auto-hidrólise	24
3.2.1.2 Pré-hidrólise ácida	25
3.2.2 Modificação química na celulose	27
3.2.2.1 Obtenção de acetato de celulose	30
3.2.3 Hidrólise ácida da celulose	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Reagentes	35
4.2 Análises dos materiais lignocelulósicos	35
4.2.1 Análise Elementar (CHN)	35
4.2.2 Determinação do grau de substituição do acetato de celulose (GS).....	35
4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	36
4.2.4 Análise termogravimétrica (TG) e análise termogravimétrica diferencial (DTG)	36
4.2.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)	36
4.2.6 Difração de raios-X (DRX) / Cristalinidade	36
4.3 Reações de hidrólise dos materiais	37
4.3.1 Quantificação da glicose	39
4.4 Testes de fermentação	40
4.4.1 Preparo dos hidrolisados	40

4.4.2 Microrganismo.....	40
4.4.3 Meio de cultura.....	41
4.4.4 Fermentação.....	41
4.4.5 Análise em HPLC	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
5.1 Caracterização dos materiais.....	43
5.1.1 Análise de CHN.....	43
5.1.2 Determinações do grau de substituição do acetato de celulose.....	44
5.1.3 Análises por FTIR.....	46
5.1.4 Análises termogravimétricas (TGA e DTG).....	47
5.1.5 Análises DSC.....	49
5.1.6 Análise das difrações de raios-X (DRX).....	50
5.2 Hidrólises dos materiais.....	52
5.2.1 Teores de glicose	54
5.2.2 Quantificações de glicose, furfurais e acetato por HPLC	58
5.3 Fermentação - Produção de etanol 2G.....	62
5.3.1 Crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
5.3.2 Consumo de glicose e a produção de etanol.....	64
6 CONCLUSÕES.....	67
7 TRABALHOS FUTUROS	68
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO.....	69
ANEXO A	74

1 INTRODUÇÃO

A instabilidade política dos países produtores de petróleo, preocupações com a segurança energética, esgotamento de fontes de combustíveis fósseis, aliados aos efeitos negativos derivados da sua utilização e ao aumento da demanda de energia, têm motivado a busca por fontes renováveis de energia.

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica (etanol de segunda geração) é apontada hoje como o maior potencial entre as possíveis alternativas para aumentar a produção de etanol no mundo, sem comprometer a segurança alimentar. A importância da produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos decorre da possibilidade de se utilizar matérias-primas de baixo custo, tais como resíduos agroindustriais e urbanos tornando-se possível aumentar a produção de etanol sem aumentar a área plantada.¹

Cerca de 60% do peso total dos resíduos sólidos urbanos gerados no mundo são representados por materiais de origem vegetal, como por exemplo, papel, papelão, guimbas de cigarro, madeira, entre outros.² Esses resíduos poderiam ser aproveitados para a produção de etanol de segunda geração com vantagens significativas, pois além de agregar valor a um resíduo, promoveria a redução do seu impacto ambiental.³

Segundo Brum (2010)¹, O processo tradicional de produção de etanol obtido a partir do caldo da cana-de-açúcar, “etanol de primeira geração”, aproveita apenas 20% em peso da cana-de-açúcar. Com o desenvolvimento da tecnologia de segunda geração, o Brasil poderia dobrar a produção de etanol apenas com o aproveitamento da celulose do bagaço da cana-de-açúcar.

A produção de etanol de segunda geração envolve quatro etapas. Pré-tratamento para remover a lignina e as hemiceluloses, hidrólise da celulose para obtenção da glicose, fermentação do açúcar e destilação para a obtenção do etanol.

Atualmente, dois processos hidrolíticos têm sido desenvolvidos, a hidrólise com ácidos minerais e a hidrólise enzimática. No entanto, a hidrólise com ácidos minerais necessita de altas temperaturas e equipamento resistente à corrosão, enquanto que no processo enzimático, os problemas são relacionados ao alto custo, longos tempos de reação (até sete dias) e indisponibilidade comercial.⁴

Para melhorar a eficiência da hidrólise são realizados pré-tratamentos do material lignocelulósico, os quais podem ser físicos (moagem, irradiação), químicos

ou físico-químicos (explosão a vapor, extração por solvente, tratamento com ácido, base ou agentes oxidantes.). O objetivo do pré-tratamento é aumentar a área superficial acessível do material, promover a deslignificação parcial ou total, diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose.⁵

Contudo, a necessidade de pré tratamento e o baixo rendimento em sacarídeo na hidrólise, em geral, devido à elevada estabilidade e resistência de celulose a ataque químico eleva o custo do etanol e dos demais produtos produzidos a partir da celulose.⁶

Logo, se torna claro que o aproveitamento da biomassa lignocelulósica exige nova tecnologia que viabilize o processo de hidrólise para torná-lo mais competitivo.

Neste sentido, a modificação química da celulose, como uma etapa de pré-tratamento, para torná-la menos cristalina, pode ser uma alternativa para facilitar a hidrólise e assim melhorar a eficiência no processo de produção de etanol de segunda geração.

O acetato de celulose é um derivado da celulose produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. Este composto é o principal constituinte do filtro de cigarro, e a utilização desses resíduos poderia ser um caminho extremamente interessante para resolver dois grandes problemas: a poluição ambiental causada pelo descarte inadequado dos filtros de cigarro e a diminuição da resistência da celulose a ataques químicos e assim facilitar a hidrólise por ácidos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi desenvolver uma tecnologia para produção de etanol de segunda geração, utilizando um derivado da celulose obtido de filtros de cigarro como matéria-prima.

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterizar os materiais celulose e acetato de celulose e avaliar a diferença de cristalinidade entre eles;
- Otimizar uma metodologia para a hidrólise do acetato de celulose objetivando altos rendimentos em glicose;
- Fazer um estudo comparativo entre as eficiências das hidrólises ácidas dos materiais, celulose e acetato de celulose, a partir da quantificação da glicose;
- Quantificar e estudar os produtos e subprodutos da reação de hidrólise por HPLC;
- Obter o etanol de segunda geração por meio de fermentação dos hidrolisados obtidos;
- Estudar um processo fermentativo e quantificar os produtos da fermentação por HPLC.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biomassa

Em geral, denomina-se biomassa qualquer matéria orgânica de origem vegetal ou indiretamente animal, formada pelo processo de fotossíntese, que ocorre na presença de luz solar. Pode-se dizer que a biomassa é uma forma de armazenamento de uma pequena fração da energia solar que incide na superfície da Terra. Essa energia é armazenada na forma de ligações moleculares orgânicas e, por sua vez, é transformada e liberada por processos biológicos e termoquímicos. Ao contrário da energia dos combustíveis fósseis, a biomassa é renovável.

Com exceção da cana-de-açúcar, as tecnologias comercialmente disponíveis na atualidade para a produção de etanol de primeira geração a partir de biomassas sacaríneas e amiláceas envolvem ganhos energéticos e ambientais bastante estreitos. Além disso, essas matérias-primas apresentam uma limitada vantagem econômica e encontram, em geral, mercados alternativos mais atrativos, como alimentos ou insumos para outros fins. Entretanto, apesar de suas destacadas vantagens, a cana-de-açúcar não é uma opção viável para todas as regiões do planeta. E por esse motivo, os países do hemisfério norte vêm procurando incessantemente rotas tecnológicas que permitam a produção de um biocombustível eficiente, tanto do ponto de vista ambiental quanto do ponto de vista econômico.⁷

Atualmente, a conversão de material lignocelulósico ou biomassa residuária em açúcares fermentáveis para produção de etanol de segunda geração (etanol 2G) vem sendo considerada como uma alternativa promissora para aumentar a produção de etanol necessária para atender à demanda mundial. O seu sucesso poderia transformar o etanol em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, aproveitando a alta disponibilidade de resíduos orgânicos de diversas fontes. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos.⁷

Entender a estrutura e a composição da biomassa lignocelulósica (Fig. 1) é fundamental para compreender a tecnologia de produção do etanol 2G.

De forma simplificada, a biomassa é constituída por três componentes principais: a celulose, a hemicelulose e a lignina. A celulose, que é um polímero de

glicose, quando submetida a reações de hidrólise, dá origem à glicose. A hemicelulose, é constituída por diferentes açúcares, principalmente xilose, um açúcar de cinco carbonos, que também tem potencial para ser transformado em etanol, mas seu processo de fermentação depende da incorporação de microrganismos específicos e diferenciados. O terceiro maior constituinte é a lignina, uma macromolécula complexa, formada pela combinação dos álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico. Ela apresenta um alto poder calorífico e é produzida em grandes quantidades, como licor negro, nas indústrias de papel e celulose. Esta característica faz com que sua finalidade inicial seja a queima nas caldeiras para produzir energia e equilibrar o balanço energético da indústria. A médio e longo prazo existe possibilidade de uso da lignina na fabricação de produtos de maior valor agregado.⁸

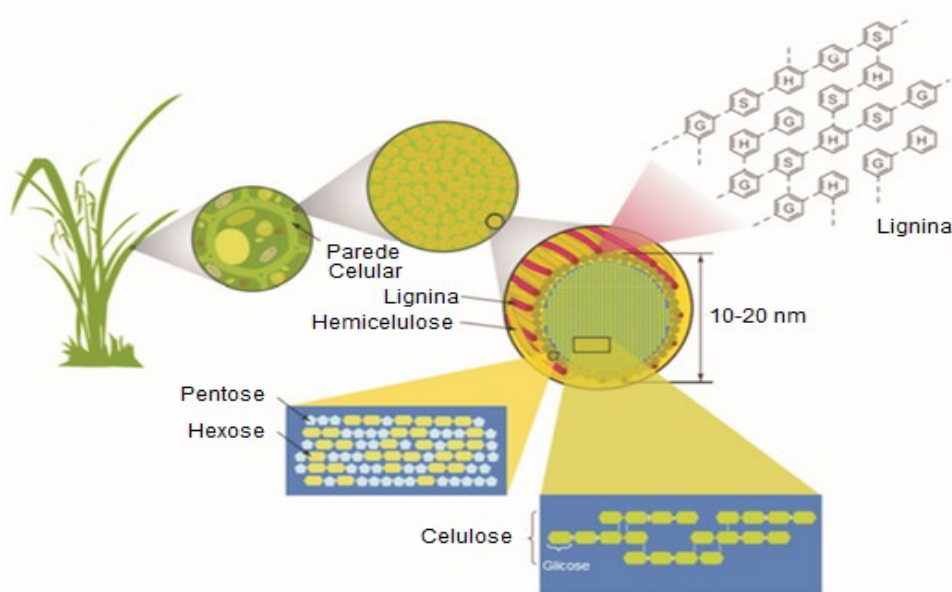


Figura 1: Estrutura da biomassa lignocelulósica⁸

Embora a constituição básica da biomassa vegetal seja, celulose, hemicelulose e lignina, no entanto as suas proporções variam substancialmente, dependendo do tipo, a espécie, e até mesmo a fonte da biomassa, como é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química parcial de alguns tipos de biomassa⁷

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34	44	20
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
Eucalyptus grandis	40,2	15,7	26,9
Eucalyptus globulus	46,3	17,1	22,9

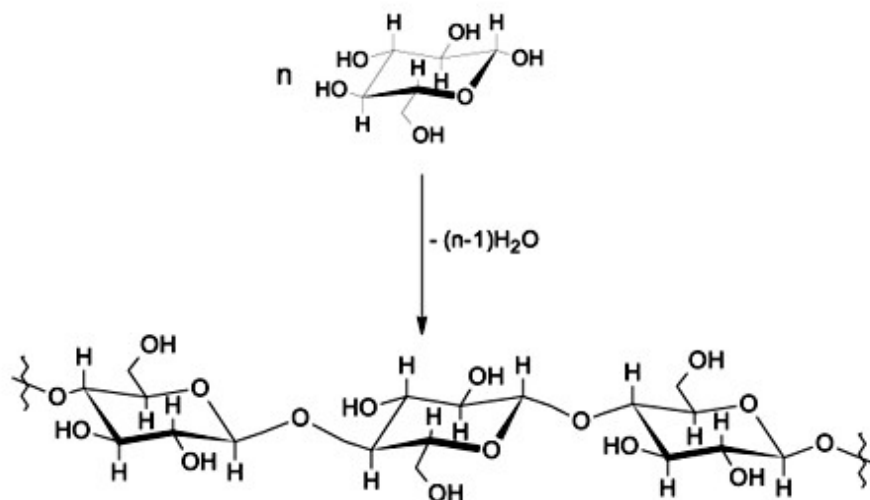
3.1.1 Material lignocelulósico

O termo lignocelulose refere-se à estrutura da parte dos vegetais que constitui a parede celular formada por fibras elementares de celulose envolvidas em uma matriz amorfa composta de polioses (hemicelulose) e lignina. Essa matriz no qual a fibra celulósica está envolvida (lignina) constitui uma barreira para o ataque de microrganismos e enzimas, tornando um material pouco reativo e bastante rígido.

3.1.1.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte das plantas, sendo o polímero natural mais abundante da Terra, com uma produção anual de mais de 50 bilhões de toneladas.⁹ A unidade repetitiva da celulose é composta por duas moléculas de glicose eterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Esta unidade repetitiva, conhecida como celobiose, contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações hidrogênio intra e intermolecular. Devido a essas ligações hidrogênio há uma forte tendência da celulose formar regiões cristalinas que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento. A celulose de algodão possui cadeias mais ordenadas, apresentando cristalinidade de aproximadamente 70%, enquanto a celulose de árvores apresenta índice de

cristalinidade ao redor de 40%.⁹ Na Figura 2, apresenta-se a formação da molécula de celulose via condensação da glicose.



n = unidade repetida (glucose)

Figura 2 - Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D-glucose.¹⁰

3.1.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses ocorrem em associação íntima com a celulose e a lignina e contribuem para a rigidez da parede celular das plantas em tecidos lignificados. As hemiceluloses constituem cerca de 20 a 30% do total de massa seca dos tecidos de xilema e têm uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares, dependendo do tipo de planta, sendo classificadas como xilanas, unidades de β -1,4-D-xilose ligadas, mananas, unidades de β -1,4-D-manose ligadas, arabinanas, unidades de α -1,5-L-arabinose ligadas e galactanas, unidades de β -1,3-D-galactose ligadas.¹¹

Comparadas com a celulose, por apresentar somente regiões amorfas, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos. São bastante hidrofílicas, apresentam baixo peso molecular em comparação com a celulose e considerável grau de ramificações entre suas cadeias,

com natureza amorfa e grau de polimerização (GP) variando entre 100 a no máximo 200.¹² As hemiceluloses em biomassa agrícola, como palhas e gramíneas, são compostas principalmente de xilana (Fig. 3), enquanto que as de madeira macia contêm principalmente glucomanan.

As hemiceluloses são ligadas através de ligações hidrogênio com as microfibrilas de celulose na parede celular da planta e também são covalentemente ligadas a lignina, formando em conjunto com a celulose uma estrutura altamente complexa.

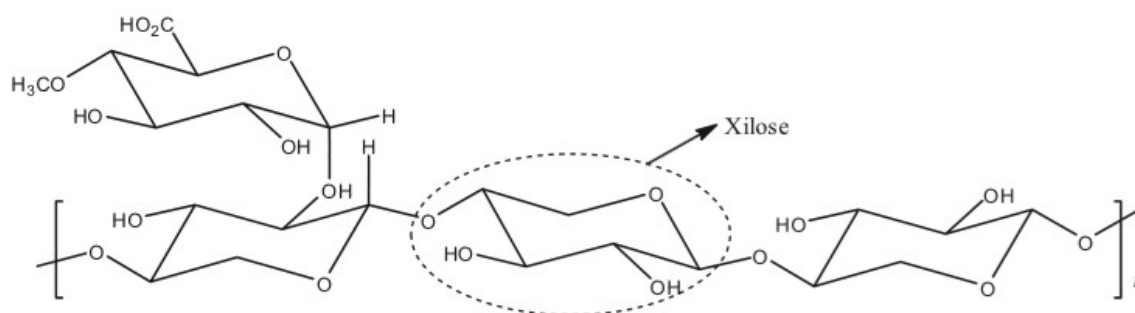


Figura 3 - Representação esquemática da hemicelulose¹³

3.1.1.3 Lignina

A lignina está associada com a celulose e a hemicelulose na composição de materiais lignocelulósicos. A lignina é um material com estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol, o qual é constituído por um arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano que pode conter grupos hidroxila e metoxila como substituintes no grupo fenil (Fig. 4). As ligações éteres dominam a união entre as unidades da lignina, que apresenta um grande número de interligações. Esta estrutura amorfa atua como um cimento entre as fibrilas e como um agente enrijecedor no interior das fibras. A força de adesão entre as fibras de celulose e a lignina é ampliada pela existência de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e os constituintes da celulose e da hemicelulose. Existe uma grande dificuldade na elucidação química da estrutura da lignina devido ao fato de não haver um método bem estabelecido para isolar a lignina em sua forma nativa.⁹

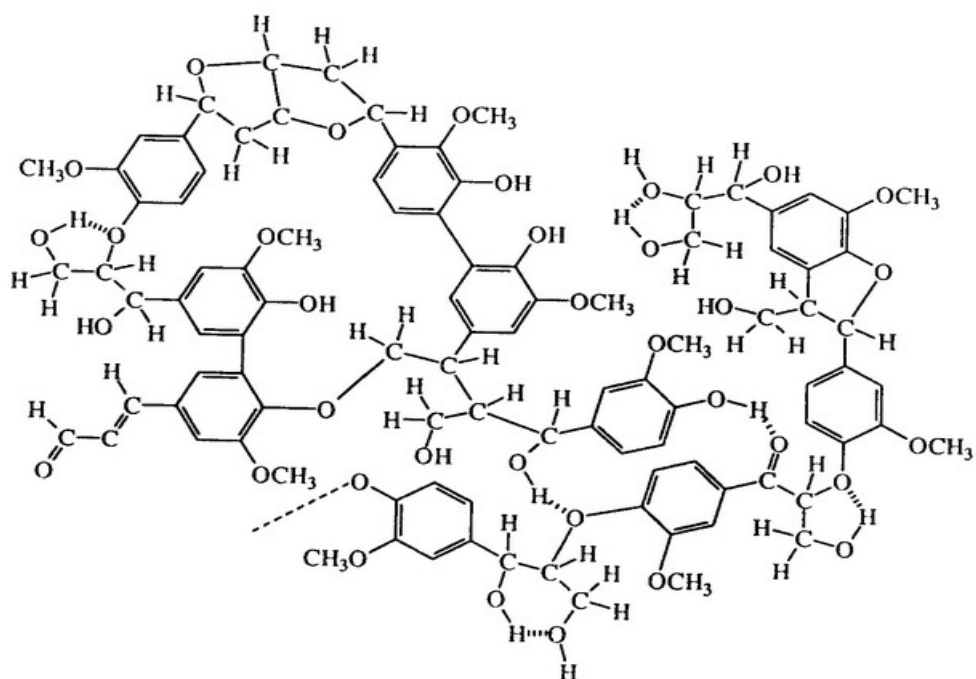


Figura 4: Modelo de estrutura da lignina¹⁴

Do ponto de vista da característica da fibra, a lignina representa um dos principais entraves para processos industriais como a polpação da madeira para fabricação de papel e para produção de açúcares solúveis a partir de biomassa vegetal.¹⁵ Por esse motivo ela deve ser removida do complexo lignocelulósico, através de uma etapa de pré-tratamento, para facilitar o acesso à celulose, por agentes químicos ou biológicos.

3.2 Produção de etanol de segunda geração (2G)

Pode-se dizer de uma maneira simples que a obtenção de etanol de segunda geração - 2G envolve quatro etapas, conforme o esquema apresentado na Figura 5. A primeira etapa consiste no pré-tratamento da biomassa, visando a remoção da lignina e das hemiceluloses e diminuição da cristalinidade da celulose. A segunda etapa envolve a hidrólise da celulose para produção de glicose. Na terceira e quarta etapas ocorrem os processos de fermentação e destilação, respectivamente, como acontecem no processo clássico de produção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar.

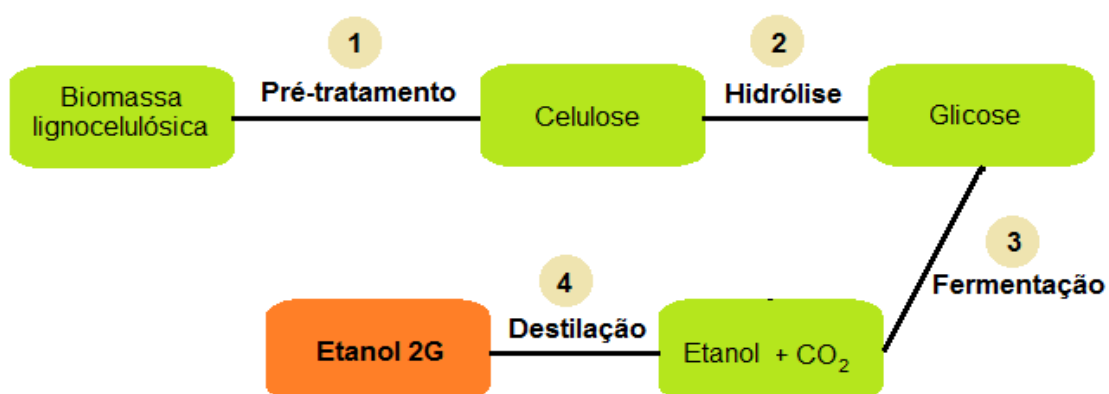


Figura 5 - Esquema das etapas envolvidas na produção de etanol de segunda geração (2G)

3.2.1 Pré-tratamentos

Os processos de pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos representam uma etapa imprescindível na rota de produção de etanol 2G, pois objetiva separar a matriz de lignina, solubilizar a hemicelulose e reduzir a cristalinidade da celulose, para que a mesma fique mais acessível às hidrólises biológicas e químicas.¹⁶

Para ser considerado eficaz, o pré tratamento deve diminuir o grau de polimerização das moléculas de celulose, ser capaz de eliminar a lignina para evitar formação de subprodutos inibidores do processo de fermentação e, principalmente, ser economicamente viável. O desenvolvimento de pré tratamentos eficientes é uma das mais urgentes prioridades para que a produção de etanol 2G se torne um processo viável e competitivo.¹⁷ A Figura 6 ilustra o efeito dos pré-tratamentos na biomassa.

Existem diversos tipos de pré-tratamentos, com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e conseqüente impacto nas etapas subseqüentes. Os métodos de pré-tratamento são divididos em diferentes categorias: físicos (moagem e trituração), físico-químicos (Pré-tratamento a vapor/auto-hidrólise, hidrotérmicos e oxidação úmida), químicos (alcalino, ácido diluído, os agentes oxidantes, e solventes orgânicos), biológicos, ou uma combinação destes.¹⁶

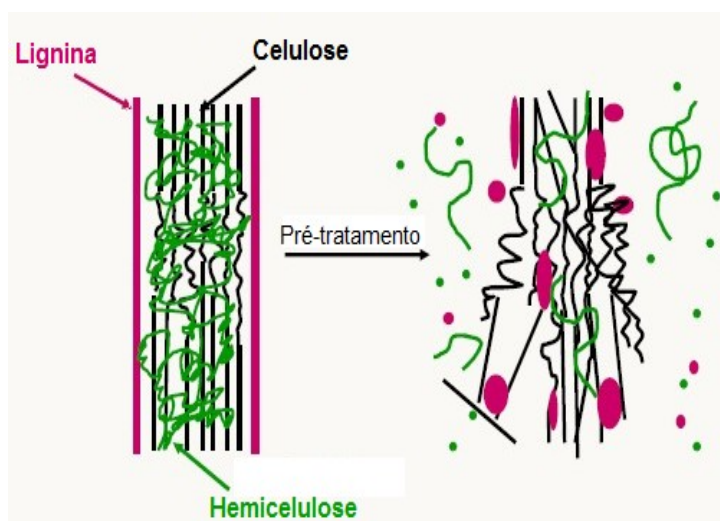


Figura 6 - Diagrama esquemático do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica¹³

Dentre estes métodos, os pré-tratamentos químicos e combinados têm recebido uma maior atenção, já que removem a lignina sem degradar a cadeia celulósica. Outros processos também bastante estudados são os de explosão com CO₂ e tratamento com água quente. Na Tabela 2 estão resumidos os pré-tratamentos mais citados hoje, suas limitações, vantagens e desvantagens.

Tabela 2 - Resumo de vários processos utilizados para o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica^{18, 19, 20}

Processo de pré-tratamento	Vantagens	Limitações e desvantagens
Trituração mecânica	reduz a cristalinidade da celulose.	não é suficiente para aumentar a taxa de conversão de açúcar; não remove a lignina.
Explosão a vapor	provoca a degradação da hemicelulose e transformação da lignina; relação custo-benefício.	destruição de uma parte da fração do xilano; ruptura incompleta da matriz lignina-carboidratos; geração de compostos inibidores a microrganismos.
Ozonólise	reduz o teor de lignina; não produz resíduos tóxicos.	necessidade de grande quantidade de ozônio; processo caro.

Continuação (Tabela 2)

Processo de pré-tratamento	Vantagens	Limitações e desvantagens
AFEX	aumenta a área de superfície acessível, retira a lignina e hemicelulose até certo ponto; não produz inibidores de processos a jusante.	não é eficiente para biomassa com alto teor de lignina; alto custo e elevado impacto ambiental causado pela amônia.
Oxidação úmida alcalina	Formação mínima de inibidores; Remoção eficiente de lignina; Processo exotérmico: pouca energia necessária no processo.	Custo de oxigênio e catalisador alcalino (Na_2CO_3).
Pré-tratamento com ácido diluído	hidrolisa hemicelulose a xilose e outros açúcares; altera a estrutura da lignina.	custo elevado; equipamentos resistentes à corrosão; formação de substâncias tóxicas.
Pré-tratamento alcalino	remove as hemiceluloses e lignina; aumenta a área superficial acessível.	longo tempo de permanência exigido; sais irreversíveis formados e incorporados na biomassa.
Organosolv	hidrolisa lignina e hemicelulose.	os solventes devem ser drenados a partir do reator, evaporados, condensados e reciclados; alto custo.
Biológico	degrada a lignina e hemicelulose; baixa energia requerida.	taxa de hidrólise é pequena; velocidade baixa.

3.2.1.1 Explosão a vapor ou auto-hidrólise

A utilização da técnica de explosão a vapor para o pré-tratamento da biomassa vegetal se mostra uma das principais alternativas para a viabilização de uma rota de produção de etanol de segunda geração. Essa tecnologia separa os principais constituintes da biomassa (celulose, hemicelulose e lignina) e aumenta a susceptibilidade à bioconversão.

Este processo consiste na exposição do material lignocelulósico em um vapor de água saturado à alta pressão por um determinado tempo em um reator, seguido de uma descompressão brusca em condições atmosféricas. Durante o processo da explosão a vapor, a estrutura do material lignocelulósico é modificada por agentes químicos e físicos. As moléculas de vapor d'água, à pressão e temperatura elevadas, penetram na estrutura da biomassa e, no momento da explosão, estas se expandem, fazendo com que as ligações químicas, que mantêm os componentes macromoleculares da biomassa fortemente unidos, se quebrem.²¹

Diversos fatores, dentre eles, temperatura, pressão, tempo de residência do material no reator e teor de umidade da biomassa, influenciam diretamente na eficácia do pré-tratamento. Por isso, a escolha da condição ideal de operação do pré-tratamento é fundamental para a recuperação dos principais componentes da parede celular, bem como na eficiência das etapas subsequentes de sacarificação da celulose e de fermentação dos hidrolisados obtidos.

Segundo Rabelo (2010)²², a ultrapassagem do tempo ideal, além de degradar as estruturas lignocelulósicas, degrada as ligações glicosídicas o que gera subprodutos de difícil fermentação e inibidores que são tóxicos aos microrganismos fermentativos, e uma etapa de detoxificação pode ser necessária para eliminação desses inibidores. Já em temperaturas e pressões baixas a estrutura recalcitrante lignocelulósica não degrada por completo gerando baixas concentrações de celulose sacarificada.

O processo elimina a maior parte das hemicelulose, facilita a posterior hidrólise da celulose, e tem a grande vantagem de não utilizar nenhum reagente químico.²³

Após o pré tratamento, a biomassa, em suspensão aquosa, é mantida sobre agitação mecânica de 1 hora na temperatura ambiente. A suspensão é então filtrada e as fibras, retidas no papel de filtro, são dispersas em água para serem submetidas

a uma nova etapa de lavagem aquosa.²¹

Uma vantagem da utilização da tecnologia de explosão a vapor consiste na solubilização da lignina pela simples adição de algum solvente orgânico ou acidificação da água. Outra vantagem da utilização da técnica de explosão a vapor consiste nos resultados obtidos da hidrólise enzimática sobre a biomassa oriunda que mostram uma eficiência de 90% contra apenas 15% utilizando resíduos não tratados.²⁰

A capacidade de tratamento de uma maior carga de sólidos aproxima esta técnica das necessidades industriais, associados aos elevados rendimentos de carboidratos e baixos custos de capital.²⁴

Apesar de se mostrar promissora ainda faltam ajustes para a aplicação desta técnica em escala industrial, principalmente quanto à viabilidade econômica do processo. Há limitações deste tipo de pré-tratamento para aplicação industrial, em usinas sucroalcooleiras, que utilizaram o bagaço de cana de açúcar, já que as etapas do processo de explosão a vapor é comprometida por não haver equipamentos em escala industrial capazes de realizar as operações a uma taxa viável.²⁵

3.2.1.2 Pré-hidrólise ácida

Uma pré hidrólise com ácido sulfúrico diluído pode ser usada para promover a hidrólise das hemiceluloses. Após o tratamento obtém-se um hidrolisado contendo açúcares simples (xilose, glicose, arabinose e galactose) e um resíduo sólido constituído de celulose e lignina. A lignina é removida por extração alcalina para que a celulose possa ser hidrolisada. Esse pré tratamento aumenta a reatividade da celulose na hidrólise enzimática.²³ Apesar do ácido sulfúrico ser mais comumente utilizado, outros ácidos podem ser empregados, como o clorídrico e o fosfórico.

Os ácidos liberam prótons que quebram as ligações entre açúcares monoméricos e as cadeias poliméricas formadas pelas hemiceluloses e celulosas. A quebra dessas ligações libera uma série de compostos, principalmente açúcares como a xilose, glicose e arabinose, mas também libera oligômeros, furfural e ácido acético. A celulose permanece praticamente intacta, pois as ligações presentes na celulose são mais fortes.

As desvantagens do pré tratamento ácido são a possibilidade de haver

degradação dos açúcares, a formação de substâncias inibidoras da fermentação, como alguns ácidos orgânicos, compostos fenólicos e furânicos, o custo dos reatores, que devem ser altamente resistentes à corrosão, além de ser pouco eficiente na despolimerização da celulose.

A concentração do ácido, a temperatura e o tempo de exposição influenciam a quantidade de açúcares hidrolisados, a degradação desses carboidratos e a formação de subprodutos inibidores da fermentação. Relatos na literatura indicam que a condição ótima para esse tipo de pré tratamento foi possível tratando-se bagaço de cana e outros tipos de biomassa lignocelulósica com solução de H_2SO_4 2% a 122 °C por 60 minutos.²³

Conforme apresentados, nenhum dos pré-tratamentos é considerado suficientemente eficaz para que a etapa posterior de hidrólise seja realizada com sucesso. A remoção incompleta das hemiceluloses e da lignina, a formação de compostos inibidores da fermentação, o alto custo do processo, o baixo grau de despolimerização da celulose, entre outros inconvenientes gerados nos processos de pré-tratamentos, constituem obstáculos para produção de etanol 2G.

Alguns trabalhos na literatura defendem a utilização de pré-tratamentos combinados como uma alternativa interessante para a separação dos componentes da biomassa. Ferreira, Solaliendres (2012)²⁶, realizaram pré-tratamentos ácidos em duas etapas, a camada de hemicelulose é hidrolisada na primeira etapa, com ácido diluído, e na segunda etapa, temperaturas mais elevadas são aplicadas a fim de intensificar a hidrólise da celulose. Ogeda (2010)²⁷, sugere que pré-tratamentos alcalinos são eficientes para a remoção da lignina e a hemicelulose deve ser hidrolisada pelo uso de hemicelulases.

Lofrano (2013)²⁸, define a explosão a vapor como um método eficaz para alteração da estrutura da parede celular, a hemicelulose é hidrolisada, a celulose constitui a fração insolúvel e os resíduos de lignina modificada quimicamente são extraídos por solução básica fraca, etanol ou agentes oxidativos alcalinos.

Ainda que a celulose possa ser isolada pelos processos combinados descritos acima, a cristalinidade representa um desafio em termos de acessibilidade e reatividade da fibra aos agentes hidrolíticos ácidos ou biológicos.

Nesse contexto, a redução da cristalinidade da celulose poderia ser viabilizada a partir da modificação química da celulose pela substituição das hidroxilas por grupos menos hidrofílicos.

3.2.2 Modificação química da celulose

As propriedades químicas e físicas do biopolímero celulose são, em grande parte dependente da sua estrutura específica. A estrutura polimérica de celulose foi demonstrada pela primeira vez em 1920 por Staudinger.²⁹ Ao realizar reações de acetilação e di-acetilação da celulose reconheceu que a estrutura não era baseada simplesmente numa agregação relativamente pequena de oligômeros em forma de anel de anidroglicose, mantidas unidas por ligações secundárias. Em vez disso, as unidades de anidroglicose (UAGs) foram encontradas ligadas umas as outras por ligações covalentes, formando uma grande cadeia macromolecular.

A compreensão da estrutura da celulose é um pré-requisito para controlar a sua modificação. A Figura 7 mostra a estrutura molecular da celulose produzida a partir de repetições de unidades β -D-anidro-glucopiranosose que estão unidas entre si de forma covalente através de funções de acetal entre o grupo equatorial do átomo de carbono C4 e o átomo de carbono C1 (ligações β -1,4-glicosídicas).²⁹ A estabilidade química da molécula de celulose é determinada pela sensibilidade ao ataque hidrolítico das ligações β -1,4-glicosídicas entre as unidades repetitivas de glicose.³⁰

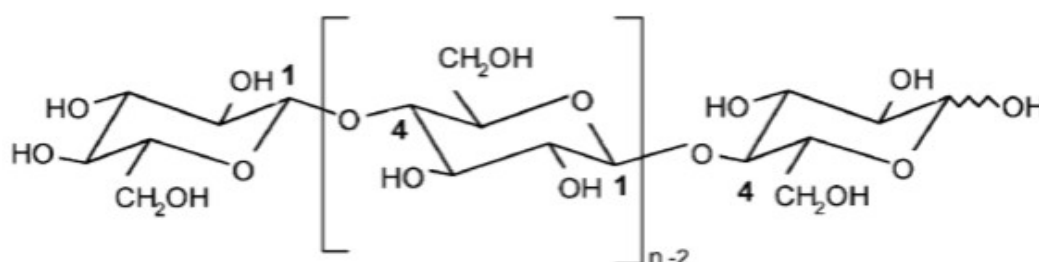


Figura 7 - Estrutura molecular da celulose ($n = GP$, grau de polimerização).³¹

A reatividade química e as propriedades físicas da celulose são afetadas pela sua composição química e sua estrutura supramolecular. Além disso, é sabido que a estrutura da celulose apresenta ambos os domínios amorfos (baixa ordem) e cristalinos (de alta ordem) com um grau de cristalinidade compreendida entre 40%-70% dependendo do tipo da biomassa.

A morfologia da celulose afeta a sua reatividade: os grupos hidroxilas na

região amorfa são mais acessíveis e reativos em comparação com aqueles na região cristalina,²⁹ enquanto que os grupos hidroxilas que se encontram na superfície das fibras de celulose são também altamente reativos, independentemente do nível de cristalinidade.

A celulose apresenta uma elevada energia de coesão devido a estes grupos hidroxilas, formando redes complexas e fortes ligações hidrogênio entre e dentro das cadeias, e é insolúvel em água e em solventes mais comuns por causa deste fenômeno.²⁹ Como resultado, e devido ao fato de que a celulose é geralmente sólida suspensa num meio líquido, as reações de celulose ocorrem normalmente em condições heterogêneas.

Em geral, a celulose é muito reativa devido à presença de grupos hidroxilas, no entanto, a reatividade dos três grupos hidroxila são afetados pelos efeitos estéricos da estrutura supramolecular da celulose. A reatividade relativa dos grupos hidroxilas da celulose são consideradas como $\text{OH-C}_6 \gg \text{OH-C}_2 > \text{OH-C}_3$. O grau de substituição (GS) é o número médio de grupos hidroxila por unidades de glicose que tenham sido substituídos. Se todos os três grupos hidroxila de cada uma das unidades de glicose são substituídos, o que equivale a um $\text{GS} = 3,0$.

Muitos produtos químicos industriais importantes ou combustíveis, tais como o etanol, hidrocarbonetos, cetonas e ácidos carboxílicos podem ser produzidos a partir da hidrólise de celulose e a subsequente fermentação de sacarídeos.³² No entanto, as substâncias produzidas a partir da celulose atualmente podem custar muito mais do que os da indústria petroquímica. Comparado com outras fontes "verdes", tais como amido, os produtos derivados de celulose têm maior custo principalmente pela dificuldade de hidrólise.

O baixo rendimento de sacarídeo é, geralmente, devido à elevada estabilidade e resistência da celulose ao ataque químico. Por isso, os pré-tratamentos de celulose são necessários antes da hidrólise, os quais têm sido amplamente estudados para atingir um rendimento elevado de sacarídeos fermentáveis, como foi relatado.

Alguns estudos mostram que a celulose se torna instável e, assim, mais fácil de ser hidrolisada após certas modificações químicas (Borsa et al., 1990, Karst et al. de 2006 e Karst e Yang, 2007). Borsa et al. mencionou que a carboximetilcelulose com baixo grau de substituição pode ser hidrolisada com mais facilidade do que a celulose original. Além disso, a hidrólise de ligações β -1,4-glicosídicas é aumentada

pela ligação covalente de corantes reativos com a celulose, o que induz uma perda de força abundante e um grau decrescente de polimerização. Este fenômeno é chamado "concurso reativo" na indústria têxtil. Karst et al. (2006) descobriu que vários grupos de enxerto para a celulose pode aumentar a hidrólise ácida de ligações β -1,4-glicosídicas, e o grau de hidrólise aumenta com o aumento do tamanho dos grupos substituintes.³³

Observa-se que a modificação química pode ser útil para aumentar o rendimento de sacarídeos na hidrólise da celulose. Como resultado, a modificação da celulose abre possibilidades para o etanol celulósico se tornar mais viável e mais competitivo.

Tal como descrito anteriormente, para melhorar a acessibilidade e reatividade da celulose, e assim promover a obtenção de novos derivados de celulose para a aplicação industrial específica, a modificação química da celulose é uma necessidade. A celulose pode ser derivatizada de várias maneiras, principalmente pela substituição dos seus grupos hidroxilas. A modificação química da celulose é feita com o intuito de melhorar uma propriedade ou obter um novo produto. Esta possibilidade de derivação de celulose abre janelas de oportunidades e tem, como resultado, uma ampliação do seu uso.³⁰

Muitas modificações químicas da celulose são descritas na literatura com o intuito de alterar algumas de suas propriedades. Esterificações e eterificações dos grupos hidroxila da celulose, são duas das modificações mais comuns.³⁴

O acetato de celulose (Figura 8) é um dos derivados da celulose de grande importância comercial, devido a sua larga aplicação em fibras, plásticos, filmes fotográficos, filtros para cigarros, dentre outros.³⁵ Na produção de cigarro, o acetato de celulose é utilizado como filtro, também chamado de cabo acetato.

Na unidade Cachoeirinha-RS da Souza Cruz, durante o processo de produção de cigarros são gerados, entre outros resíduos como papel, papelão, madeira, pó de fumo, mais de 114 toneladas de resíduos de cabo acetato por ano.

Winck (2011)³⁶, estudando a viabilidade técnica da queima de resíduos gerados em uma indústria de tabaco para obtenção de energia térmica, concluiu que os resíduos, pó de fumo, papel, papelão, cigarro triturado e madeira poderiam ser misturados e queimados para aproveitamento da energia térmica. Em contrapartida, o cabo acetato (acetato de celulose), ao oxidar-se, libera gases ácidos e oxidantes, o que inviabiliza sua queima devido aos cuidados que devem ser tomados tanto com

os equipamentos, os quais podem ser danificados, quanto com as emissões geradas. Diante disso, a utilização dos resíduos de acetato de celulose para a produção de etanol 2G seria uma saída interessante para o reaproveitamento desse material. Com base nos dados obtidos, seria possível produzir, a partir desses resíduos, aproximadamente 50 mil litros de etanol, o qual poderia ser revendido ou utilizado na própria indústria.

Durante o processo de hidrólise do acetato de celulose, além da obtenção da glicose, ácido acético também é gerado como coproduto, o qual poderia ser recuperado e utilizado no próprio processo de produção do acetato de celulose.

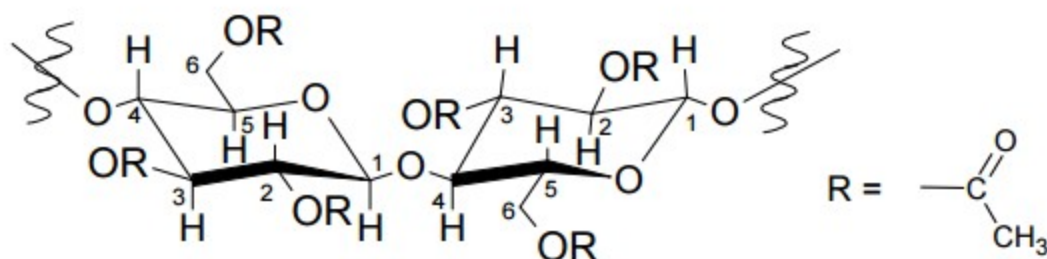


Figura 8 - Estrutura do acetato de celulose³⁷

3.2.2.1 Obtenção de acetato de celulose

O acetato é produzido pela substituição dos grupos hidroxila das unidades de glicose por grupos acetila. Assim, pode se obter materiais com diferentes graus de substituição (GS). O GS (número médio de grupos acetila por unidades glicosídicas) pode variar de zero, para a celulose, até três para um triacetato.³⁸

O acetato de celulose pode ser obtido a partir da reação da celulose com uma mistura de ácido acético e anidrido acético, na presença de ácido sulfúrico ou perclórico como catalisador. A Figura 9 mostra o esquema da reação de acetilação da celulose.

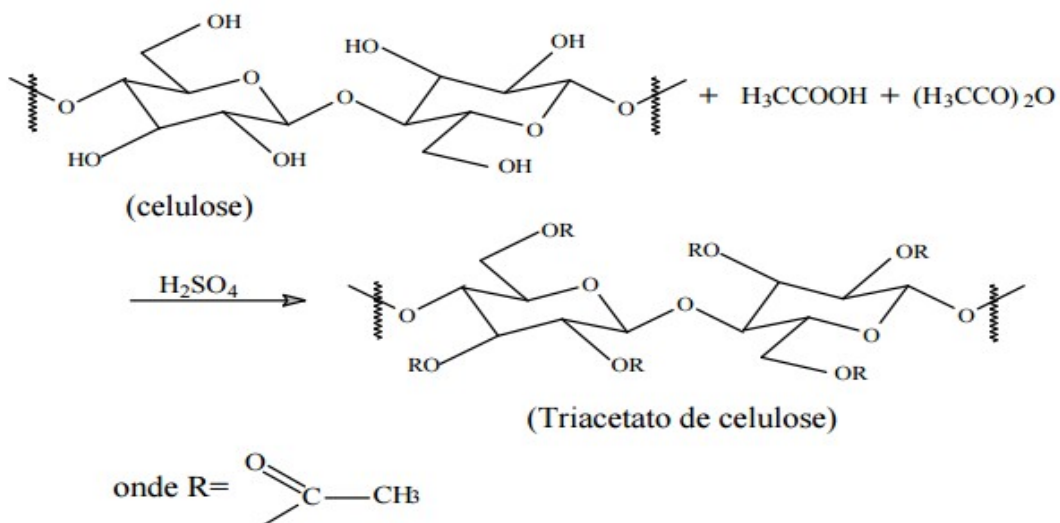


Figura 9 - Esquema da reação de produção do triacetato de celulose³⁷

Quando as cadeias de celulose tornam-se suficientemente acetiladas, desprende-se do cristal tornando-se solúveis no meio reacional. Em consequência o cristal torna-se quebradiço e isso pode ser identificado por uma série de entalhes de onde foram retiradas as cadeias acetiladas. A Figura 10 apresenta uma representação esquemática das reações de acetilação propostas por Sassi e Shanzy.³⁹

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar para produção de acetato de celulose é uma alternativa interessante pela possibilidade de agregar valor ao bagaço.

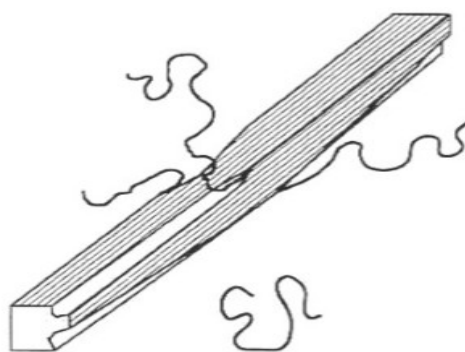


Figura 10 - Representação esquemática descrevendo o início da acetilação de um microcristal de celulose. Três cadeias estão parcialmente acetiladas e uma completamente acetilada que abandonou o cristal³⁷

3.2.3 Hidrólise ácida da celulose

As cadeias poliméricas de celulose podem ser degradadas pelo processo de hidrólise química sob diversas condições e apresentando resistência ou não a reação. Normalmente, esta deterioração é acompanhada por uma modificação química da molécula de celulose, bem como um aumento no poder de redução e o desenvolvimento de grupos reativos ao longo da cadeia polimérica. A estrutura microcristalina caracteriza a resistência e boa estabilidade à cadeia celulósica. Já a celulose amorfa é intermediária ao ataque químico.⁴⁰ Portanto, a susceptibilidade a deterioração aumenta com a diminuição do grau de polimerização.

Os processos de hidrólise ácida de material lignocelulósico se dividem em dois principais grupos: processos que utilizam ácidos concentrados e processos que utilizam ácidos diluídos. Nestas condições podem-se empregar distintos ácidos incluindo o ácido sulfúrico, clorídrico, fluorídrico, fosfórico, nítrico e fórmico.

Os processos que envolvem ácidos concentrados são operados em baixas temperaturas e produzem maiores rendimentos de hidrólise, porém as grandes quantidades de ácidos usadas causam problemas associados com a corrosão do equipamento, além dos custos com de recuperação e/ou neutralização do ácido serem altos.

A hidrólise por ácido diluído tem a vantagem de se utilizar menor concentração do ácido. Entretanto, devido a elevada cristalinidade da celulose, para melhorar a eficiência da reação de hidrólise, altas temperaturas são requeridas para a obtenção de taxas de conversão aceitáveis. Adicionalmente, as altas temperaturas empregadas aumentam também as taxas da decomposição dos açúcares liberados e de corrosão dos equipamentos. Os produtos da degradação do açúcar podem também causar a inibição no estágio subsequente da fermentação. O rendimento máximo em glicose é obtido com o uso de temperatura elevada e baixo tempo de residência, mas mesmo nestas situações, o rendimento de glicose situa-se entre 50 e 60% do valor teórico.⁴¹

O mecanismo da reação de hidrólise da celulose foi investigado durante muitos anos por diversos pesquisadores e o principal mecanismo molecular de hidrólise ácida que foi confirmado através de vários estudos é apresentado na Figura 11.

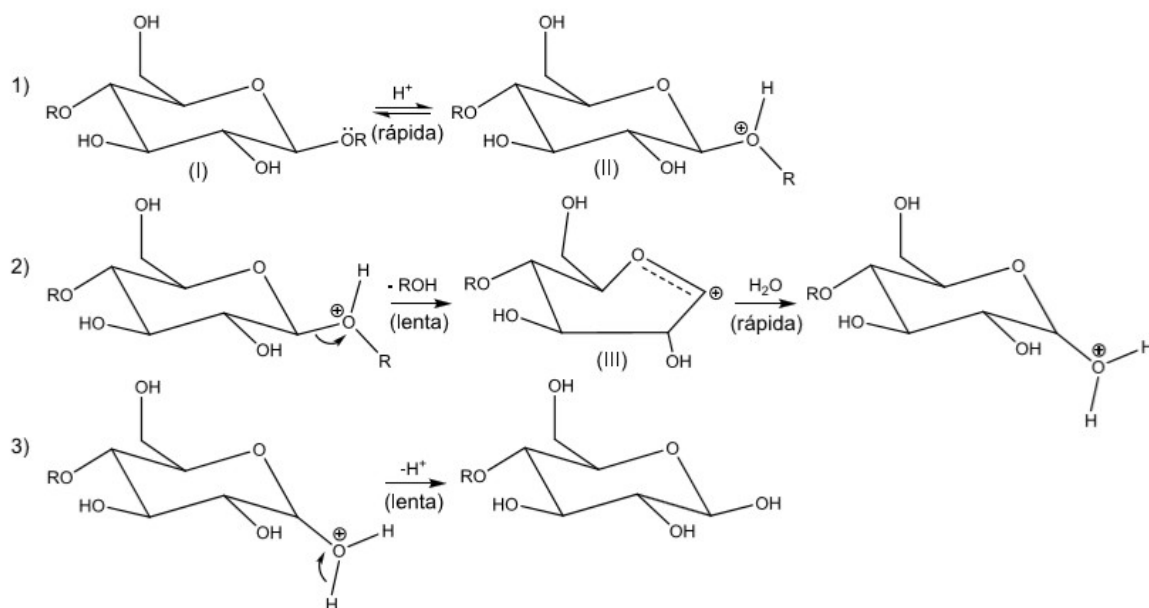


Figura 11 - Esquema representativo do mecanismo de hidrólise ácida das ligações glicosídicas da celulose⁴²

O mecanismo de hidrólise ácida que leva a quebra das ligações glicosídicas procede-se em três etapas. A primeira etapa começa com um próton de um catalisador ácido que interage rapidamente com o oxigênio glicosídico que une as unidades β -D-anidro-glicose (I) formando o ácido conjugado (II). A segunda etapa é a quebra da ligação C – O do ácido conjugado com a formação do íon carbônio cíclico que adota uma conformação de meia cadeira (III). Em uma terceira etapa, uma unidade de β -D-anidro-glicose e um próton são liberados após uma rápida adição de água.⁴²

Altos rendimentos de glicose e altas taxas de reação não são simplesmente alcançados pela remoção de lignina e hemiceluloses da matéria-prima lignocelulósica. Mesmo materiais celulósicos que nunca tenham tido lignina e hemiceluloses associados a eles, por exemplo, o algodão, são difíceis hidrolisar sem pré-tratamento. Isso porque a celulose é constituída de regiões amorfas e cristalinas. As condições requeridas são relativamente brandas para intumescer as regiões amorfas, mas processos drásticos são requeridos para afetar as regiões cristalinas. Essa característica faz com que ocorra um processo heterogêneo na hidrólise, enquanto as regiões amorfas já foram hidrolisadas à glicose, as regiões cristalinas ainda estão sendo quebradas. E então, na presença de ácido e altas temperaturas

no meio, a glicose formada é degradada, dando origem a subprodutos inibidores da fermentação.

Dessa forma se torna claro que os processos, pré-tratamento e hidrólise, precisam ser estudados conjuntamente, para que seja possível a obtenção de altos teores de glicose e baixos teores de inibidores e assim aumentar a eficiência da fermentação e, conseqüentemente, da produção de etanol 2G.

Nesse contexto, pensar a modificação química como uma etapa de pré-tratamento da celulose, seria primordial para o desenvolvimento de um mecanismo capaz de solucionar os entraves relativos a cristalinidade da celulose que tanto tem corroborado com o insucesso da hidrólise.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

As reações de hidrólise foram realizadas utilizando-se celulose microcristalina (Merck), acetato de celulose, usado na produção de filtros de cigarro, fornecido pelo grupo SOUZA CRUZ® e ácido sulfúrico (H₂SO₄) 95-98% PA (Vetec).

A fermentação alcoólica foi realizada utilizando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* – CAT-1 (levedura para a produção de etanol). Para o meio de cultura foi utilizado: YNB - yeast nitrogen base (SIGMA-ALDRICH).

Os reagentes utilizados para quantificação de glicose no espectrofotômetro UV-vis foi glicose monoreagente (BIOCLIN) e para análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi ácido sulfúrico (H₂SO₄, MERCK CHEMICALS). Os padrões utilizados foram D-glicose (SIGMA-ALDRICH), acetato de sódio anidro (SIGMA-ALDRICH), álcool etílico absoluto 99,8% UV/HPLC (VETEC), 2-hidroximetilfurfural (HMF, SIGMA-ALDRICH) e 2-furfuraldeído (furfural, SIGMA-ALDRICH), sendo todos de grau cromatográfico.

4.2 Análises dos materiais lignocelulósicos

4.2.1 Análise Elementar (CHN)

As amostras foram analisadas quanto aos teores de C, H e N, em um aparelho Perkin PE 2400. As análises foram feitas em duplicata. O teor de oxigênio foi obtido por diferença.

4.2.2 Determinação do grau de substituição (GS) do acetato de celulose

A determinação do grau de substituição foi realizada por uma reação de saponificação seguindo procedimento descrito na literatura.⁴³

Adicionou-se 5,00 mL de hidróxido de sódio 0,25 mol.L⁻¹ e 5,00 mL de etanol a 0,100 g de acetato de celulose e deixou-se a mistura em repouso. Após 24 horas adicionou-se 10,00 mL de ácido clorídrico 0,25 mol.L⁻¹ e a mistura ficou em repouso por mais 30 minutos, em seguida a solução foi titulada com hidróxido de sódio

padronizado com biftalato de potássio, utilizando-se o indicador fenolftaleína. Este procedimento foi repetido por 3 vezes.

4.2.3 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR foram feitos no equipamento Shimadzu IRPrestige-21 equipado com um detector DLATGS, utilizando pastilhas de KBr obtidas por pesagem de misturas preparadas com 2 mg de amostra e 200 mg de KBr de grau espectroscópico. Para cada espectro foram acumuladas 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} , na região de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.4 Análise termogravimétrica (TG) e análise termogravimétrica diferencial (DTG)

As análises termogravimétricas foram feitas em um equipamento modelo TGA-60 Shimadzu. As amostras foram aquecidas de 30 °C até 600 °C na velocidade de aquecimento de $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob atmosfera de nitrogênio a $50\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2.5 Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As análises de calorimetria diferencial exploratória foram realizadas utilizando um equipamento modelo DSC-60 da Shimadzu. As amostras foram aquecidas até 400 °C com velocidade de aquecimento e resfriamento de $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio a $50\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$.

4.2.6 Difração de raios X (DRX) / Cristalinidade

Os difratogramas de raios X da celulose e do acetato de celulose foram realizados em um difratômetro de raios X XRD-7000 da SHIMADZU. A configuração adotada para a análise foi o monocromador com fendas (1, 1, 0,3), operado a 40 kV com uma corrente de 20 mA . A velocidade adotada foi de $1^\circ/\text{min}$, com ângulo 2θ variando de 5 a 60° , usando uma radiação de Cu-K α com comprimento de onda de $0,15418\text{ nm}$.

A cristalinidade da celulose foi encontrada de acordo com um método empírico descrito na literatura⁴⁴, no qual, por meio das medidas das intensidades I_{002}

da reflexão (002), (2θ entre 22 e 23°), e da amorfa lam, medida em $2\theta = 18^\circ$, foi definido um índice de cristalinidade K dado pela equação 1:

$$K = \frac{I(\sim 22/23^\circ) - I(18^\circ)}{I(\sim 22/23^\circ)} \times 100 \quad 1)$$

4.3 Reações de hidrólise dos materiais

Os testes reacionais de hidrólise foram conduzidos em sistema fechado. Foram utilizados frascos de vidro de 50 mL com tampa, devidamente lacrados e colocados numa autoclave à pressão de vapor do sistema. As reações foram conduzidas a 120 °C variando-se a concentração de ácido sulfúrico e o tempo de reação. Na Tabela 3 estão presentes as condições reacionais para cada experimento. Terminada a etapa de reação, os frascos foram retirados da autoclave, resfriados em banho de gelo e os resíduos sólidos foram separados da fração líquida por centrifugação. As frações líquidas contendo o material hidrolisado foram armazenadas em frascos de vidros no refrigerador para posterior quantificação. Todas as reações foram feitas em triplicatas.

Tabela 3 - Condições utilizadas nas reações de hidrólise

Exp.	Biomassa Tipo	Volume de solução	Conc. da sol. H ₂ SO ₄ (% v/v)	Tempo (min)	Siglas	
						massa (g)
1	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	30	C2,5-30
2	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	30	C5-30
3	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	30	C10-30
4	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	30	C15-30
5	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	30	C20-30
6	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	30	A2,5-30
7	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	30	A5-30
8	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	30	A10-30
9	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	30	A15-30
10	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	30	A20-30
11	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	60	C2,5-60
12	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	60	C5-60
13	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	60	C10-60

Continuação (Tabela3)

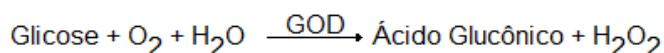
Exp.	Biomassa		Volume de solução	Conc. da sol. H ₂ SO ₄ (% v/v)	Tempo (min)	Siglas
	Tipo	massa (g)				
14	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	60	C15-60
15	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	60	C20-60
16	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	60	A2,5-60
17	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	60	A5-60
18	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	60	A10-60
19	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	60	A15-60
20	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	60	A20-60
21	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	90	C2,5-90
22	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	90	C5-90
23	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	90	C10-90
24	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	90	C15-90
25	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	90	C20-90
26	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	90	A2,5-90
27	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	90	A5-90
28	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	90	A10-90
29	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	90	A15-90
30	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	90	A20-90
31	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	120	C2,5-120
32	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	120	C5-120
33	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	120	C10-120
34	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	120	C15-120
35	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	120	C20-120
36	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	120	A2,5-120
37	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	120	A5-120
38	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	120	A10-120
39	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	120	A15-120
40	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	120	A20-120
41	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	150	C2,5-150
42	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	150	C5-150
43	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	150	C10-150
44	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	150	C15-150
45	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	150	C20-150
46	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	150	A2,5-150
47	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	150	A5-150
48	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	150	A10-150

Continuação (Tabela3)

Exp.	Biomassa Tipo	massa (g)	Volume de solução	Conc. da sol. H ₂ SO ₄ (% v/v)	Tempo (min)	Siglas
49	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	150	A15-150
50	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	150	A20-150
51	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	180	C2,5-180
52	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	180	C5-180
53	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	180	C10-180
54	Celulose	0,5	40,0 mL	15,0	180	C15-180
55	Celulose	0,5	40,0 mL	20,0	180	C20-180
56	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	180	A2,5-180
57	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	180	A5-180
58	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	180	A10-180
59	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	15,0	180	A15-180
60	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	20,0	180	A20-180
61	Celulose	0,5	40,0 mL	2,5	210	C2,5-210
62	Celulose	0,5	40,0 mL	5,0	210	C5-210
63	Celulose	0,5	40,0 mL	10,0	210	C10-210
64	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	2,5	210	A2,5-210
65	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	5,0	210	A5-210
66	Acetato de celulose	0,5	40,0 mL	10,0	210	A10-210

4.3.1 Quantificação da glicose

Para determinar o teor de glicose após hidrólise foi feito um teste enzimático colorimétrico utilizando reagentes da Bioclin[®], denominado glicose monoreagente. Nesse teste a glicose é oxidada enzimaticamente pela glicose oxidase (GOD) de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio, em presença da peroxidase (POD) reage com a 4 - aminoantipirina e Fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de Glicose.

São dois reagentes. Reagente nº 1: reagente enzimático. Contém: tampão (pH 7,0) 36 mmol.L⁻¹, fenol 10 mmol.L⁻¹, 4 - aminoantipirina 0,3 mmol.L⁻¹, azida

sódica $7,7 \text{ mmol.L}^{-1}$, glicose oxidase $> 10.000 \text{ U.L}^{-1}$, peroxidase $> 700 \text{ U.L}^{-1}$. E Reagente nº 2: padrão. Contém: Glicose $100,0 \text{ mg.dL}^{-1}$ ($5,56 \text{ mmol.L}^{-1}$) e conservante.

Foram identificados os seguintes tubos de ensaio contendo: B (Branco), P (Padrão) e numeração de 1 a 10 (Amostras). Para o Branco foram utilizados 3,0 mL do reagente nº 1. O padrão, 3,0 mL do reagente nº 1 e 30 μL do reagente nº 2. E para as amostras foram 3,0 mL do reagente nº 1 e 30 μL da amostra.

Após homogeneizar e colocar em banho-maria, a 37°C , por 10 minutos, realizou-se a leitura das absorvâncias das amostras e do padrão em 505 nm.

A concentração de glicose foi determinada a partir da Equação 2.

$$\text{Glicose (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância da amostra} \times 100}{\text{Absorbância do padrão}} \quad 2)$$

4.4 Testes de fermentação

4.4.1 Preparo dos hidrolisados

Para os testes de fermentação foram necessários preparar volumes maiores de hidrolisados com concentração de glicose de, aproximadamente 50 g.L^{-1} . Portanto, foram utilizados 14 frascos de vidro de 50,0 mL com tampas, contendo, cada um deles, 3,5 g de acetato de celulose e 40,0 mL de solução de H_2SO_4 , 5,0 % (v/v). A reação foi conduzida em autoclave, à pressão de vapor do sistema, temperatura de 120°C , por 180 minutos. Terminada a reação, os hidrolisados foram filtrados, transferidos para um frasco de vidro esterilizado e armazenado, congelado em freezer, para posterior fermentação.

Os procedimentos descritos acima também foram realizados para o preparo de outro hidrolisado de acetato de celulose, agora empregando solução de H_2SO_4 , 10,0 % (v/v), e tempo de reação de 120 minutos.

4.4.2 Microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem Cat1) foi utilizada para a produção de etanol.

4.4.3 Meio de cultura

Para o crescimento celular da levedura em meio de cultura sólido em placas de Petri foi utilizado o meio mínimo YNB - yeast nitrogen base (Sigma Aldrich) contendo 5 g.L⁻¹ de sulfato de amônio adicionando-se 2% de glicose e ágar. O mesmo meio de cultura líquido foi utilizado para o pré inóculo sem a adição de ágar. Todos os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. A glicose autoclavada separadamente e posteriormente misturada ao YNB e ágar quando em meio sólido.

4.4.4 Fermentação

A partir de uma placa contendo células de *S. cerevisiae* crescidas por 3 dias em meio YNB sólido foi feito um pré inóculo contendo 100 mL de meio YNB em um erlenmeyer de capacidade de 1 litro. O crescimento celular ocorreu por aproximadamente 20 horas de crescimento em agitação (200 rpm) e 28 °C. A densidade celular (OD₆₀₀) foi analisada e calculada ao volume proporcional a uma OD₆₀₀ de 0,1 para o volume da fermentação em biorreator. A fermentação foi realizada em biorreator tipo INFORS HT Multifors 2 Cell, volume de 2 L, utilizando YNB e hidrolisado na proporção de 1/1 para um volume inicial de 500 mL. O fermentador foi previamente autoclavado com YNB e o hidrolisado adicionado posteriormente em frasco com conector estéril para o fermentador, já que encontrava-se com pH ácido. O pH do meio foi ajustado para 5,5 inicialmente com KOH 3M e posteriormente com KOH 10 M estéreis por autoclavação, resultando em um volume final de 800 mL na dorna. As células foram inoculadas no fermentador na OD₆₀₀ de 0,1 e iniciou-se a fermentação com agitação de 200 rpm, temperatura de 30 °C e sem aeração. Amostras foram coletadas antes e depois do inóculo (a cada 2 horas) para análise de OD₆₀₀, concentração de glicose, HMF (hidroximetilfurfural), furfural, acetato e produção de glicerol e etanol através do processo fermentativo. A fermentação ocorreu por aproximadamente 25 horas, quando foi observado o término do crescimento exponencial celular. A fermentação foi feita em duplicata.

4.4.5 Análise em HPLC

Para analisar as amostras em HPLC (High-performance liquid

chromatography) as amostras foram diluídas 5 vezes em água mili-Q para um volume de 1 mL. Foi utilizado o HPLC da marca Shimadzu e a coluna utilizada foi Shim-pack SCR-101H (Shimadzu) acoplada ao detector de refração (RID) e de ultravioleta a 210 nm (UV). A temperatura da coluna foi de 50 °C. Os cromatogramas de glicose e etanol foram detectados através do detector RID e HMF, acetato e furfural no UV. Uma solução de ácido sulfúrico 5 mM diluída em água Mili-Q foi utilizada para a fase móvel, com vazão de 0,6 mL.min⁻¹. Foi feito uma curva padrão de glicose, HMF, furfural, acetato de sódio e etanol, com diluições seriadas a partir das seguintes concentrações: 5 g.L⁻¹ (glicose e etanol) 2,5 g.L⁻¹ (furfural e acetato) e 2 g.L⁻¹ (HMF). Todos reagentes foram adicionados nesta concentração inicial em uma única solução e realizado 4 diluições seriadas, finalizando em concentrações de 0,312 g.L⁻¹ (glicose e etanol), 0,156 g.L⁻¹ (furfural e acetato de sódio) e 0,125 g.L⁻¹ (HMF). A partir dos cromatogramas gerados pela curva padrão, foi calculado o valor de cada solução contida das amostras da fermentação, através do shimadzu labsolutions software.

A Figura 12 apresenta um cromatograma com os tempos de retenção dos compostos na coluna gerado a partir de padrões: HMF, 3,62 minutos; furfural 35,7 minutos; acetato, 16,79 minutos, glicose, 10,2 minutos e etanol, 24,0 minutos.

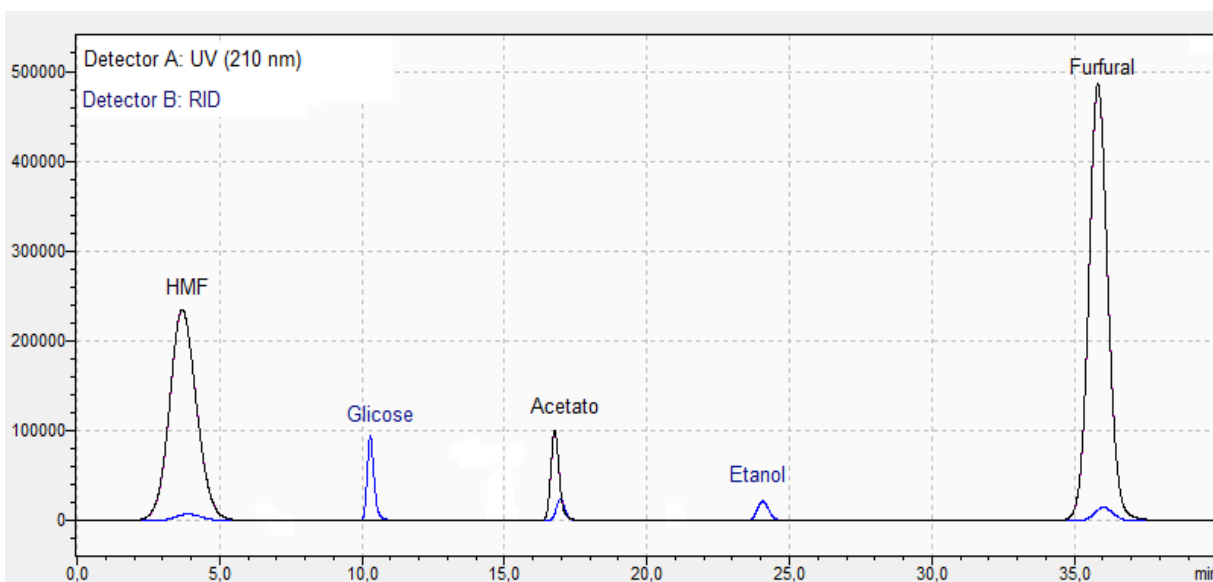


Figura 12 - Tempo de retenção na coluna dos padrões analíticos

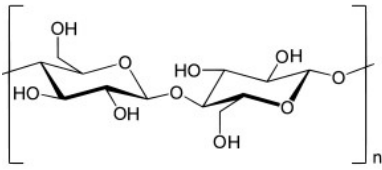
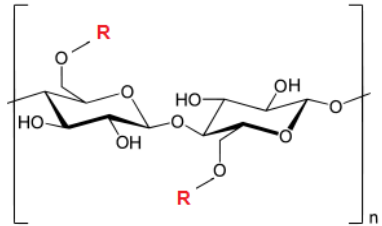
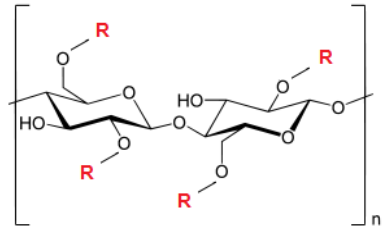
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização dos materiais

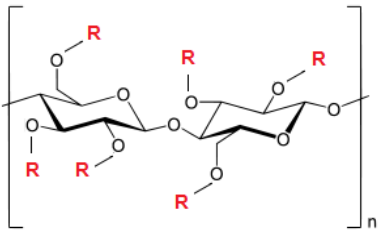
5.1.1 Análise de CHN

As análises de CHN foram feitas para se ter uma previsão a respeito do grau de substituição (GS) do acetato de celulose. Essa previsão foi possível a partir da comparação entre as massas de carbono, hidrogênio e oxigênio, com os valores teóricos das composições centesimais dos diferentes tipos de acetato apresentados na Tabela 4. Essa informação é imprescindível para a obtenção do cálculo do rendimento de glicose nas reações de hidrólise.

Tabela 4 - Fórmulas percentuais dos compostos de acetato e grau de substituição (GS)

Compostos	Fórmula Molecular	Fórmula percentual (%)	GS
 Celulose	$C_{12}H_{20}O_{10}$	C – 44,45 % H – 06,17 % O – 49,38 %	0
 monoacetato de celulose	$C_{16}H_{24}O_{12}$	C – 47,06 % H – 05,88 % O – 47,06 %	1
 Diacetato de celulose	$C_{20}H_{28}O_{14}$	C – 48,78 % H – 05,69 % O – 45,53 %	2

Continuação (Tabela 4)

Compostos	Fórmula Molecular	Fórmula percentual (%)	GS
 <p>Triacetato de celulose</p> <p>$R = \text{CH}_3\text{CO}$</p> <p>Grupo acetila</p>	$C_{24}H_{32}O_{16}$	C – 50,00 % H – 05,56 % O – 44,44 %	3
	C_2H_3O		

Como se pode observar pelos dados da Tabela 5, as porcentagens de CHNO encontradas para a celulose são compatíveis com os resultados esperados.

Comparando os valores obtidos na análise do acetato com os valores teóricos da Tabela 4 verificou-se que, possivelmente, a amostra é constituída por acetato de celulose de GS igual a 2.

Tabela 5 - Resultados das análises de CHN dos materiais

Amostra	% C	% H	% N	% O
Celulose	44,04	6,04	0	49,9
Acetato de celulose	48,35	5,47	0	46,18

5.1.2 Determinações do grau de substituição do acetato de celulose

O grau de substituição, que é o valor médio de grupos acetila (GA) que substituem as hidroxilas nas unidades glicosídicas, foi determinado por via química através de uma reação de saponificação. As análises foram realizadas em triplicata. A representação do mecanismo da reação está descrito na Figura 13.

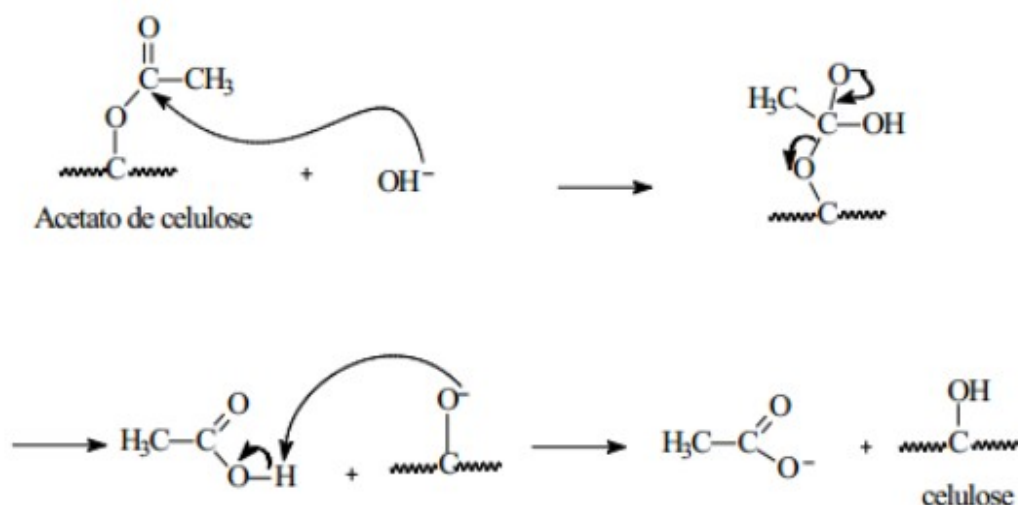


Figura 13 - Representação do mecanismo da reação de saponificação do acetato de celulose.

A saponificação é a reação de hidrólise promovida por uma base. Nesta reação, o íon hidróxido promove um ataque nucleofílico ao átomo de carbono da carbonila do acetato de celulose. Em seguida, um intermediário tetraédrico expelle um íon alcóxido, ocorrendo a transferência de um próton conduzindo ao produto da reação.⁴⁵

O grau de substituição foi calculado de acordo com a equação 3.

$$\%GA = \frac{[(Vb_i + Vb_t)m_b - (V_a \cdot m_a)]M \cdot 100}{m_{ac}} \quad (3)$$

Onde:

%GA = porcentagem de grupos acetila;

Vb_i = volume de hidróxido de sódio adicionado;

Vb_t = volume de hidróxido de sódio obtido na titulação;

m_b = molaridade do hidróxido de sódio;

V_a = volume de ácido clorídrico adicionado;

m_a = molaridade do ácido clorídrico;

M = massa molar dos grupos acetil;

m_{ac} = massa de acetato de celulose utilizada.

Os valores utilizados nos termos da equação são dados abaixo:

$$V_{b_i} = 5,00 \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$m_b = 0,23 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$V_a = 10,00 \times 10^{-3} \text{ L}$$

$$m_a = 0,25 \text{ mol.L}^{-1}$$

$$M = 43,0 \text{ g.mol}^{-1}$$

$$m_{ac} = 0,100 \text{ g.}$$

Segundo Puleo et al³⁸ um triacetato tem 43,5% de grupos acetila o que corresponde a um grau de substituição (G.S.) de 2,88. O valor médio calculado para %GA do acetato de celulose foi de 32,28%. Por esse resultado e, considerando a relação linear entre %GA e o G.S., concluímos que, através de uma regra de três simples, o grau de substituição encontrado foi de $2,13 \pm 0,03$ o que caracteriza um material classificado como diacetato, corroborando com o resultado obtido por CHN.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para a determinação do GS.

Tabela 6 - Volumes de NaOH utilizados na titulação do acetato de celulose, porcentagem de grupos acetila (%GA) e grau de substituição (G.S.)

Volume de NaOH (mL)	(% GA)	G.S.
9,1	31,95	2,11
9,2	32,94	2,18
9,1	31,95	2,11
Média	$32,28 \pm 0,44$	$2,13 \pm 0,03$

5.1.3 Análises por FTIR

Na Figura 14 é mostrado o espectro da celulose microcristalina e do acetato de celulose. Comparando-se os espectros observa-se banda em torno de 3400 cm^{-1} , característica de estiramento vibracional de grupos OH, na celulose. Uma diminuição dessa banda pode ser vista no espectro do acetato devido a substituição das hidroxilas por grupos acetil. No espectro do acetato é possível observar o aparecimento de três bandas características de ligações ésteres: em aproximadamente 1743 cm^{-1} , referente ao estiramento de grupo carbonil (C=O), em 1372 cm^{-1} , referentes às ligações C-H do CH_3 e em 1237 cm^{-1} , referente a ligação

C-O do grupo O-(C=O)-CH₃. Nos dois espectros, aparece uma banda em 2890 cm⁻¹, relacionada ao estiramento das ligações C - H de grupos CH₂. No espectro do acetato, em 2946 cm⁻¹, ocorre uma banda característica do estiramento assimétrico das ligações C-H dos grupos CH₃. Outras bandas comuns aos dois espectros aparecem em: 1642 cm⁻¹, deformação angular da molécula de água absorvida; 1428 cm⁻¹, deformação assimétrica CH₂; 899 cm⁻¹, estiramento C1-O-C4 da ligação glicosídica; 1034 cm⁻¹, estiramento O-H/ C-O.

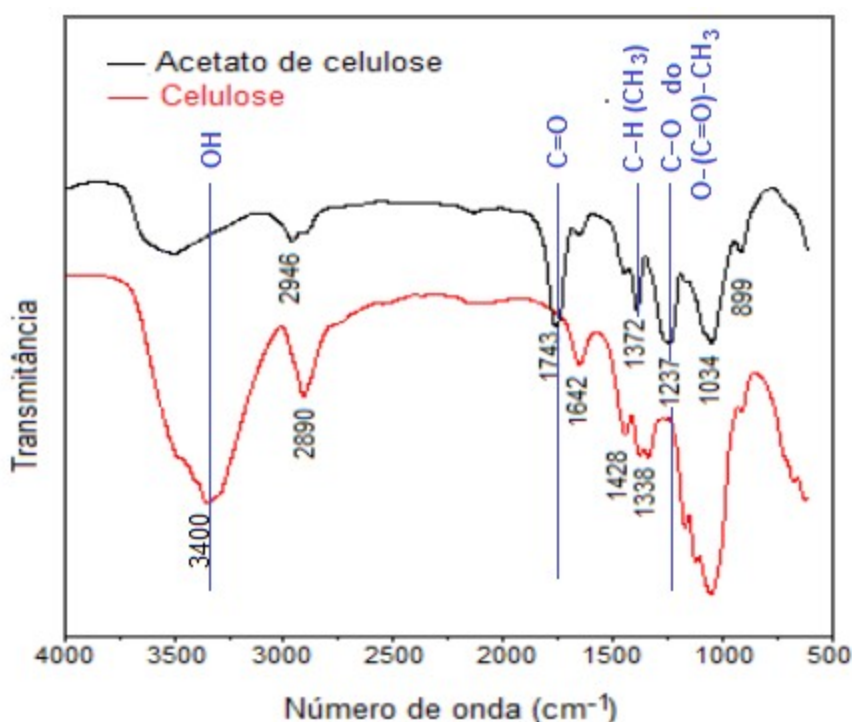


Figura 14: Espectros FTIR (celulose microcristalina e acetato de celulose)

5.1.4 Análises termogravimétricas (TGA e DTG)

Para a amostra de acetato de celulose, observa-se 2 regiões de perda de massa (Fig. 15). A primeira, entre 120° e 300 °C é atribuída à perda de grupos acetila, e a terceira, entre 300° e 400 °C, devido à degradação das cadeias de celulose. A partir de 400 °C ocorre a carbonização dos produtos. Não se observa na curva, a perda de massa, entre 50 a 100 °C, referente à saída de água, indicando que o material é pouco higroscópico.

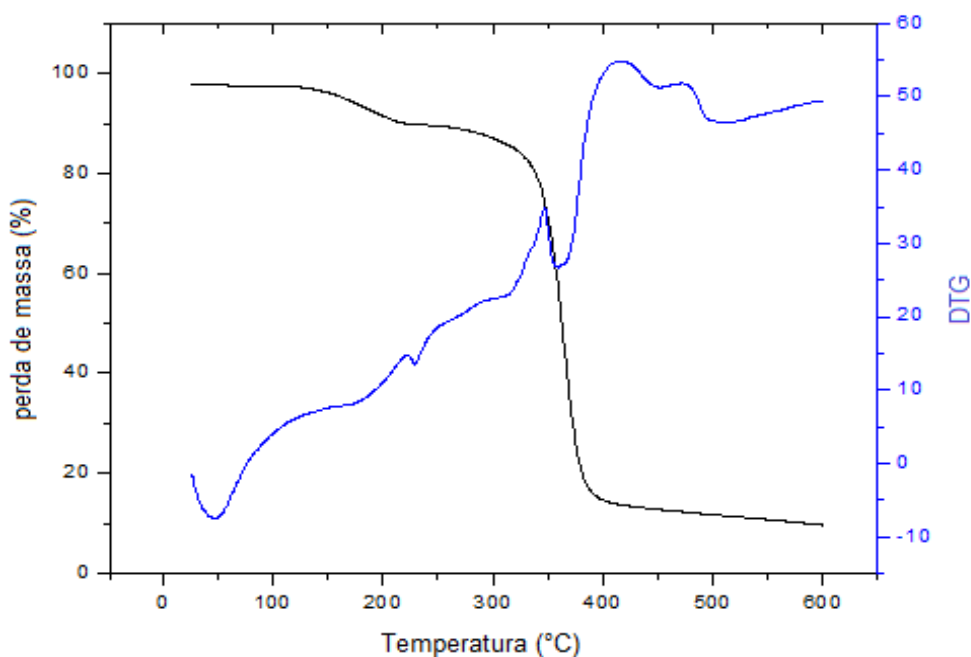


Figura 15: Curvas de TGA e DTG do acetato de celulose

A celulose pode ser classificada como um polímero com estabilidade térmica moderada. Da análise do seu termograma (Fig. 16) verificou-se que possui um comportamento clássico de degradação térmica em duas fases: A primeira região, entre 50° e 100 °C, referente a perda de água e a segunda, entre 260° e 350°C, devido a degradação das cadeias de celulose.

Comparando as curvas de perdas de massas da celulose e do acetato, observa-se que a substituição do OH levou a uma diminuição da estabilidade térmica da celulose, devido a diminuição das suas regiões cristalinas, as quais são termicamente mais resistentes.

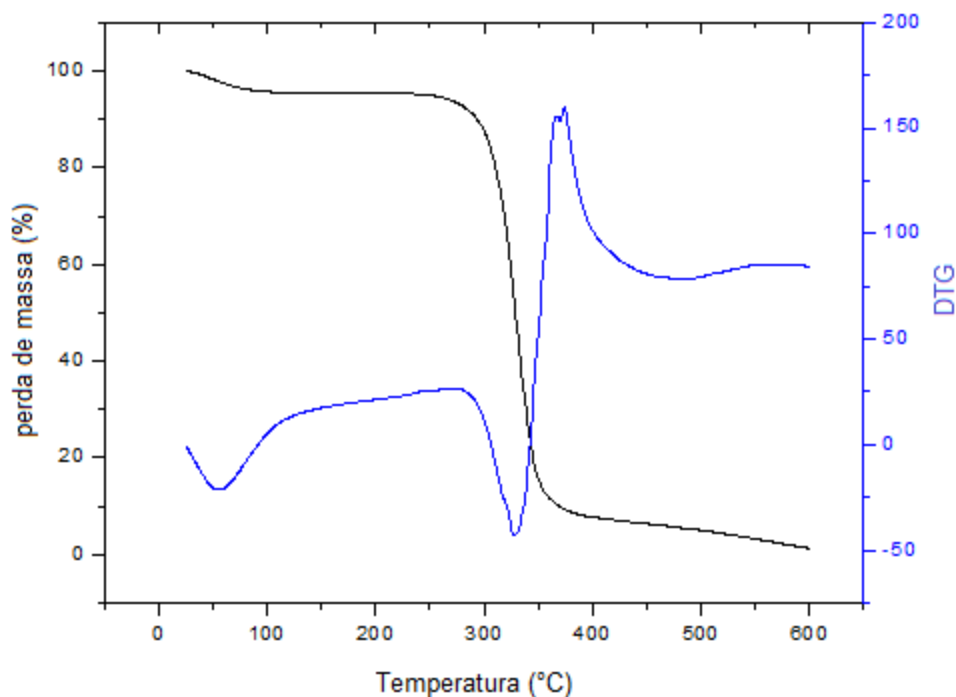


Figura 16 - Curvas de TGA e DTG da celulose

5.1.5 Análises DSC

As curvas de DSC para a celulose e o acetato de celulose (Fig. 17) apresentam picos endotérmicos entre a temperatura ambiente e 100°, este acontecimento é atribuído a dessorção de água ligada às matrizes poliméricas. Além disso, analisando os picos relativos às decomposições dos materiais percebe-se um maior consumo de energia para a decomposição da celulose, pois apresenta uma estrutura altamente cristalina composta de fortes ligações hidrogênio intra e intermolecular, sendo necessária uma grande quantidade de energia para o seu rompimento. O segundo evento em aproximadamente 300 °C atribuído à fusão dos materiais. A degradação térmica também inicia próximo a essa temperatura.

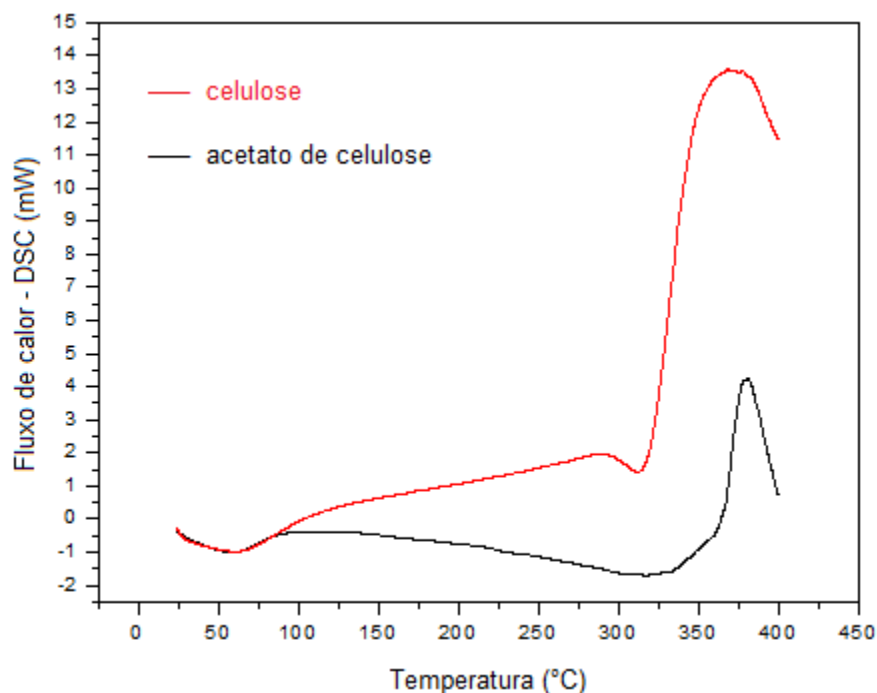


Figura 17: Análises DSC da celulose e do acetato de celulose realizadas em atmosfera de nitrogênio a $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$

5.1.6 Análises das difrações de raios X (DRX)

O estudo de difração de raios X foi realizado com o intuito de avaliar o grau de cristalinidade dos materiais a serem hidrolisados. Esse resultado é de extrema importância para compararmos com o resultado da hidrólise e assim correlacionar a influência da cristalinidade da celulose com o rendimento em glicose.

Os difratogramas de raios X da celulose microcristalina e do acetato de celulose estão representados na Figura 18.

A celulose microcristalina apresenta um padrão típico de DRX de celulose I, com os principais sinais de difração a cerca de 15.0 , 22.5 e 34.5 2θ atribuídos aos planos de difração 101, 002 e 040, respectivamente.⁴⁶ De uma maneira geral, comparando com difratograma da celulose microcristalina, o difratograma de raios X do acetato de celulose mostra um desaparecimento quase por completo dos sinais atribuídos aos planos 101, 002, e 040. A principal difração é localizada em aproximadamente 8° , e citada como a principal característica de semicristalinidade do derivado da celulose acetilada.

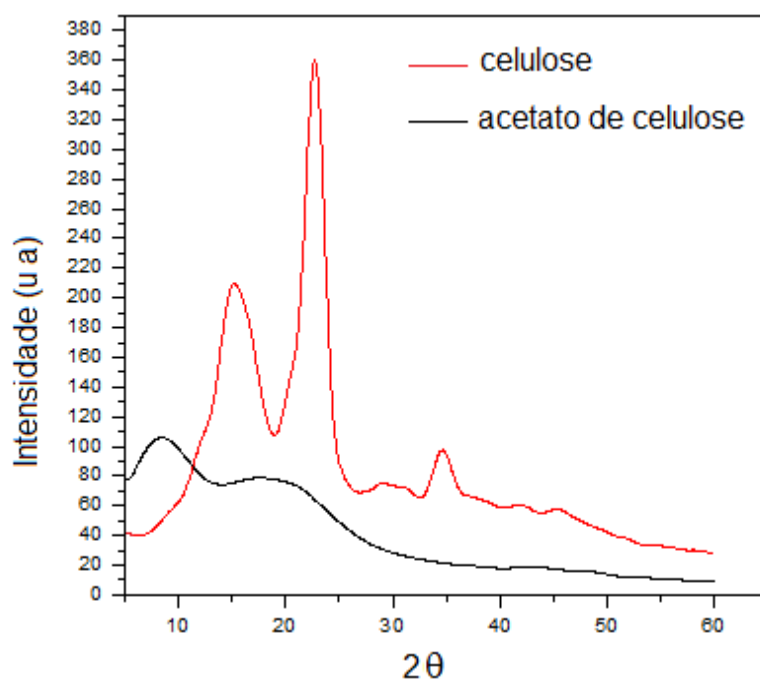


Figura 18 - Difratoogramas de raios X (celulose e acetato de celulose)

O índice de cristalinidade da celulose foi obtido pelo difratograma de raios X, por meio da Equação 1 (item 4.2.6) e é igual a 80,26%. Pela análise das difrações, é possível observar um alargamento ou desaparecimento dessas bandas de difração para o acetato de celulose, indicando uma redução significativa do índice de cristalinidade (IC) desse em relação à celulose. Essa redução ocorre devido a substituição de grupos hidroxila por grupos acetil que possuem um maior volume, como podemos observar no esquema representado na Figura 19.

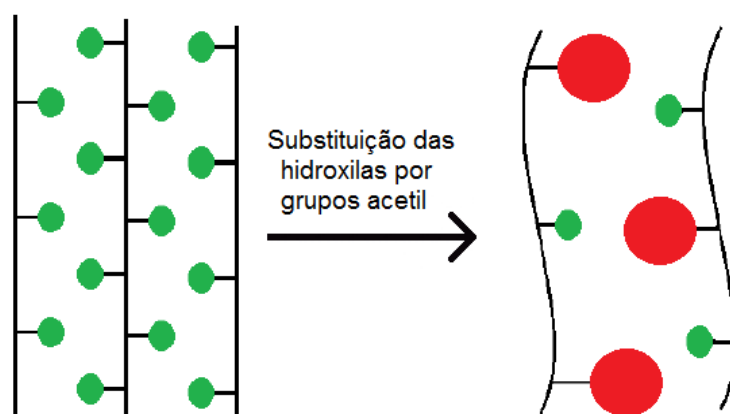


Figura 19: Representação esquemática da substituição das hidroxilas da celulose por grupos acetil

As regiões cristalinas da celulose apresentam resistência à solvatação e são menos acessíveis aos agentes químicos, devido às fortes ligações hidrogênio entre as microfibrilas. Essa característica dificulta a hidrólise da celulose, e por esse motivo torna-se necessário um pré-tratamento capaz de desmontar essa estrutura altamente ordenada que é a região cristalina.

Lengowski et al.(2013)⁴⁷, trabalhando com polpa celulósica de *Eucalyptus spp.*, IC de 79,22%, avaliou a redução da cristalinidade, após diferentes tipos de pré-tratamento, hidrólise ácida controlada, tratamento alcalino, microprocessamento e moagem em moinho de bolas, e concluiu que o melhor tratamento da celulose para a produção de etanol seria com moinho de bolas, pois além de reduzir o tamanho das partículas, aumentar a área superficial e diminuir o índice de cristalinidade, ele não origina subprodutos. Contudo, para se obter uma amostra com IC = 32,49%, foram necessários uma moagem por 13 dias em moinho de cerâmica e 18 dias em moinho zircônia, respectivamente. Ou seja, não é economicamente viável por envolver alta demanda de energia para a trituração dos materiais que constituem as matérias-primas.

Diante do exposto acima, a modificação química da celulose se apresenta como uma resposta às dificuldades da hidrólise, e por isso, o acetato de celulose foi escolhido por ser um derivado de celulose com menor cristalinidade.

5.2 Hidrólises dos materiais

A partir de observações visuais dos frascos contendo o material hidrolisado da celulose e do acetato de celulose foi possível evidenciar que as reações com a celulose não ocorreram de forma efetiva, uma vez que a quantidade de resíduos sólidos restante na parte inferior dos frascos foi muito maior que nos frascos contendo os hidrolisados do acetato de celulose.

Foi possível observar também, que quanto maior a concentração da solução de H₂SO₄, mais amarelada se tornava a solução e menor a quantidade de resíduo sólido resultante após hidrólise, indicando uma maior solubilização do material e, possivelmente, uma maior conversão em glicose. Por outro lado, quando o material era hidrolisado com concentrações altas de ácido sulfúrico, à medida que o tempo de reação aumentava, a coloração do hidrolisado escurecia indicando uma provável

degradação dos produtos.

A Figura 20 apresenta os frascos com o material hidrolisado após 150 minutos de reação.

Foi possível observar que nos frascos C2,5 (celulose em solução de H_2SO_4 2,5%) e C5 (celulose em solução de H_2SO_4 5,0%) praticamente não houve alteração de cor e a quantidade de resíduo sólido restante indicou que praticamente não ocorreu hidrólise da celulose. Os frascos C10 (celulose em solução de H_2SO_4 10,0%) C15 (celulose em solução de H_2SO_4 15,0%), A5 (acetato de celulose em solução de H_2SO_4 5,0%) e A10 (acetato de celulose em solução de H_2SO_4 10,0%) apresentaram coloração amarela, porém somente os frascos A5 e A10 não apresentaram resíduos sólidos, indicando que todo o material sofreu hidrólise. Os frascos C20 (celulose em solução de H_2SO_4 20,0%), A15 (acetato de celulose em solução de H_2SO_4 15,0%) e A20 (acetato de celulose em solução de H_2SO_4 20,0%) apresentaram um produto de cor escura, apontando para uma possível degradação do açúcar produzido.

Essa análise qualitativa pode ser comprovada posteriormente com a quantificação da glicose nos hidrolisados.

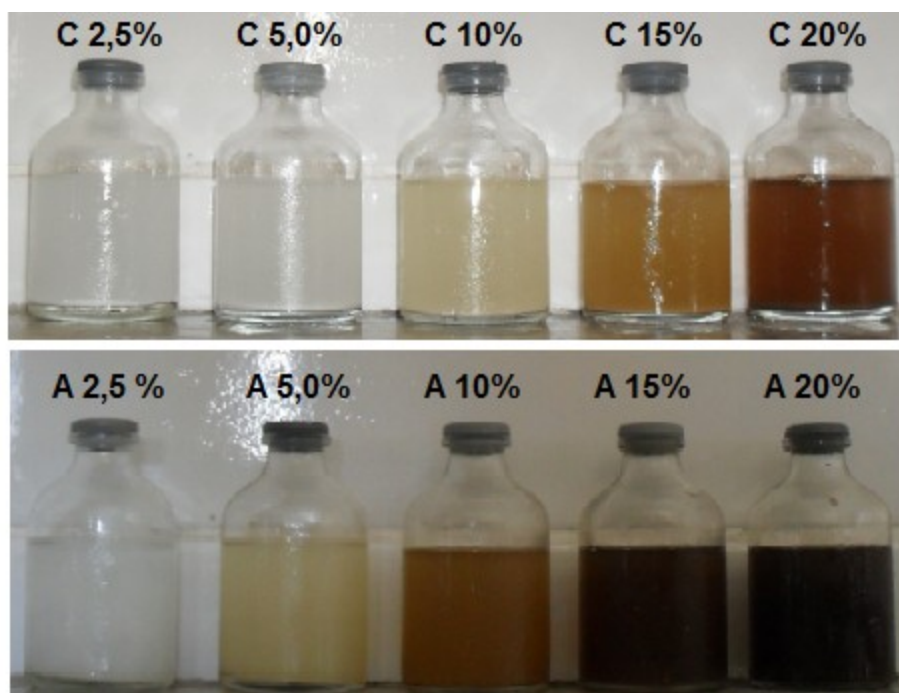


Figura 20 - Produtos das reações de hidrólise após 150 min de reação

5.2.1 Teores de glicose

Os teores de glicose foram determinados de acordo com as técnicas descritas no item 4.3.1.

Por se tratar de uma técnica rápida e simples, esse teste foi previamente utilizado para se ter uma ideia sobre a quantidade de açúcar produzido nas reações de hidrólise, e assim auxiliar na escolha das melhores reações para o estudo do processo fermentativo para produção de etanol 2G.

O Anexo A apresenta a tabela com as concentrações de glicose e o rendimento obtidos em cada reação. Os experimentos foram feitos em triplicatas nas condições descritas na Tabela 3 do item 4.3. O rendimento em glicose foi calculado a partir da concentração média de glicose (média aritmética dos 3 valores).

De acordo com a estequiometria da reação (Fig. 21), verifica-se que 324,0 g de celulose produzem 360,0 g de glicose. Para 500 mg de celulose, considerando o rendimento da reação de 100%, são produzidos 555,6 mg de glicose. Portanto, a concentração máxima de glicose produzida seria de 1389 mg.dL⁻¹.

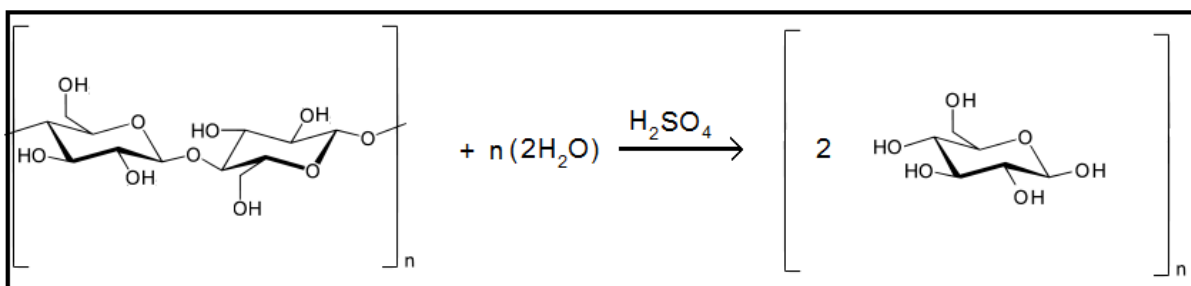


Figura 21 - Equação química da reação de hidrólise da celulose

Para a reação com o acetato de celulose, de acordo com a estequiometria da reação (Fig. 22), verifica-se que 492,0 g de acetato de celulose produzem 360,0 g de glicose. Para 500 mg de acetato de celulose, considerando o rendimento da reação de 100%, são produzidos 366 mg de glicose. Portanto, a concentração máxima de glicose produzida seria de 915 mg.dL⁻¹.

Dessa forma, a partir desses cálculos foi possível determinar o rendimento das reações de hidrólise.

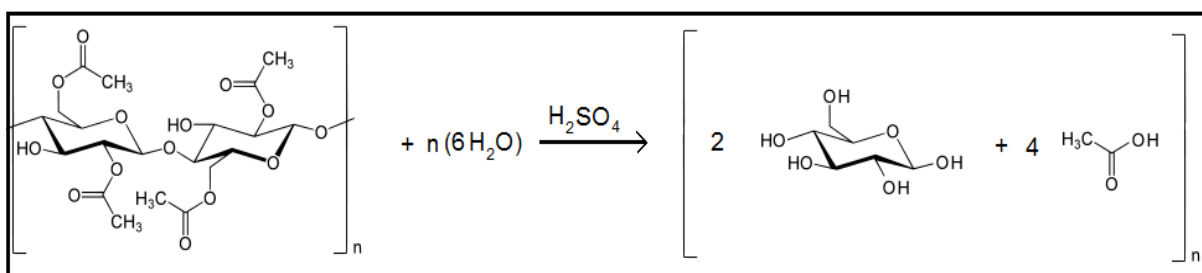


Figura 22 - Equação química da reação de hidrólise do acetato de celulose

Para facilitar a análise dos resultados e fazer uma comparação entre os rendimentos obtidos tanto na hidrólise da celulose quanto na hidrólise do acetato, os dados foram plotados em gráficos de rendimento em glicose x tempo reacional (Fig. 23 e 24).

Analisando a Figura 23, baixos rendimentos em glicose foram encontrados, quase todos os valores inferiores a 10%. O melhor rendimento alcançado, 11% aproximadamente, foi para a hidrólise da amostra em solução ácida, a 15%, por 150 minutos (C15-150). Observa-se ainda que quando a reação foi realizada nessa mesma concentração de H_2SO_4 (15%) por 180 minutos (C15-180), o rendimento diminuiu para 8%, indicando que a glicose que foi produzida até 150 minutos começou a ser degradada logo depois.

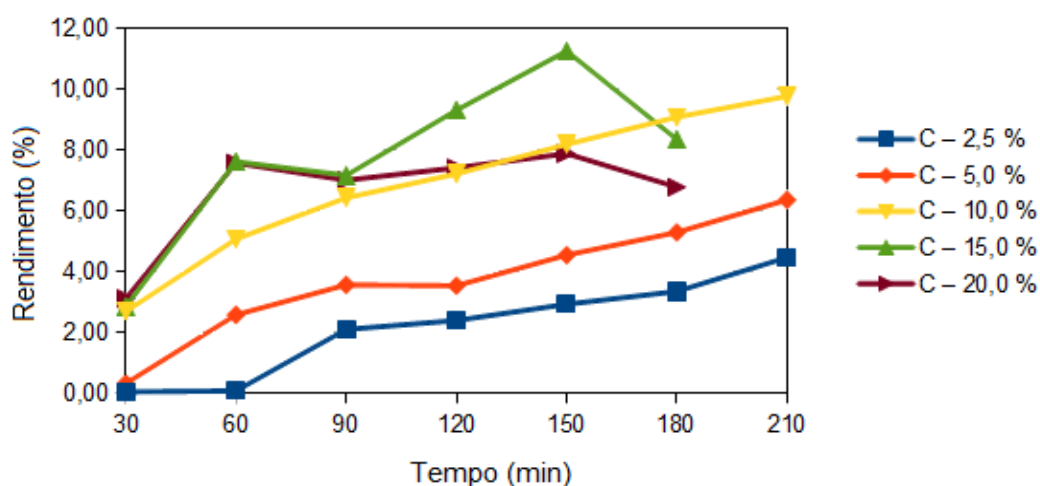


Figura 23 - Rendimento em glicose x tempo de reação das hidrólises da celulose em soluções 2,5%, 5,0 %, 10%, 15% e 20% de H_2SO_4)

Os resultados obtidos na hidrólise do acetato de celulose (Fig. 24), verifica-se que no início das reações, após 60 minutos, rendimentos em glicose em torno de

62% e 70% para as hidrólises em soluções de H_2SO_4 de concentrações 20% (A20-60) e 15% (A15-60), respectivamente. Após 60 minutos, mantendo essas concentrações das soluções ácidas, a glicose produzida começa a ser degradada.

Para a hidrólise em H_2SO_4 , a 10%, o aumento do rendimento foi proporcional ao tempo de reação até 90 minutos, a partir desse instante o rendimento se manteve constante, entre 70% e 74%, até 180 minutos. A partir de 180 minutos a concentração de glicose diminuiu, devido a degradação do açúcar.

Na hidrólise do acetato em solução de H_2SO_4 , a 5,0%, o aumento na produção de glicose foi acompanhado do tempo de reação até 180 minutos. Nesse instante, a hidrólise (A5-180) apresentou o valor máximo de rendimento em glicose, em torno de 92%. Para a hidrólise realizada em solução de H_2SO_4 , a 2,5%, o rendimento não ultrapassou 50% considerando o tempo máximo de realização dos experimentos (210 minutos).

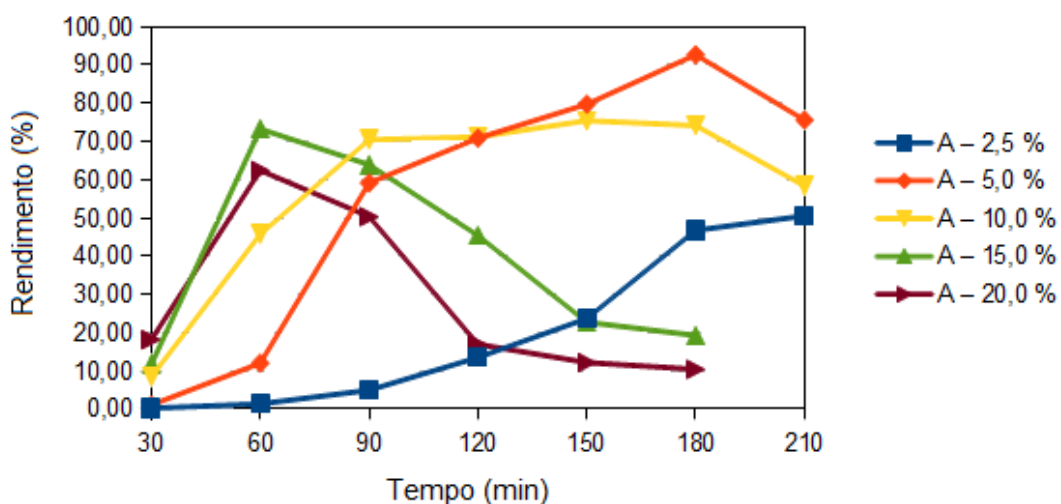


Figura 24 - Rendimento em glicose x tempo de reação das hidrólises do acetato de celulose em soluções 2,5%, 5,0 %, 10%, 15% e 20% de H_2SO_4

Quando se compara a eficiência da hidrólise para os dois materiais, fica evidente que os teores de açúcar obtido na hidrólise da celulose são muito inferiores aos valores obtidos com o acetato de celulose, independente o tempo de reação (Fig. 25). A baixa taxa de hidrólise da celulose provavelmente está relacionada com o alto grau de cristalinidade da celulose microcristalina. As regiões cristalinas apresentam resistência à solvatação e ao ataque químico devido a forte coesão existente entre as moléculas gerada pelas ligações hidrogênio inter e

intramoleculares.

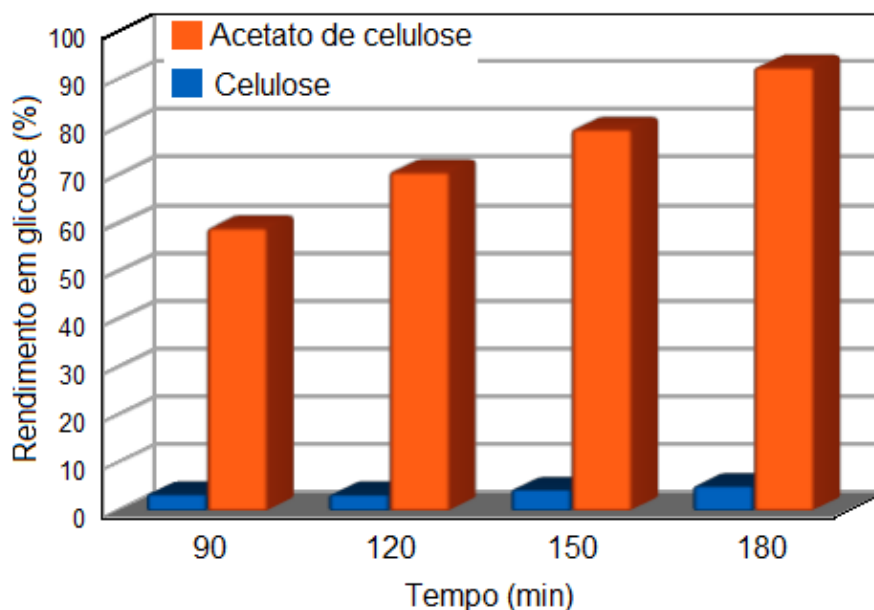


Figura 25 - Comparação entre os rendimentos em glicose obtidos a partir das reações de hidrólise da celulose e do acetato de celulose, em solução de H_2SO_4 , 5,0% (V/V.)

Com a substituição das hidroxilas da celulose por grupos acetil, as interações do tipo ligações hidrogênio diminuem, a estrutura que antes era cristalina fica mais amorfa facilitando a solvatação e a interação com reagentes e, conseqüentemente, ocorre um aumento na taxa de hidrólise.

Nesse contexto, se torna claro a importância de estudo sobre a modificação química da celulose como etapa de pré-tratamento para a produção de etanol 2G. Altos rendimentos (92%) em condições brandas de temperatura (120 °C), pressão e concentração de ácido (5%) foram obtidos. Na literatura, rendimentos entre 50 e 60% em glicose a partir da celulose, só foram obtidos sob temperaturas na faixa de 200 a 230 °C.^{48,49} Dessa forma o custo adicional da etapa de pré-tratamento poderia ser compensado com o ganho na economia com gastos de energia.

Hamelinck et al. (2005)⁵⁰, fazendo um estudo comparativo entre os três processos de hidrólise da celulose: ácido diluído (concentração de $H_2SO_4 < 1\%$), ácido concentrado (concentração de H_2SO_4 entre 30 a 70%) e enzimático (celulase), apresenta rendimentos em glicose de 90% na hidrólise com ácido concentrado. Porém, concentrações tão altas de ácido sulfúrico, 70%, inviabiliza o processo por

questões econômicas relacionadas tanto com a recuperação do ácido, quanto com o alto custo de equipamentos resistentes a corrosão.

Após a análise desses resultados, ficou definido que a condição ideal de hidrólise do acetato de celulose, a 120 °C, ocorre em solução de ácido sulfúrico, de concentração 5,0 % (v/v), por 180 minutos.

5.2.2 Quantificações de glicose, furfurais e acetato por HPLC

Durante o processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação. Entre eles pode-se citar o ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente no acetato de celulose e furaldeídos ou aldeídos furanos, principalmente furfural e hidroximetilfurfural (HMF), formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente.⁵¹

O furfural causa sobre as leveduras uma diminuição da taxa específica de crescimento e o HMF, apesar de menos tóxico também causa danos à membrana celular das leveduras, isto tem sido comprovado por diferentes estudos.^{52, 53}

Neste contexto, não só o rendimento obtido em glicose é importante, mas a obtenção de um hidrolisado com baixos teores de compostos inibidores é fundamental para o sucesso da etapa de fermentação e conseqüentemente, para a obtenção de altos rendimentos em etanol. Dessa forma, a presença desses inibidores também foi avaliada e os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Quantificação de glicose, furfurais e acetato nos hidrolisados

Exp.	Amostra	Glicose (g.L ⁻¹)	HMF (mg.L ⁻¹)	Furfural (mg.L ⁻¹)	Acetato (g.L ⁻¹)	Teor de glicose (%)
17	A5-60	0,92	0	1	3,24	10,05
18	A10-60	3,99	0	49	4,98	43,61
19	A15-60	6,90	7	53	5,00	75,41
20	A20-60	5,93	17	45	4,99	64,81
27	A5-90	4,57	27	17	4,40	49,95
28	A10-90	6,71	2	55	4,95	73,33
29	A15-90	6,18	14	48	4,81	67,54
30	A20-90	5,76	23	41	5,03	62,95
36	A2,5-120	0,78	29	0	2,87	8,52
37	A5-120	6,61	0	37	4,92	72,24

Continuação (Tabela 7)

xp.	Amostra	Glicose (g.L ⁻¹)	HMF (mg.L ⁻¹)	Furfural (mg.L ⁻¹)	Acetato (g.L ⁻¹)	Teor de glicose (%)
38	A10-120	6,98	5	57	5,19	76,28
42	C5-150	0,53	20	3	0,01	3,81
43	C10-150	0,92	8	10	0,02	6,62
46	A2,5-150	1,64	28	4	3,36	17,92
47	A5-150	6,76	0	47	4,82	73,88
48	A10-150	6,81	6	56	5,14	74,43
52	C5-180	0,57	21	4	0,02	4,10
53	C10-180	1,04	9	9	0,06	7,48
56	A2,5-180	3,09	27	9	4,09	33,77
57	A5-180	8,17	1	53	5,52	89,29
58	A10-180	6,42	0	54	5,01	70,16
62	C5-210	0,71	0	6	0,02	5,11
63	C10-210	1,43	0	12	0,12	10,30
66	A2,5-210	3,94	0	21	2,81	43,06
67	A5-210	6,86	0	32	4,81	74,97
68	A10-210	5,18	0	47	4,66	56,61

As análises realizadas por HPLC mostraram a presença dos compostos furfural e hidroximetilfurfural em concentrações da ordem de mg.L⁻¹, ou seja, teores abaixo da concentração tóxica. Esses valores, comparados às concentrações de glicose obtidas, representam menos de 1%. Pereira Jr. (2008)⁵⁴, ao realizar hidrólise ácida (H₂SO₄) de torta de mamona, a 120 °C, obteve 32,2% de rendimento em glicose e 3,8% de furfurais em relação ao teor de glicose. Santos (2010)⁵⁵, ao hidrolisar celulose, também empregando ácido sulfúrico, a 190 °C, obteve 58,2% de conversão em glicose e 7,3% de HMF; nesse mesmo trabalho, utilizando temperatura de 150 °C, não ocorreu a formação de HMF, porém a conversão da celulose em glicose foi de 1,7%, apenas. Outros trabalhos, descritos na literatura, apresentam teores de furfurais crescentes com o aumento da temperatura de hidrólise. A diminuição da temperatura inibe a formação de furfurais, mas em contrapartida, a taxa de hidrólise diminui consideravelmente.

Na fermentação de hidrolisado ácido para a produção de etanol, os inibidores, como já relatado, tais como os aldeídos furânicos, fenóis e ácidos alifáticos podem causar uma diminuição considerável da fermentação. O tratamento do hidrolisado com o Ca(OH)₂ antes da fermentação, supercalagem, é um método bem estabelecido para melhorar o poder de fermentação. No entanto, uma desvantagem

com a supercalagem é a formação de um precipitado de sulfato de cálcio (gesso).⁵⁶ Um outro inconveniente é que, se o tratamento for feito sob condições muito severas (alta temperatura e pH), ocorre uma degradação considerável dos açúcares fermentáveis.⁵¹ As análises químicas da calagem excessiva combinada com experimentos de fermentação sugerem que é difícil encontrar condições que sejam capazes de impedir a degradação dos açúcares fermentáveis e ao mesmo tempo provocar a degradação dos inibidores aldeídos furânicos.

Diante disso, a solução seria evitar a formação de inibidores durante o processo de obtenção da glicose. Nesse sentido, é importante ressaltar, a modificação química da celulose possibilita a utilização de baixas temperaturas (120 °C) no processo de hidrólise, e conseqüentemente, impede a formação de inibidores. Como esse estudo mostra, os resultados obtidos são de extrema importância, visto que, foi possível, obter altos rendimentos em glicose e baixos teores de inibidores nos hidrolisados. No Processo fermentativo, a ausência desses inibidores simplifica o processo de produção de etanol 2G, já que elimina a etapa de detoxificação.

É importante observar também, que todos os valores de concentrações de glicose encontrados via HPLC foram muito semelhantes aos resultados obtidos no UV-vis através do teste colorimétrico utilizado para quantificação prévia de glicose.

A Figura 26 apresenta um gráfico comparativo entre os rendimentos das reações de hidrólise do acetato calculados a partir das concentrações de glicose medidas por HPLC e por UV-vis. No gráfico estão representados valores obtidos a partir das reações de hidrólise do acetato em solução de H₂SO₄, 5,0% (A5) e do acetato em solução de H₂SO₄, 10,0% (A10) conduzidas em diferentes tempos (60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos).

O comportamento idêntico das duas curvas (valores medidos por HPLC e por UV-vis) permite concluir que a técnica empregada para quantificar glicose pelo método colorimétrico é confiável.

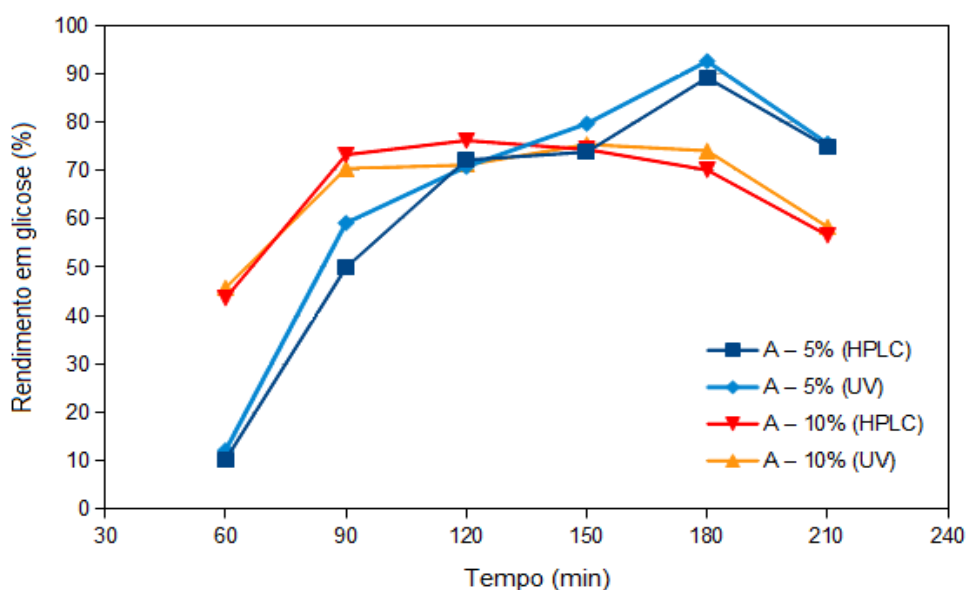


Figura 26 - Gráfico comparativo entre os rendimentos em glicose calculados a partir de teores de glicose medidos por HPLC e por UV-vis.

O melhor rendimento em glicose foi alcançado através da hidrólise do acetato em solução de H_2SO_4 , 5,0% (v/v), durante 180 minutos (A5-180). Nessas condições o teor de glicose obtido foi de $8,17 \text{ g.L}^{-1}$, o que corresponde um rendimento de aproximadamente 90%. Realizando essa reação nessas mesmas condições, a concentração de glicose medida através do teste colorimétrico foi de $8,48 \text{ g.L}^{-1}$, que corresponde a um rendimento de 92,7 %.

Na literatura são encontrados alguns trabalhos referentes a hidrólise ácida da celulose. Christofletti (2010)⁴⁰, obteve um rendimento em glicose de 47,73% a partir da hidrólise da celulose do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído, 0,14%, a 200 °C. Gurgel (2010)⁴², também trabalhando com hidrólise ácida do bagaço de cana, empregando ácido sulfúrico diluído, 0,14%, a 210 °C, conseguiu uma taxa de conversão de celulose em glicose de 69%.

Os trabalhos mais abundantes encontrados na literatura tratam-se da hidrólise enzimática. Por exemplo, utilizando bagaço de cana, Rocha et al. (2010), obtiveram como valor de conversão máxima, de 76%. Oliveira (2010), usando a palha de cana como matéria-prima em seu estudo, alcançou uma taxa de conversão de 80 %. Chen;Han;Xu (2008) obtiveram 58 % de conversão com a palha de trigo. Guo et al. (2009) chegaram a uma conversão de 78 % usando palha de arroz.⁵⁷ No entanto, esses processos enzimáticos são demorados, requerendo 3 dias ou mais para a

conversão, e os hidrolisados não estão livres da presença de inibidores fermentativos, já que esses podem ser produzidos na etapa anterior a hidrólise, durante o pré-tratamento da biomassa.

Além do alto rendimento em glicose empregando condições brandas na reação de hidrólise, a inovação desse trabalho é o reaproveitamento de um resíduo urbano que constitui um dos maiores problemas ambientais, o filtro do cigarro.

Um estudo publicado na American Chemical Society revelou que 4,5 trilhões de filtros de cigarro são descartados no ambiente a cada ano. Os oceanos também sofrem com o fumo. Segundo o relatório Marine Litter: a Global Challenge (Lixo nos Oceanos, um desafio para o mundo, em tradução livre), feito pela ONU, embalagens e restos de cigarro se acumulam nos mares, formando 40% do lixo encontrado no Mar Mediterrâneo. No Equador, o número chegou a ser mais da metade de resíduos encontrados na costa em 2005.⁵⁸ Nos últimos 27 anos, o Programa Internacional de Limpeza das Zonas Costeiras recolheu mais de 52 milhões de filtros de cigarro, uma quantidade quase oito vezes maior que a de latas de bebida encontradas. Os filtros de cigarro representaram 32% de todos os detritos coletados pela iniciativa.⁵⁹

5.3 Fermentação - Produção de etanol 2G

A partir dos resultados das quantificações de glicose apresentados na tabela 7, escolheu-se fazer testes de fermentação com os hidrolisados de acetato de celulose dos experimentos 38 (A10-120) e 57 (A5-180). O preparo dos hidrolisados ocorreu conforme descrito no item 4.4.1.

Para os testes de fermentação foram utilizados 500 mL de cada um dos hidrolisados, A10-120 e A5-180, com concentrações de glicose igual a 47,36 g.L⁻¹ e 58,24 g.L⁻¹, respectivamente. Cada hidrolisado foi dividido em dois volumes de 250 mL (Fig. 27) e misturados a 250 mL de YNB conforme metodologia descrita no item 3.4.3.

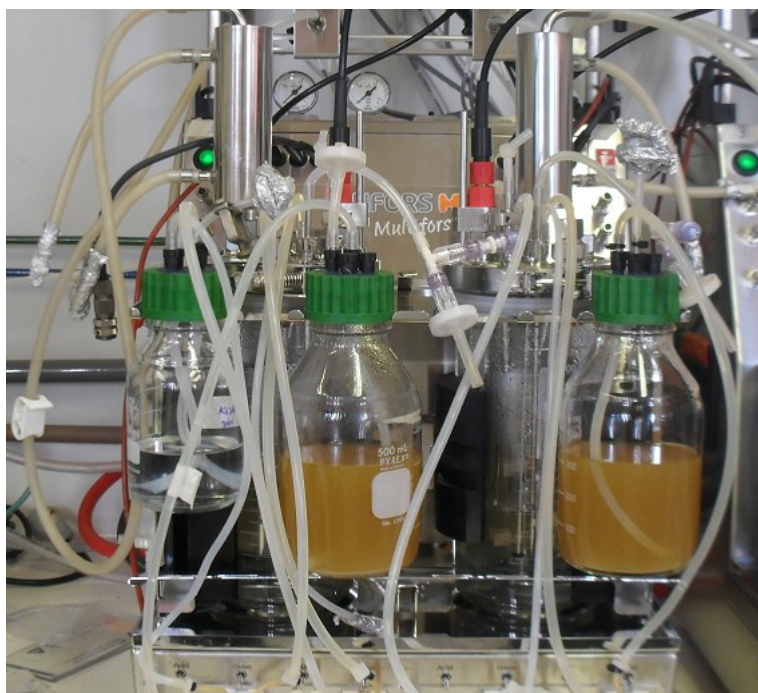


Figura 27 - hidrolisados sendo injetados nas dornas contendo YNB para dar início a fermentação.

5.3.1 Crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para que um processo fermentativo seja eficiente, é necessário que as características do agente fermentativo, a levedura *S. cerevisiae*, sejam observadas e respeitadas. A sobrevivência e o crescimento da levedura dependem de um adequado suprimento de nutrientes e de um ambiente físico favorável.

A fermentação teve início e seguiu conforme descrito na metodologia apresentada no item 4.4.3. Além de diminuir a temperatura, foi possível eliminar a etapa de purificação do hidrolisado antes da fermentação, já que as quantidades de furfural e HMF presentes no meio eram desprezíveis.

Para o meio hidrolisado A10-120, não ocorreu o crescimento da levedura e, portanto, não houve produção de etanol.

Os resultados obtidos para o crescimento da levedura no meio hidrolisado A5-180 são demonstrados na Figura 28, gráfico que representa o crescimento das células em função do tempo nas dornas 1 e 2.

Pôde-se observar que a levedura teve uma excelente adaptação ao meio nas duas dornas. A fase lag, fase de adaptação das leveduras ao meio, tem uma

duração de aproximadamente 15 horas e a partir daí, na fase exponencial, observa-se que a levedura teve um crescimento expressivo, indicando que o produto de desejo, etanol 2G, estava sendo formado com eficiência. Após a fase exponencial a levedura entra na fase estacionária, não chegando à fase de declínio devido ao tempo a qual foi monitorada, 25 horas.

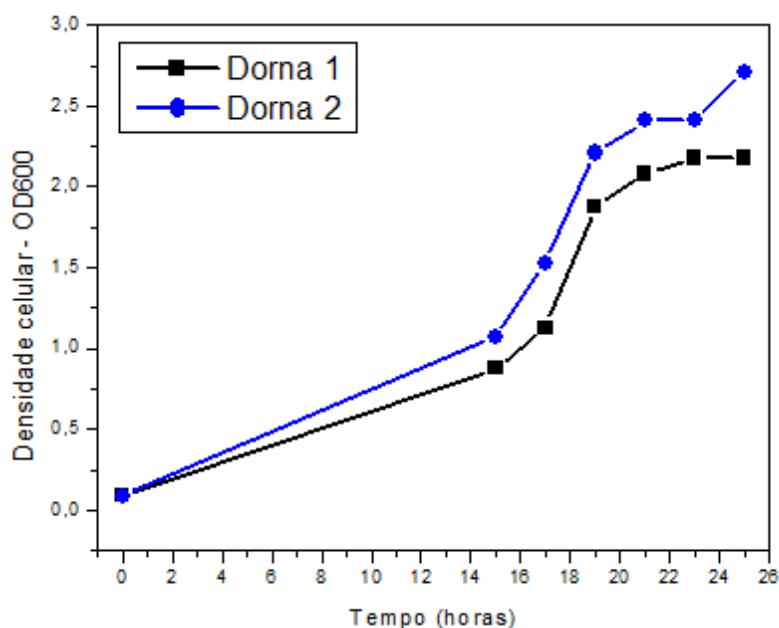


Figura 28 - Crescimento da levedura no meio hidrolisado nas dornas 1 e 2.

5.3.2 Consumo de glicose e a produção de etanol

Entre os fatores que podem afetar o rendimento da fermentação, ou seja, a conversão eficaz de açúcar em etanol, alguns merecem mais atenção, tais como, a concentração de substrato, presença de contaminantes ou agentes tóxicos, pH, tempo e temperatura.

Durante a fermentação, após as primeiras 15 horas, alíquotas de amostras do meio foram retiradas das duas dornas, a cada intervalo de duas horas, para quantificações do consumo de glicose, da produção de etanol e verificação da presença de outras substâncias presentes no meio, tais como, furfural, HMF e acetato. Os resultados são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Quantificação dos compostos durante a fermentação na dorna 1

Tempo (horas)	Glicose (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Íon acetato (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)
0	18,2	0	13,05	0,02	0
15	13,25	2,77	13,5	0,025	0
17	9,75	4,22	13,4	0,005	0
19	5,55	6,37	13,65	0	0
21	1,5	8,17	13,4	0	0
23	0	8,77	13,5	0	0
25	0	9,08	13,6	0	0

Tabela 9 - Quantificação dos compostos durante a fermentação na dorna 2

Tempo (horas)	Glicose (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Íon acetato (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)
0	17,7	0	13,55	0,025	0
15	12,5	2,9	13,8	0,005	0
17	8,45	4,45	13,65	0	0
19	3,04	7,05	13,8	0	0
21	0,2	8,4	13,8	0	0
23	0	8,55	13,75	0	0
25	0	8,65	13,75	0	0

Estequiometricamente, na reação de fermentação da glicose, verifica-se que 180,0 g do substrato produzem 92,0 g de etanol. Ou seja, o fator de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) é igual a 0,51 g/g, considerando a eficiência da fermentação de 100 %.

Ao analisarmos os resultados das fermentações do meio hidrolisado, verificou-se que os fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram de 0,50 g/g na dorna 1 e de 0,49 g/g na dorna 2. Observou-se que no meio hidrolisado a levedura teve seu crescimento bem definido e obteve uma produção muito próxima de 100%.

Como se observa nos gráficos da Figura 29, ocorreu uma compatibilidade entre o consumo de glicose e a conversão em etanol. Após 25 horas houve o consumo total da glicose e a produção de etanol atingiu valores próximos da eficiência máxima da fermentação. A ausência de inibidores e a alta concentração de glicose no hidrolisado constituíram fatores essenciais para o sucesso da fermentação.

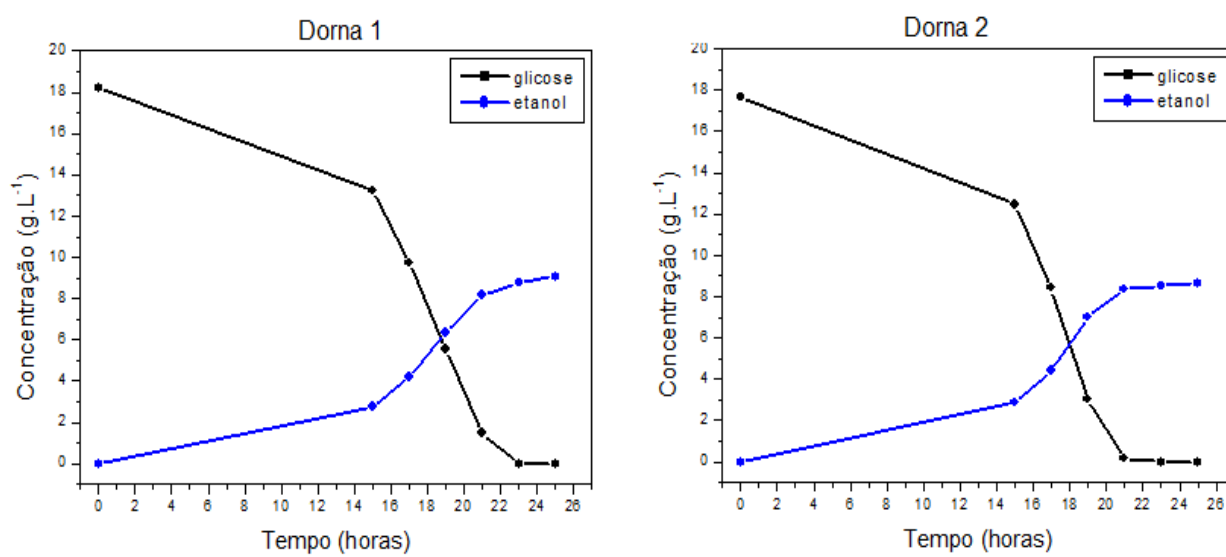


Figura 29 - Consumo de glicose e produção de etanol no meio hidrolisado.

6 CONCLUSÕES

Os difratogramas de raios X mostraram uma diferença significativa entre a cristalinidade da celulose e a do acetato de celulose, sugerindo que a substituição dos grupos hidroxila por grupos maiores, como o acetil, causam alterações no arranjo ordenado da celulose.

As reações de hidrólise ácida do acetato de celulose apresentaram resultados significativos, em termos de conversão em glicose, comparados a celulose microcristalina. Análise desses dados permite constatar que a modificação química da celulose facilitou o acesso do ácido na estrutura e conseqüentemente, contribuiu para o aumento da taxa de hidrólise.

A melhor condição de hidrólise do acetato de celulose, ocorreu em solução de H_2SO_4 , 5% v/v, por 180 minutos. Nessas condições, além do alto teor de glicose (90%), a concentração de compostos inibidores de fermentação apresentou valores abaixo dos teores tóxicos. A concentração de furfurais totais representam 0,6% da concentração de glicose produzida. A ausência desses compostos no hidrolisado está associada principalmente às condições brandas de temperatura (120 °C) e de pressão e baixa concentração do ácido que foram empregadas nas reações.

Foi possível a obtenção de etanol, com rendimentos próximo da eficiência máxima de fermentação (98% de conversão glicose/etanol), a partir de uma matéria-prima que constitui um grave problema ambiental, o filtro de cigarro. Diante desse resultado, é possível prever o uso dessa tecnologia no aproveitamento tanto dos filtros de cigarro, resíduos sólidos urbanos, quanto para as aparas de cabo acetato, que são resíduos gerados nas indústrias de cigarro durante o processo de produção dos filtros. Outra contribuição de extrema relevância obtida nesse estudo foi a da importância da modificação química da celulose como uma etapa de pré-tratamento para a hidrólise, abrindo caminhos para novos estudos.

Enfim, esse estudo permite concluir que a modificação química da celulose, através da acetilação dos grupos hidroxila, pode ser uma rota interessante para a produção de etanol 2G. Ainda que sejam implementados gastos com esse tratamento adicional, mas esses poderão ser compensados pela eficiência do processo e com os ganhos na economia de gastos de energia (já que as temperaturas para hidrolisar a celulose são maiores) e na eliminação da etapa detoxificação.

7 TRABALHOS FUTUROS

Estamos fazendo um estudo visando a recuperação do ácido acético, uma vez que altas concentrações de íons acetato foram produzidos nas reações de hidrólise, como apresentado na Tabela 7. A recuperação desse ácido possibilitará sua reutilização nas reações de acetilação da celulose, gerando um processo cíclico, e assim os gastos com a produção de etanol 2G serão amenizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRUM, S.S. **Catalisadores de zircônia sulfatada e compósitos carvão ativado/zircônia sulfatada para produção de biodiesel e etanol**. 2010. 156p. Tese (Doutorado em agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
2. LEÃO, A.L.; et al. **Resíduos Agroindustriais – caracterização e utilização**. Disponível em: http://www.gconci.com.br/site/default.aspx?pagina=noticias_detalhe&codigo_pagina=100. Acesso em 12 de outubro de 2013.
3. SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Golden, v. 13, n. 1, p. 167-178, Jan 2009.
4. CANETTIERI, E. V. et al. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of Eucalyptus grandis residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 2, p. 422-428, Jan 2007.
5. CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 2008.
6. ALVIRA, P.; TOMAS-PEJO E; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 13, p 4851-4861, jul 2010.
7. SILVA, N.L.C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria da celulose**. 2010. 109 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.
8. **Etanol de segunda geração: o grande salto tecnológico**. Disponível em: http://www.crq4.org.br/informativomat_1213. Acesso em 23 de janeiro de 2015.
9. SILVA, R., HARAGUCHI, S. K., MUNIZ, E. C., RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.
10. MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte 1 – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.29, n.3, p.461-470, 2005.
11. SPIRIDON, L.; POPA, V.I. Hemicelluloses: major sources, properties and applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. (Ed.). *Monomers, polymers and composites from renewable resource*. Amsterdam: **Elsevier**, p. 289-304, 2008.
12. RATANAKHANOKCHAI, K.; et al. Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. **InTech**, DOI:10.5772/51820, 2013.

13. SANTOS, F. A., et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.
14. **Lignina**. disponível em http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Lignina&lang=3. Acesso em 28 de janeiro de 2015.
15. BRIENZO, M. **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xiloligossacarídeos**, 2010. 137 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.
16. SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p.19-27, jan 2012.
17. ZHANG, Y. P., LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Hanover, v. 88, n. 7, p.797-824, dez 2004.
18. KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, mar 2009.
19. HIMMELI, M. E.; et al. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-80, fev 2007.
20. SUN, Y.; CHENG, J.; Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, mai 2002.
21. PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Quím. Nova**, v. 35, n. 8, p.1502-1509, jul 2012.
22. RABELO, S. C. **Avaliação e Otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. 2010. 414 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas-SP, 2010.
23. MARTÍN, C.; ALRIKSSON, B.; SJÖDE, A.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L. J. Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Agricultural and Agro-Industrial Residues for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol.137, n.140, p. 339-352, abr 2007.
24. BARRETO, G. C. **Levantamento das Tecnologias para Produção de Etanol de Segunda Geração: O Potencial do Brasil**. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de Salvador, Salvador, 2009.
25. ROCHA, G.J.M. et al. Steam Explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p.274-279, jan

2012.

26. FERREIRA, M. E. S; SOLALIENDRES, M. O. **Estudo da Viabilidade da Produção de Etanol a partir de Celulose**. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Dourados. 2012.

27. OGEDA, T. L. e PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Quím. Nova**, v. 33, nº7, p. 1549 – 1558, mar 2010.

28. LOFRANO, R. C. Z.; COSTA, F. M. F.; OLIVEIRA, L. A. F., OLIVEIRA, M. C. A.. Métodos e Perspectivas Tecnológicas de Obtenção de Biocombustíveis de Primeira e Segunda Geração. **E-xacta**, v. 6, n. 1, p. 35-53, abr 2013.

29. KRASSIG, H. A. Cellulose-Structure, Accessibility and Reactivity. **Gordon and Breach Science Publishers**, Yverdon, Switzerland, p. 307–314, 1993.

30. KRASSIG H. A.; in **Cellulose and Its Derivatives: Chemistry, Biochemistry and Applications**, ed. J. F. Kennedy, G. O. Phillips, D. J. Wedlock and P. A. Williams, Ellis Horwood Limited, Chichester, pp. 3–25, 1985.

31 SENNA, A. M. **Géis de acetato de celulose reticulados: síntese, caracterização e estudos de adsorção de íons Cu^{+2}** . 2011. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2011.

32. RUIZ, J. C. S.; DUMESIC, J. A. Catalytic Production of Liquid Hydrocarbon Transportation Fuels. In: **Catalysis for Alternative Energy Generation**. p. 29-52, mar 2012.

33. JIANG, X.; GU, J.; TIAN, X.; LI, Y.; HUANG, D. Modification of cellulose for high glucose generation. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 473–479, jan 2012.

34. SABZALIAN, Zohreh. **Cross-linking and hydrophobization of chemically modified cellulose fibers**. 2012. 94 p. Thesis (Master of Science) - McGill University, Montreal, Quebec, Canada, 2012.

35. STEINMEIR, H. Acetate Manufacturing, Process and Technology. In **Macromol. Symp.**, v. 208, p. 49-60, 2004.

36. WINCK, P. R. **Estudo de viabilidade técnica da queima de resíduos gerados em uma indústria de tabaco para obtenção de energia térmica a ser aproveitada em uma caldeira geradora de vapor**. 2011. 34 p. Trabalho de Diplomação em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

37. MEIRELES, C. S. **Síntese e caracterização de membranas de acetato de celulose, obtido do bagaço de cana-de-açúcar, e blendas de acetato de celulose com poliestireno de copos plásticos descartáveis**. 2007. 65 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

38. PULEO, A.C.; PAUL, D.R.; KELLEY, S.S. The effect of acetylation on gas sorption and transport behavior in cellulose acetate. **Journal of Membrane Science**, v. 47, n. 3, p. 301-332, 1989.
39. SASSI, J.F.; CHANZY, H. Ultrastructural aspects of the acetylation of cellulose. **Cellulose**, v. 2, n. 2. p. 111-127, jun 1995.
40. CHRISTOFOLETTI, G. B. **Estudo dos efeitos de pré-tratamento na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 143 p. Dissertação (Mestrado em Interunidades Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
41. LYND, L. R; ELANDER, R. T.; WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57, n. 8, p. 741-761, 1996.
42. GURGEL, L. V. A. **Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana-de-Açúcar: Estudo Cinético de Sacarificação de Celulose para Produção de Etanol**. 2010. 315 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos, 2010.
43. RODRIGUES, G.; et al.; Water flux through cellulose triacetate films produced from heterogeneous acetylation of sugar cane bagasse. **Journal of Membrane Science**, 177, n. (1,2), p. 225-231, ago 2000.
44. SEGAL, L. et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786 - 794, out 1959.
45. CARVALHO, L. C. **Obtenção de Acetato de Celulose Proveniente do Bagaço de Cana-de-Açúcar e Avaliação de Sua Aplicação em Sistemas de Difusão Controlada**. 2009. 127 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
46. MENG, L.; et al. Preparation, Characterization, and Behavior of Cellulose-Titanium(IV) Oxide Modified with Organosilicone. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 84, n. 1, p. 61-66, abr 2002.
47. LENGOWSKI, E. C.; et al. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis**, v. 41, n. 98, p. 185-194, 2013.
48. SAKON, J.; et al. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. **Nat Struct Biol.**, v. 4, n. 10, p 810, out 1997.
49. BAYER, E. A.; et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 8, n. 5, p 548-557, out 1998.
50. HAMELINCK, C. N.; et al. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4,

p. 384-410, abr 2005.

51. MARTÍN,C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1297, p. 33-35, 37-39, 2007.

52. TAHEEZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G.; J. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Biosci Bioeng.**, V. 87(2), p. 169-174, 1999.

53. Almeida, J. R. M.; et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 82(4), p. 340-349, 2007.

54. PEREIRA JR, n.; et al. Produção de etanol a partir de torta de mamona. **Quím. Nova**, v.31, n. 5, p. 1104-1106, out 2008.

55. SANTOS, J.B. **Processo de solubilização, hidrólise e degradação de celulose e derivados em presença de catalisadores metálicos a base de Sn(IV)**. 2010. 74 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2010.

56. ALRIKSSON, B.; et al. Optimal conditions for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Vol. 129-132, p. 599 - 611, 2006.

57. CANDIDO, R. G. 140 p. 2011. **Utilização da celulose de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado**. Dissertação - Mestrado USP, Lorena, 2011.

58. EBERSPACHER, G. **Dados mostram que produção de cigarro polui o planeta**. Disponível em: <http://atitudesustentavel.com.br/blog/2010/06/16/>. Acesso em 25 de janeiro de 2015.

59. GRANDELLE, R. **Guimbas de cigarro: 4 trilhões de ameaças à saúde e ao meio ambiente**. Disponível em: <http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/>. Acesso em 25 de janeiro de 2015.

ANEXO A

Tabela - Teores de glicose e rendimento médio das reações de hidrólise realizadas em triplicatas.

Exp.	Amostra	[glicose] (mg/dL)			[glicose]	Rendimento
		1	2	3	média	(%)
1	C2,5-30	0,95	0,00	0,25	0,40	0,03
2	C5-30	4,00	4,51	4,22	4,24	0,31
3	C10-30	38,05	37,00	36,53	37,19	2,68
4	C15-30	40,33	39,93	38,63	39,63	2,85
5	C20-30	47,33	43,40	38,83	43,19	3,11
6	A2,5-30	2,67	1,69	1,76	2,04	0,22
7	A5-30	9,95	9,17	10,05	9,72	1,06
8	A10-30	80,04	72,46	79,64	77,38	8,46
9	A15-30	101,26	108,33	112,83	107,47	11,75
10	A20-30	169,14	158,39	170,73	166,09	18,15
11	C2,5-60	1,03	0,09	1,54	0,89	0,06
12	C5-60	30,42	39,01	37,83	35,75	2,57
13	C10-60	70,53	66,53	74,05	70,37	5,07
14	C15-60	102,32	104,80	110,18	105,77	7,61
15	C20-60	98,66	115,10	102,30	105,35	7,58
16	A2,5-60	10,86	11,39	14,38	12,21	1,33
17	A5-60	110,42	104,23	115,17	109,94	12,02
18	A10-60	402,96	389,34	463,40	418,57	45,74
19	A15-60	676,54	651,44	684,18	670,72	73,30
20	A20-60	536,49	598,68	578,49	571,22	62,43
21	C2,5-90	29,14	27,07	30,77	28,99	2,09
22	C5-90	54,68	45,23	48,41	49,44	3,56
23	C10-90	80,43	99,23	88,34	89,33	6,43
24	C15-90	102,38	95,42	101,16	99,65	7,17
25	C20-90	86,33	103,86	101,86	97,35	7,01
26	A2,5-90	43,76	46,47	45,16	45,13	4,93
27	A5-90	571,94	572,44	480,14	541,51	59,18
28	A10-90	655,31	601,09	677,84	644,75	70,46
29	A15-90	603,16	561,96	590,14	585,09	63,94
30	A20-90	480,12	450,87	451,21	460,73	50,35
31	C2,5-120	32,35	33,58	33,44	33,12	2,38
32	C5-120	50,34	47,85	48,93	49,04	3,53
33	C10-120	91,48	104,46	105,05	100,33	7,22

Continuação (Tabela)

Exp.	Amostra	[glicose] (mg/dL)			[glicose]	Rendimento
		1	2	3	média	(%)
34	C15-120	130,17	128,41	129,83	129,47	9,32
35	C20-120	99,03	106,36	103,75	103,05	7,42
36	A2,5-120	126,63	123,90	119,87	123,47	13,49
37	A5-120	646,02	651,29	648,05	648,45	70,87
38	A10-120	653,54	637,06	663,91	651,50	71,20
39	A15-120	408,32	405,37	432,64	415,44	45,40
40	A20-120	155,56	151,65	157,13	154,78	16,92
41	C2,5-150	41,70	40,83	39,06	40,53	2,92
42	C5-150	70,18	60,60	58,33	63,04	4,54
43	C10-150	116,46	115,78	108,84	113,69	8,19
44	C15-150	157,08	160,07	152,39	156,51	11,27
45	C20-150	107,94	114,10	106,95	109,66	7,90
46	A2,5-150	212,02	222,44	214,97	216,48	23,66
47	A5-150	725,68	734,40	730,05	730,04	79,79
48	A10-150	702,45	682,95	686,20	690,53	75,47
49	A15-150	202,00	199,08	222,18	207,75	22,71
50	A20-150	114,16	111,07	108,53	111,25	12,16
51	C2,5-180	46,65	46,10	46,52	46,42	3,34
52	C5-180	72,00	73,65	74,72	73,46	5,29
53	C10-180	128,67	125,45	124,58	126,23	9,09
54	C15-180	112,74	118,26	117,47	116,16	8,36
55	C20-180	98,06	90,18	94,17	94,14	6,78
56	A2,5-180	411,75	435,02	436,92	427,90	46,76
57	A5-180	830,80	860,69	853,75	848,41	92,72
58	A10-180	654,19	668,90	712,67	678,59	74,16
59	A15-180	174,08	175,98	178,14	176,07	19,24
60	A20-180	96,50	92,35	95,95	94,93	10,38
61	C2,5-210	68,34	59,20	58,43	61,99	4,46
62	C5-210	88,06	90,88	85,90	88,28	6,36
63	C10-210	133,20	138,19	136,09	135,83	9,78
64	A2,5-210	443,95	458,73	484,94	462,54	50,55
65	A5-210	684,21	701,38	691,07	692,22	75,65
66	A10-210	534,06	536,06	531,98	534,03	58,36