



Pré-tratamento ácido de resíduos de milho para produção de etanol de segunda geração

Acid pretreatment of corn stover for production of second generation ethanol

Martha Suzana Rodrigues dos Santos Rocha¹

Margarete Cabral do Santos Silva²

Wagner Roberto de Oliveira Pimentel³

Renata Maria Rosas Garcia Almeida⁴

Resumo: A crescente demanda por combustíveis limpos e renováveis tem enfatizado o uso de fontes alternativas de energia como as biomassas lignocelulósicas. Esse tipo de resíduo é composto por carboidratos que se encontram em cadeias poliméricas e podem ser convertidos a etanol. Essa conversão representa o principal entrave para o uso dessas biomassas, visto que se necessita de um pré-tratamento para desestruturar a estrutura lignocelulósica, tornando-a suscetível ao ataque químico e enzimático e liberando glicose para fermentação etanólica. Nesse trabalho foi realizado um pré-tratamento ácido com sabugo e palha de milho, através de um delineamento composto central rotacional. Os fatores avaliados foram: tempo, temperatura e concentração de H_2SO_4 , e como variáveis respostas: acidez e teor de açúcares redutores totais (ART). As duas condições do delineamento experimental que apresentaram maior teor em ART tanto para o sabugo como para a palha de milho foram as equivalentes aos ensaios a $120^\circ C$, 15 min e 0,5% de H_2SO_4 ; e $110^\circ C$, 7 min e 2% de ácido. Para essas condições, realizou-se hidrólise enzimática e fermentação. A maior eficiência fermentativa é dada na condição a $120^\circ C$, 15 min e 0,5% de H_2SO_4 : 70,8% para o sabugo e 92,9% para a palha de milho.

Palavras-chave: Sabugo, palha, biomassa lignocelulósica, ácido sulfúrico.

¹ UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

² UFAL – Universidade Federal de Alagoas

³ UFAL – Universidade Federal de Alagoas

⁴ UFAL – Universidade Federal de Alagoas

Abstract: The growing demand for clean and renewable fuels has emphasized the use of alternative energy sources such as lignocellulosic biomass. This type of waste is comprised of carbohydrates, which are polymer chains and can be converted to ethanol. This conversion is the main obstacle to the use of this biomass, since it requires a pretreatment to improve the susceptibility of this structure to chemical and enzymatic attack. In this paper, we present an acid pretreatment with cob and corn stover, using the experimental design tool. The factors evaluated were time, temperature and concentration of H₂SO₄, and the experimental design responses: acidity and content of total reducing sugars (ART). The highest levels of ART obtained at experimental design are at 120°C, 15min and 0.5 % H₂SO₄; and 110°C , 7 min and 2 % acid in both the corn cob and corn stover. For these conditions, enzymatic hydrolysis and fermentation assays were performed. The highest fermentation efficiency is given under the condition at 120°C, 15 min and 0.5% H₂SO₄: 70.8 % and 92.9 % for cobs and corn stover, respectively.

1. Introdução

Nos dias atuais, com a questão do desenvolvimento sustentável sendo amplamente discutida, a busca pela ampliação da matriz energética tem sido assunto de destaque mundial. Torna-se cada vez mais clara a necessidade do uso de biocombustíveis, substituindo a utilização em larga escala das reservas de petróleo (Mou et al., 2014; Bach et al., 2014). Nesse sentido, os materiais lignocelulósicos se apresentam como alternativa promissora, sobre os quais existem diversas referências na literatura (Dagnino et al., 2012).

O grande desafio apresentado pelo uso da biomassa lignocelulósica está em conseguir desmontar a sua rígida estrutura, que apresenta como componentes principais a celulose, a hemicelulose e a lignina (Rogalinski et al., 2008). A celulose, que é o polímero de interesse, encontra-se envolvida pela hemicelulose e lignina, dificultando seu acesso, fazendo com que seja necessária a realização de um pré-tratamento (Scheufele et al., 2012).

O objetivo principal dessa etapa é romper a estrutura cristalina da celulose, fazendo com que os açúcares disponíveis se tornem passíveis à fermentação (Pienkos & Zhang, 2009; Santos et al., 2013).

Diversos tipos de pré-tratamentos têm sido avaliados na literatura com o intuito de otimizar o aproveitamento dos materiais lignocelulósicos, visto que a etapa de pré-tratamento apresenta grande impacto na digestibilidade da celulose e também na toxicidade da fermentação (Galbe & Zacchi, 2007). Nessa categoria, estão incluídos os pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação desses (Sun & Cheng, 2002).

O pré-tratamento com ácido diluído encontra-se na categoria dos pré-tratamentos químicos e consiste em submeter o material a uma solução ácida de até 4% (m/m) e, em seguida, aquecimento até temperaturas entre 140 e 200 °C por períodos de alguns minutos até aproximadamente uma hora (Alvira et al., 2010).

A hidrólise da fração hemicelulósica é uma das reações que ocorrem durante os pré-tratamentos com ácidos, especialmente das xilanas e das glucanas, aumentando a digestibilidade da celulose (Mosier et al., 2005). A depender das condições de pré-tratamento utilizadas, pode haver formação de produtos de degradação, como é o caso do furfural, pela degradação de pentoses, e do hidroximetilfurfural, pela degradação das hexoses. Esses componentes podem influenciar negativamente a etapa da fermentação, portanto devem ser evitados ou até mesmo removidos (Palmqvist & Hahn-Hagerdal, 2000).

Vários autores estudaram o pré-tratamento com ácido diluído para diversos tipos de matéria-prima: bagaço de cana de açúcar (Zhao et al., 2007; Chen et al., 2011); resíduos de milho (Loyd & Wiman, 2005; Zhang et al., 2010); casca de arroz (Saha et al., 2005); casca de soja (Yoo et al., 2011), entre outros. Alguns trabalhos compararam o tratamento ácido com outros tipos de pré-tratamentos e sempre o pré-tratamento ácido mostrou-se satisfatório.

Os resíduos de milho, tanto o sabugo quanto a palha, são matérias-primas lignocelulósicas muito abundantes no Brasil e no mundo e possuem altos percentuais de celulose e hemicelulose, tornando-se atrativos para a produção de etanol chamado de segunda geração (Meyer et al, 2013).

Alguns autores investigaram a produção de etanol a partir de resíduos de milho utilizando diversos tipos de pré-tratamento. Cao et al., (1996) utilizaram pré-tratamento de sabugo de milho com amônia e obtiveram 47 g/L de etanol após 36 horas de fermentação e Zhang et al., (2010) utilizaram três tipos de pré-tratamentos com o sabugo de milho: amônia, ácido fórmico e ácido sulfúrico diluído, obtendo altos rendimentos em etanol. Zhao & Xia (2009) relataram a produção de etanol a partir da palha de milho realizando pré-tratamento alcalino. Os autores encontraram 27,8 g/L de etanol após 72 horas de fermentação. Já Lu et al., (2013) utilizaram CO₂ supercrítico para pré-tratar a palha de milho e obtiveram um rendimento de 77,8% em açúcares.

O objetivo do presente trabalho foi apresentar um estudo da influência de parâmetros operacionais do pré-tratamento ácido (tempo, temperatura e concentração de ácido sulfúrico) dos resíduos de milho, palha e sabugo, através da realização de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³, em que o teor de açúcares redutores totais e de acidez foram as variáveis respostas obtidas no planejamento.

As escolhas dos níveis dos fatores seguiram critérios coerentes, relacionados com limitações dos equipamentos ou baseados em estudo já realizados na literatura. Com as melhores condições obtidas no estágio de pré-tratamento foram realizadas as etapas de sacarificação e fermentação etanólica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

O sabugo e palha de milho (*Zea mays*, pertencente à família Gramineae) in natura foram oriundos de espigas de milhos compradas na feira livre da cidade de Maceió-AL.

O extrato enzimático (Accelerase 1500) foi gentilmente cedido pela UFSCar, através de projeto de cooperação.

Na etapa de fermentação foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (comercial na forma liofilizada da marca Fermix).

Os demais reagentes de laboratório foram adquiridos em grau analítico e não sofreram qualquer tratamento antes de sua utilização.

2.2. Métodos

Os sabugos e palhas foram cortados em tamanhos menores e em seguida, passaram por secagem em estufa (a 45°C). Após se apresentar desidratado, foi triturado em um liquidificador industrial.

Um delineamento composto central rotacional com três fatores e três repetições no ponto central foi realizado, com o objetivo de otimizar o pré-tratamento.

Os três fatores estudados foram: tempo, temperatura e concentração de H₂SO₄. As variáveis respostas avaliadas foram acidez e teor de açúcares redutores totais (ART), onde duas melhores condições, em termos de teor de ART obtido, foram escolhidas para seguir as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

O método do pré-tratamento químico utilizou uma solução de ácido sulfúrico diluído (de concentrações diferentes baseadas no planejamento experimental) e carga de sólidos de 10%. A solução ácida, juntamente com a biomassa, foi adicionada à frascos Erlenmeyers, que foram fechados e colocados em reator tipo autoclave por tempo e temperatura também determinados no planejamento experimental.

Após o tempo de experimento e depressurização do reator, as amostras foram retiradas da autoclave e filtradas.

O teor de ART e a acidez foram determinados a partir do licor obtido no pré-tratamento através dos seguintes métodos: a determinação do teor de açúcares redutores totais (ART) foi feita por método espectrofotométrico, proposto por Miller (1959), e a acidez foi determinada conforme metodologia do Instituto Adolf Lutz (1985).

Os experimentos submetidos à hidrólise enzimática foram realizados utilizando a enzima comercial Accellerase 1500. Os ensaios ocorreram segundo Silva (2011), com 1,0% de carga de sólidos. A solução para hidrólise continha 60 mL de tampão citrato, pH 4,8 (50 mM), 38 mL de água destilada e 2 mL da enzima.

A hidrólise enzimática ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 mL em equipamento de agitação orbital, à 50°C e 150 rpm, por 72 horas. Após a hidrólise enzimática, o teor de ART foi determinado.

O microrganismo utilizado para a fermentação etanólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial. O líquido contendo glicose resultante da hidrólise enzimática foi utilizado na fermentação. Para o preparo do inóculo, foi utilizado o meio de cultura YPD. Em frascos Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados: 30 mL do hidrolisado, 0,6 g de peptona bacteriológica e 0,3 g de extrato de levedura.

O meio foi esterilizado a 121°C por 15 min. Após isso, foi adicionada 6,7 mL da solução de sulfato de magnésio e fosfato de amônio e por último, 0,3 g do fermento.

A fermentação ocorreu em equipamento de agitação orbital a 30°C, 200 rpm por 24 horas. O teor alcoólico foi determinado por destilação, utilizando-se o método espectrofotométrico a partir do dicromato de potássio.

O rendimento da fermentação (Rf) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (g/L) e o teor de ART presente inicialmente (g/L). Já a eficiência da fermentação (Ef) foi determinada pela relação entre o rendimento real da fermentação (Rf) e o teórico (0,511).

3. Resultados e Discussão

3.1. Planejamento experimental do pré-tratamento ácido

As Tabelas 1 e 2 apresentam a matriz de planejamento do sabugo e palha de milho, respectivamente, com todas as condições do pré-tratamento ácido, de acordo com o delineamento composto central rotacional com três repetições no ponto central e as variáveis respostas obtidas.

O teor de ART das biomassas in natura foi de: 17,88% para a palha e 25,92% para o sabugo de milho.

Tabela 1. Matriz de planejamento: Resultados para o sabugo de milho.

| Ensaio | Tempo (min) | Temperatura (°C) | Concentração de H ₂ SO ₄ (%) | Teor de ART (%) | Acidez (%) |
|--------|-------------|------------------|--|-----------------|------------|
| 1 | 15 (-) | 100 (-) | 0,5 (-) | 24,1 | 0,5 |
| 2 | 120 (+) | 100 (-) | 0,5 (-) | 40,6 | 0,6 |
| 3 | 15 (-) | 120 (+) | 0,5 (-) | 42,6 | 0,5 |
| 4 | 120 (+) | 120 (+) | 0,5 (-) | 38,9 | 0,6 |
| 5 | 15(-) | 100 (-) | 3,5 (+) | 36,4 | 2,6 |
| 6 | 120 (+) | 100 (-) | 3,5 (+) | 23,3 | 1,8 |
| 7 | 15 (-) | 120 (+) | 3,5 (+) | 26,5 | 3,0 |
| 8 | 120 (+) | 120 (+) | 3,5 (+) | 24,5 | 1,6 |
| 9 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 24,3±0,7 | 0,8±0,1 |
| 10 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 26,5±0,7 | 0,7±0,1 |
| 11 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 24,9±0,7 | 0,6±0,1 |
| 12 | 7 (-√2) | 110 (0) | 2 (0) | 61,5 | 1,6 |
| 13 | 142 (+√2) | 110 (0) | 2 (0) | 15,3 | 1,2 |
| 14 | 67,5 (0) | 96 (-√2) | 2 (0) | 17,5 | 1,1 |
| 15 | 67,5 (0) | 124 (+√2) | 2 (0) | 5,6 | 1,2 |
| 16 | 67,5 (0) | 110 (0) | 0,1 (-√2) | 11,5 | 0,2 |
| 17 | 67,5 (0) | 110 (0) | 4 (+√2) | 32,2 | 3,8 |

Tabela 2. Matriz de planejamento: Resultados para a palha de milho.

| Ensaio | Tempo (min) | Temperatura (°C) | Concentração de H ₂ SO ₄ (%) | Teor de ART (%) | Acidez (%) |
|--------|-------------|------------------|--|-----------------|------------|
| 1 | 15 (-) | 100 (-) | 0,5 (-) | 18,8 | 0,6 |
| 2 | 120 (+) | 100 (-) | 0,5 (-) | 45,4 | 0,7 |
| 3 | 15 (-) | 120 (+) | 0,5 (-) | 50,9 | 0,6 |
| 4 | 120 (+) | 120 (+) | 0,5 (-) | 42,7 | 0,7 |
| 5 | 15(-) | 100 (-) | 3,5 (+) | 33,6 | 3,0 |
| 6 | 120 (+) | 100 (-) | 3,5 (+) | 25,5 | 2,0 |
| 7 | 15 (-) | 120 (+) | 3,5 (+) | 33,4 | 3,1 |
| 8 | 120 (+) | 120 (+) | 3,5 (+) | 32,4 | 1,6 |
| 9 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 37,5±0,3 | 1,0±0,1 |
| 10 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 38,6±0,3 | 1,1±0,1 |
| 11 | 67,5 (0) | 110 (0) | 2 (0) | 37,7±0,3 | 0,9±0,1 |
| 12 | 7 (-√2) | 110 (0) | 2 (0) | 59,4 | 1,6 |
| 13 | 142 (+√2) | 110 (0) | 2 (0) | 31,7 | 1,4 |
| 14 | 67,5 (0) | 96 (-√2) | 2 (0) | 14,8 | 1,2 |
| 15 | 67,5 (0) | 124 (+√2) | 2 (0) | 7,3 | 1,5 |
| 16 | 67,5 (0) | 110 (0) | 0,1 (-√2) | 17,1 | 0,2 |
| 17 | 67,5 (0) | 110 (0) | 4 (+√2) | 32,5 | 3,6 |

Pela Tabela 1, verifica-se que os dois ensaios de maior teor de ART obtidos para o sabugo de milho foram o ensaio condição 3 (42,6% em teor de ART e 0,5% de acidez) e o ensaio 12 (61,5% em teor de ART e 1,6% de acidez), seguindo portanto para as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

Assim como ocorreu para o sabugo de milho a Tabela 2 mostra que, para a palha de milho, os dois ensaios de maior teor de ART foram também o ensaio 3 (50,9% em teor de ART e 0,6% de

acidez) e o ensaio 12 (59,4% em teor de ART e 1,6% de acidez), seguindo portanto para as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

3.2. Análise e modelo estatístico – sabugo de milho

Para verificar se o modelo estatístico obtido foi adequado ao sistema que se quer descrever, foi necessário adequá-lo a um modelo empírico que possa reproduzir com confiança os dados experimentais. Para isso, construiu-se a tabela ANOVA – análise de variância (Bruns et al., 2001).

A Tabela 3 apresenta os resultados da ANOVA referente às variáveis respostas em teor de ART e acidez, obtidos no planejamento experimental para o sabugo de milho. Observa-se que, para ambos os casos, o ajuste mais adequado aos dados se deu por um modelo cúbico, visto que o percentual de variação explicado através dos dados experimentais esteve sempre bem próximo ao percentual de variação explicável pelo modelo.

Tabela 3. ANOVA para o modelo cúbico: variáveis respostas para o sabugo de milho.

| Fonte de Variação | Soma quadrática | | Nº de graus de liberdade | | Média quadrática | |
|--|-----------------|--------|--|--------|------------------|--------|
| | Teor de ART | Acidez | Teor de ART | Acidez | Teor de ART | Acidez |
| Modelo | 2822,60 | 15,63 | 13 | 13 | 217,12 | 1,20 |
| Resíduo | 2,59 | 0,39 | 3 | 3 | 0,86 | 0,13 |
| Falta de Ajuste | 0,08 | 0,36 | 1 | 1 | 0,08 | 0,36 |
| Erro Puro | 2,51 | 0,03 | 2 | 2 | 1,26 | 0,01 |
| Total | 2825,19 | 16,02 | 16 | 16 | | |
| % de variação explicada (ART): 99,908 | | | % de variação explicada (acidez): 97,59 | | | |
| % de variação explicável (ART): 99,911 | | | % de variação explicável (acidez): 99,82 | | | |

As superfícies de resposta dos modelos cúbicos estão apresentadas na Figura 1 (a-b), considerando o nível inferior do tempo para o sabugo de milho.

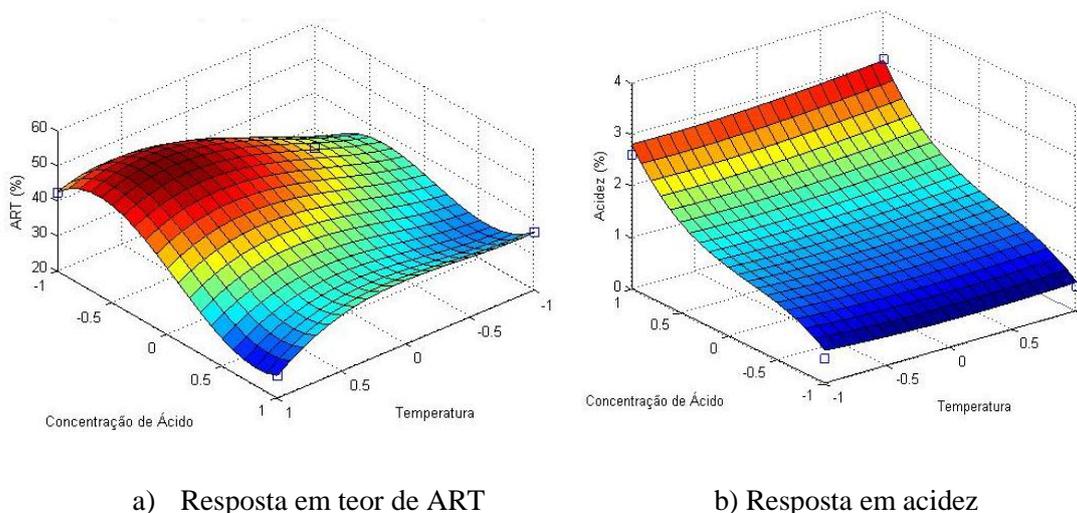


Figura 1. Superfície de resposta em 3 dimensões do sabugo no nível inferior de tempo.

Pela Figura 1a, é possível perceber que obtêm-se maiores teores de ART em condições de baixa concentração de ácido e elevadas temperaturas, dada pela região em vermelho intenso. Já na Figura 1b, nota-se que baixos níveis de acidez são dados em baixas concentrações de ácido sulfúrico a qualquer temperatura, indicada pela região em azul intenso.

Através de análise estatística dos fatores, observou-se que quando a concentração de ácido sai do nível inferior para o nível superior há uma redução, em média, de 4,4% no teor de ART. Logo, para se obter maiores teores em ART, que é a condição desejada, deve-se utilizar concentrações de H₂SO₄ em torno de 0,5%, que é o nível inferior. O efeito de interação da concentração de ácido com a temperatura e/ou com o tempo, apresentou que haverá redução no teor de ART ao sair de seus níveis inferiores para superiores. Redução de 3,48% para o caso da interação da concentração de ácido com o tempo e de 3,20% para o efeito da concentração de ácido com a temperatura. Esse é mais um indicativo de que deve-se trabalhar no nível inferior de concentração de ácido. Em relação ao efeito da temperatura, nota-se que há aumento de 1,02% no teor de ART quando se utiliza o nível superior. O tempo foi o fator que se mostrou menos significativo, porém a análise mostra indicativos de que deve-se trabalhar com 15 minutos, nível inferior, para se obter maiores teores em ART.

Esses resultados corroboram com os de Almeida et al. (2007), que afirmam que na presença de concentrações elevadas de ácido há formação de produtos inibidores, que são responsáveis pela degradação do material lignocelulósico, e conseqüentemente dos açúcares presentes na estrutura.

Em relação ao fator temperatura, a faixa investigada não foi ampla, apenas de 100 a 124°C, por conta de restrições do equipamento utilizado, logo é muito provável que não se tenha atingido uma temperatura de degradação, onde ocorre elevadas perdas de massa. Portanto, não houve problemas ao se trabalhar no nível superior de temperatura, onde ocorrerá uma maior desorganização na estrutura lignocelulósica da matéria-prima, o que tornará os açúcares fermentescíveis mais acessíveis, acarretando em maiores teores de ART após etapa de pré-tratamento (Dagnino et al., 2012).

Já em relação à resposta em acidez, a análise estatística fornece que, na faixa investigada, a temperatura não mostrou ser um fator significativo, nem mesmo a sua interação com os outros fatores. A concentração de ácido foi o mais significativo dos três fatores nas condições estudadas. Em relação às interações, a da concentração do ácido com o tempo foi a que se mostrou mais significativa, e o efeito de interação mostra que o menor tempo aliado as menores concentrações de ácido fornecem os menores percentuais de acidez. Em relação à análise conjunta das duas respostas estudadas, para maiores teores em ART e menores índices de acidez, que é o desejado, deve-se utilizar o fator temperatura em seu nível superior, 120°C, tempo de 15 minutos e concentração de H₂SO₄ em torno de 0,5%, ambos nos níveis inferiores.

Em seus estudos, Pereira et al. (2015), também verificaram a eficiência do pré-tratamento com ácido diluído (a 121°C, 30 minutos e 10% de carga de sólidos) na liberação de carboidratos em resíduos da cana-de-açúcar.

3.3. Análise e modelo estatístico – palha de milho

A Tabela 4 apresenta os resultados da ANOVA para as variáveis respostas obtidas no planejamento experimental para a palha de milho. Observou-se que, assim como ocorreu para o sabugo de milho, o modelo cúbico se adequou satisfatoriamente também para a palha, visto que o percentual de variação explicada esteve sempre bem próximo ao percentual de variação explicável pelo modelo.

Tabela 4. ANOVA para o modelo cúbico: variáveis respostas para a palha.

| Fonte de Variação | Soma quadrática | | Nº de graus de liberdade | | Média quadrática | |
|---------------------------------------|-----------------|--------|--|--------|------------------|--------|
| | Teor de ART | Acidez | Teor de ART | Acidez | Teor de ART | Acidez |
| Modelo | 2748,30 | 15,12 | 13 | 13 | 211,41 | 1,16 |
| Resíduo | 92,35 | 0,15 | 3 | 3 | 30,78 | 0,05 |
| Falta de Ajuste | 91,60 | 0,13 | 1 | 1 | 91,60 | 0,13 |
| Erro Puro | 0,75 | 0,02 | 2 | 2 | 0,37 | 0,01 |
| Total | 2840,65 | 15,26 | 16 | 16 | | |
| % de variação explicada (ART): 96,75 | | | % de variação explicada (acidez): 99,04 | | | |
| % de variação explicável (ART): 99,97 | | | % de variação explicável (acidez): 99,88 | | | |

As superfícies de resposta dos modelos cúbicos também são apresentadas na Figura 2 (a-b), considerando o nível inferior do tempo.

Pela Figura 2a, percebe-se que maiores teores em ART, que é o desejado com o pré-tratamento, são obtidos ao utilizar baixas concentrações de H₂SO₄ e altas temperaturas. A análise de significância estatística dos fatores mostra que neste caso, a concentração de ácido reduz em média 4,11% do teor de ART quando se passa do nível inferior para o nível superior desse fator. Este é um Indicativo de que para trabalhar com maiores teores em ART (%) deve-se utilizar concentrações de H₂SO₄ na faixa de 0,5%. Já o efeito da temperatura, que se mostrou o mais significativo dos três, indicou que um aumento médio de 4,50% no teor de ART é obtido quando se eleva a temperatura de 100°C para 120°C. O tempo foi o que apresentou menor valor do seu efeito no sistema. No entanto, o seu efeito combinado com a temperatura e/ou com a concentração de H₂SO₄ indica que se deve trabalhar com tempos reacionais menores para se obter maior teor em ART.

Na Figura 2b os menores índices de acidez, ideal para um bom andamento do pré-tratamento, são identificados em baixas concentrações de ácido, porém mostram-se independente da temperatura. Através da análise estatística nota-se que, na faixa investigada, a temperatura não mostrou ser um fator significativo na resposta da acidez, nem mesmo sua interação com os demais fatores. A concentração de ácido foi o mais significativo dos três fatores nas condições estudadas. A interação da concentração do ácido com o tempo foi a que se mostrou mais significativa, e o efeito de interação mostra que o menor tempo aliado as menores concentrações de ácido fornecem os menores percentuais de acidez. Em relação à análise conjunta, para maiores teores de ART e menor índice de Acidez, deve-se utilizar temperatura em torno de 120°C, tempo de 15 minutos e concentração de H₂SO₄ em torno de 0,5%.

Chen et al. (2007), utilizaram ácido sulfúrico diluído (1%) na etapa de pré-tratamento de sabugos de milho a 108°C e alcançaram valores próximos a 68% em rendimento na sacarificação.

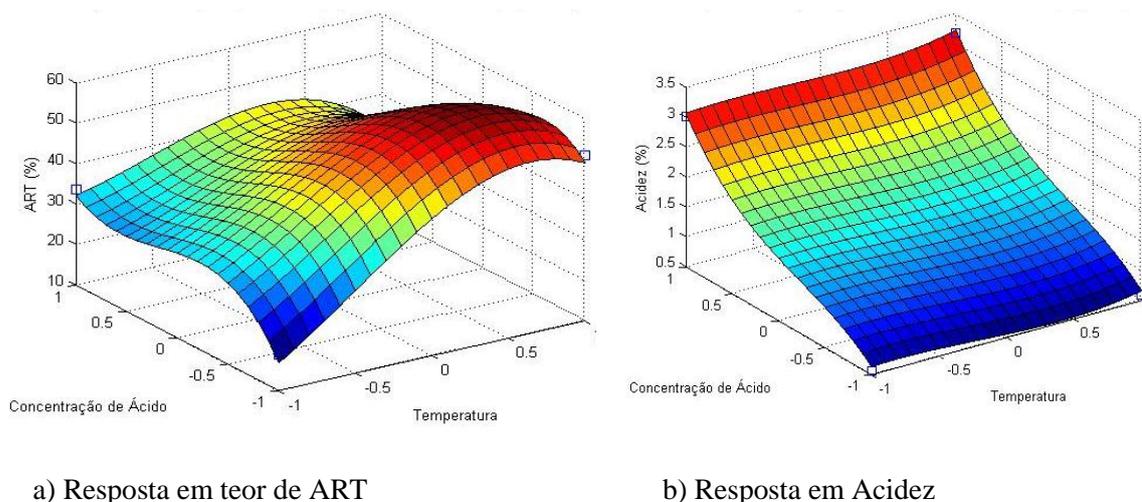


Figura 2. Superfícies de resposta em 3 dimensões da palha no nível inferior de tempo.

3.4. Etapas de sacarificação e fermentação

A Tabela 5 apresenta os resultados após as etapas de hidrólise enzimática e fermentação tanto para o sabugo quanto para a palha de milho. As análises foram em relação ao teor de ART presente nas amostras.

Pode-se perceber que a maior eficiência fermentativa se deu na condição 3 do pré-tratamento ácido (15 min; 120°C e 0,5% H₂SO₄) tanto para o sabugo quanto para palha do milho: 70,8 e 92,9%, respectivamente. Essa condição foi a que apresentou o menor teor de acidez, viabilizando em consequência, maior produção de etanol. A condição 12 por sua vez, apresentou menor teor de etanol para as duas matérias-primas. Nessa condição do planejamento experimental uma maior concentração de ácido foi utilizada na etapa de pré-tratamento, o que pode ter contribuído para uma menor produção de etanol devido à formação de compostos inibidores do processo fermentativo. A concentração de etanol produzido nesse trabalho ainda é relativamente baixa em relação a outros autores (Cao et al., 1996; Zhang et al., 2010), isso se deve provavelmente a otimização da etapa de hidrólise enzimática, que apresentou baixas conversões, como também a etapa de fermentação.

Tabela 5. Resultados obtidos após as etapas de hidrólise enzimática e fermentação.

| Matéria-prima | Condição do DCCR | ART no hidrolisado (g/L) | Conversão Enzimática (%) | Etanol Produzido (g/L) | Eficiência Fermentativa (%) |
|-----------------|------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Sabugo de Milho | 3 | 6,1 | 34,3 | 2,2 | 70,8 |
| | 12 | 8,7 | 51,4 | 2,1 | 56,3 |
| Palha de Milho | 3 | 19,6 | 83,3 | 9,3 | 92,9 |
| | 12 | 10,4 | 59,0 | 4,4 | 82,9 |

4. Conclusões

Por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), foi possível obter um modelo cúbico significativo para explicar as variáveis: temperatura, tempo e concentração de ácido, sobre a liberação de açúcares redutores totais e índice de acidez no processo de pré-tratamento com ácido diluído.

De acordo com o DCCR, a maior liberação de ART e o menor teor de acidez foram obtidos no ensaio 3 do delineamento experimental (15 min; 120°C e 0,5% H₂SO₄). Para essa condição, a eficiência de fermentação foi de 70,8% para o sabugo e de 92,9 para a palha de milho, indicando o potencial das biomassas estudadas para produção de etanol celulósico através de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

5. Agradecimentos

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior pela bolsa de mestrado e ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pelo apoio financeiro.

6. Referências

- ALMEIDA, J.R.M, MODIG, T., PETERSSON, A., HÄHN-HÄGERDAL, B., LIDÉN, G., GORWA-GRAUSLUND, M.F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 82, n. 4, p. 340-349.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, v.101, n.13, p.4851-4861.
- BACH, F., FIORESE, M. L., HASAN, S. D. M., MOREJON, C. F. M. 2014. Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite. *Engevista*, v. 16, n. 3, p. 392-409.
- BRUNS, R. E., NETO, B. B., SCARMÍNIO, I. S. 2001. *Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, 2ª edição, Editora Unicamp.
- CAO, N. J., KRISHMAN, M. S., DU, J. X., GONG, C. S., HO, N. W. Y., CHEN, Z. D., TSAO, G. T. 1996. Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. *Biotechnology Letters*, v.18, n.9, p.1013-1018.
- CHEN, M., XIA, L., XUE, P. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysates. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 59, p. 85-89.
- CHEN, W-H., TU, Y-J., SHEEN, H-K., 2011. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*, n.88, p.2726-2734.
- DAGNINO, E.P., CHAMORRO, E.R., ROMANO, S.D., FELISSIA, F.E., AREA, M.C. 2012. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, p.363-368.
- GALBE, M., ZACCHI, G. 2007. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.108, p.41-65.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). 1985. *Métodos Químicos para Análise de Alimentos*. 3 ed. São Paulo.

- LOYD, T.A., WYMAN, C.E. 2005. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*, n.96, p.1967–1977.
- LU, H., REN, M., ZHANG, M., CHEN, Y. 2013. Pretreatment of Corn Stover Using Supercritical CO₂ with Water-Ethanol as Co-solvent. *Biotechnology and Bioengineering - Chinese Journal of Chemical Engineering*, n.21, n.5, p.551-557.
- MEYER, P.A., TEWS, I.J., MAGNUSON, J.K., KAROGIOSIS, S.A., JONES, S.B. 2013. Techno-economic analysis of corn stover fungal fermentation to ethanol. *Applied Energy*, v.111, p. 657-668.
- MILLER, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428.
- MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPER, M., LADISCH, M. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p.673-686.
- MOU, H., LI, B., FARDIM, P. 2014. Pretreatment of corn stover with the modified hydrotropic method to enhance enzymatic hydrolysis. *Energy & Fuels*, v. 28, p. 4288-4293.
- PALMQVIST, E., HAHN-HAGERDAL, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 17-24.
- PEREIRA, S. C., MAEHARA, L., MACHADO, C. M. M., FARINAS, C. S. 2015. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for biofuels*, v8, p. 44.
- PIENKOS, P. T., ZHANG, M. 2009. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*, v.16, p.743-762.
- ROGALINSKI, T., INGRAM, T., BRUNNER, G. 2008. Hydrolysis of lignocellulosic biomass in water under elevated temperatures and pressures. *Journal of Supercritical Fluids*, v.47 p.54–63.
- SAHA, B.C., ITEN, L.B., COTTA, M.A., WU, Y.V. 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnology Progress*, v.21, n.3, p.816-822.
- SANTOS, F., QUEIROZ, J. H., COLODETTE, J., SOUZA, C. J. 2013. *Bioenergia & Biorrefinaria - Cana-de-Açúcar & Espécies Florestais*; Ed. da UFV: Viçosa. 551p.
- SCHEUFELE, F. B., BUTZKE, A. L., MARRA, I. F., HASAN, S. D. M., FIORESE, M. L. 2012. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engvista*, v. 14, p.310-321.
- SILVA, G. M. 2011. *Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol*. 104p. Dissertação de mestrado - UFSCar, São Carlos – SP.
- SUN, Y., CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p.1–11.
- ZHANG, M., WANG, F., SU, R., QI, W., HE, Z. 2010. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresource Technology*, n.101, p.4959–4964.
- ZHAO, J., XIA, L. 2009. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. *Fuel Processing Technology*, n.90 p.1193–1197.
- ZHAO, X-B., WANG, L., LIU, D-H. 2007. Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.82, n.12, p.1115-1121.
- YOO, J., ALAVI, S., VADLANI, P., AMANOR-BOADU, V. 2011. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. *Bioresource Technology*, v.102, n.16, p.7583-759.