

Estácio Jussie Odisi

**SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO  
ADICIONADO DE ÁLCALI OU CINZAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mara Gabriela Novy Quadri  
Coorientador: Prof. Dr. André Oliveira de Souza Lima

Florianópolis  
2013

Odisi, Estácio Jussie

Sacarificação enzimática do bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio adicionado de álcali ou cinzas [dissertação] / Estácio Jussie Odisi ; orientadora, Mara Gabriela Novy Quadri ; co-orientador, André Oliveira de Souza Lima. - Florianópolis, SC, 2013.

91 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. bagaço cana-de-açúcar. 3. pré-tratamento. 4. peróxido de hidrogênio. 5. cinzas. I. Quadri, Mara Gabriela Novy. II. Lima, André Oliveira de Souza. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Estácio Jussie Odisi

**SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-  
AÇÚCAR PRÉ-TRATADO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO  
ADICIONADO DE ÁLCALI OU CINZAS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 28 de janeiro de 2013.

---

Prof. Ricardo Antônio Francisco Machado, Dr.  
Coordenador do CPGENQ

---

Prof.<sup>a</sup> Mara G. N. Quadri, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora

---

Prof. André O. Souza Lima, Dr.  
Coorientador

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Agenor Furigo Junior, Dr.  
Membro

---

Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira, Dr.<sup>a</sup>  
Membro

---

Prof. Marinho Bastos Quadri, Dr.  
Membro



Anastácio, Marilete, Marilins e a minha bisavó Luiza (*in memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e meus pais Anastácio e Mariliete que são as luzes que iluminaram toda essa jornada de mestrado e vida.

A pimpolha da minha irmã Marilins, que apesar de falar muito, é a minha xereta do coração. A minha bisavó Luiza que nos deixou no meio desta caminhada, mas continua sempre presente através de seus ensinamentos e no meu coração. Agradeço também toda minha grande família por estarem sempre presentes.

A minha mestre e orientadora Mara Gabriela Novy Quadri que além de uma dedicada orientadora têm sido a grande mãe do laboratório sempre nos acolhendo.

Ao mestre André Oliveira de Souza Lima que incentivou toda esta caminhada e esteve presente em todo processo de coorientação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Aos professores membros da banca pela disponibilidade e pelas correções feitas, que permitiram melhorar o potencial deste trabalho.

Ao pessoal dos laboratórios LASIPO (laboratório de Sistemas Porosos – UFSC) e LGM (Laboratório de Genética Molecular - UNIVALI), agradeço aos ensinamentos e companhia. O grande apoio do Tiago Tolentino, Vivian Colonetti, Rômulo Rodrigues, Andressa Gilioli e a grande amizade de Jônata Biehl e Felipe Avelar.

Aos grandes amigos Rogério, Priscila, Tiago, Marinho e Juninho que sempre foram parte da minha casa em Florianópolis.





*“Às vezes é preciso aprender a correr antes de começar a andar”.*

- Anthony Edward Stark



Nos últimos anos tem surgido um grande interesse mundial no desenvolvimento de tecnologias que consigam aproveitar resíduos lignocelulósicos para obtenção de açúcares fermentescíveis. O bagaço da cana-de-açúcar é o principal resíduo agroindustrial do Brasil. Por mais que o bagaço seja empregado para geração de energia, grandes excedentes continuam sem aplicação. No entanto, o bagaço apresenta uma natureza recalcitrante, devido ao arranjo estrutural formado pelos seus componentes celulose, hemicelulose e lignina. Com isso, se torna necessário uma etapa de pré-tratamento para desprender a lignina e hemicelulose fazendo com que a celulose seja liberada e esteja acessível para as enzimas celulases. Partindo desta premissa, este trabalho estudou o pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar para uma sacarificação enzimática eficiente. Para tanto, foram avaliados dois métodos de pré-tratamento: um utilizando o peróxido de hidrogênio alcalino como um processo padrão e outro utilizando o peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas (objeto de estudo do presente trabalho). Para ambos pré-tratamentos, foram determinados as melhores condições de execução através de planejamentos experimentais, avaliando as variáveis: temperatura, concentração de  $H_2O_2$ , agitação, concentração de cinzas e por fim o tempo reacional, obtendo como superfície de resposta o rendimento de açúcares redutores liberados durante a hidrólise enzimática. Posteriormente, foram realizadas análises de composição e identificação de estruturas químicas e caracterização morfológica no bagaço antes e após os pré-tratamentos. A melhor condição para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi de 9,39% (v/v)  $H_2O_2$ , 46°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 40 minutos. Já para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas, a condição de 6,32% (v/v)  $H_2O_2$ , 3,40% (p/v) cinzas, 60°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 2 horas foi a condição adequada. O rendimento de açúcares redutores após 48 horas de hidrólise enzimática para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi de 217,6 mg g<sup>-1</sup> bagaço e de 179,9 mg g<sup>-1</sup> bagaço para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas, enquanto que para o bagaço não tratado foi de apenas 74,3 mg g<sup>-1</sup> bagaço, enquanto que o rendimento de glucose foi o mesmo para os dois pré-tratamentos, mostrando que possuem a mesma eficiência. Ambos pré-tratamentos não apresentaram modificações significativas na

estrutura química do bagaço antes e após pré-tratamento. Além disso, foi possível observar uma pequena desorganização física nas fibras do bagaço. Ambos pré-tratamentos possuem a mesma eficiência no rendimento de glucose, no entanto, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino apresenta formação de resíduos cáusticos envolvendo uma etapa de lavagem dispendiosa e com geração de efluente, além de promover parcial degradação da hemicelulose. Desta forma o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas apresenta-se mais viável para uma aplicação amigável ao meio ambiente.

**Palavras-chave:** bagaço cana-de-açúcar, pré-tratamento, peróxido de hidrogênio, cinza, celulases.

In the last years there is a worldwide emerging interest in the development of technologies that are able to take advantage of lignocellulosic residues to obtain fermentable sugars. The sugarcane bagasse is the principal agroindustrial residue from Brazil. Although the bagasse is used for power generation, large surplus remains still without application. Its recalcitrant nature, due to the arrangement formed by the structural components cellulose, hemicellulose and lignin, makes necessary a pretreatment step to release cellulose from lignin and hemicellulose permitting, then, cellulase enzymes to access the molecules. This work studied the efficiency of two pretreatments of the sugarcane bagasse in promoting the enzymatic saccharification: one using alkaline hydrogen peroxide as a standard process and another using hydrogen peroxide supplemented with ash. For both pretreatments, the best operational conditions were evaluated using experimental design. The variables studied were temperature,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration, agitation, ash concentration and reaction time; the response variable was reducing sugars released during enzymatic hydrolysis. Modifications promoted on the bagasse by the pretreatments were evaluated by analysis of chemical composition, identification of chemical structures and morphological characterization, before and after pretreatments. The best condition found for the hydrogen peroxide alkaline pretreatment was 9.39% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 46°C temperature and stirring of 1.67 Hz for a reaction time of 40 minutes, and for hydrogen peroxide supplemented with ash pretreatment, the best condition was 6.32% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3.40% (w/v) ash, 60°C and 1.67 Hz stirring for a reaction time of 2 hours. The yield, expressed in reducing sugars, after 48 hours of enzymatic hydrolysis for the alkaline hydrogen peroxide pretreatment was 217.6 mg g<sup>-1</sup> bagasse, and 179.9 mg g<sup>-1</sup> bagasse for hydrogen peroxide ash pretreatment; the untreated bagasse gave 74.3 mg g<sup>-1</sup> bagasse yield, whereas the yield of glucose was the same for both pre-treatment, showing that have the same efficiency. Both pretreatments showed no significant changes in the chemical structure of the pulp before and after pretreatment. Moreover, we observed a small physical clutter in the fibers of bagasse. Both pretreatments have the same efficiency in the yield of glucose, however, pretreatment with alkaline hydrogen peroxide shows formation of caustic residues involving an expensive step wash and worth generation of effluent, besides promote partial degradation of hemicellulose, therefore

the pretreatment with hydrogen peroxide supplemented with ash appears more feasible for implementation.

**Keywords:** sugarcane bagasse, pretreatment, hydrogen peroxide, ash, cellulases.

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Típico arranjo da parede celular de uma célula. ....	6
Figura 2 - Associação dos componentes da parede celular. (1) Esqueleto da cadeia de celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) Arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar; (3) Cristalito de celulose; (4) Secção transversal da microfibrila da celulose, mostrando cristalitos de celulose embebidos na matriz de hemicelulose e protolignina.....	8
Figura 3 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando al-guns grupos substituintes. Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-Dglicopirranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFa = ácido desidroferúlico.....	9
Figura 4 - Estrutura dos fenilpropanóides que compõem a lignina: (1) p-cumarílico, (2) coniferílico e (3) sinapílico. ....	11
Figura 5 – Produção dos principais países produtores de cana-de-açúcar em 2010.....	12
Figura 6 - Depósito de bagaço (resíduo) de cana-de-açúcar em usina de produção de álcool. ....	13
Figura 7 - Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas celulases para realizar hidrólise. ....	14
Figura 8 - Mecanismo de hidrólise da celulose pelo complexo de celulases do gênero <i>Trichoderma</i> . (Endos - endoglucanases; exosR - exoglucanases atuando nos terminais redutores; exosNR - exoglucanases atuando nos terminais não redutores; $\beta$ -Gase – $\beta$ -glucosidases). ....	22
Figura 9 - Bagaço utilizado para os ensaios de pré-tratamento. ....	23
Figura 10 - Bagaço carbonizado (à esquerda) e cinzas (à direita). ....	24
Figura 11 – Fluxograma da metodologia aplicada para determinação da eficiência dos pré-tratamentos avaliados. ....	30
Figura 12 – Influência da temperatura e do pH na atividade da enzima $\beta$ -glucosidase sobre o substrato PNP-G. ....	37
Figura 13 - Influência da concentração de glucono-delta-lactona na atividade das enzimas $\beta$ -glucosidase e exoglucanase sobre os substratos PNP-G e PNP-C. ....	38

Figura 14 - Influência da temperatura e do pH na atividade da enzima exoglucanase sobre o substrato PNP-C adicionado de 50 mM de glucono-delta-lactona. ....	38
Figura 15 - Temperatura e pH ótimo da enzima endoglucanase. ....	39
Figura 16 - Curvas de níveis do rendimento de ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e temperatura, sob agitação de 1,67 Hz. Os números sobre os contornos representam o rendimento de ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	42
Figura 17 - Curvas de níveis do rendimento de ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e agitação, com a concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em 5%. Os números sobre os contornos representam o rendimento de ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	43
Figura 18 - Curvas de níveis do rendimento dos ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Os números sobre os contornos representam os ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	46
Figura 19 - Curvas de níveis do rendimento dos açúcares redutores após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Os números sobre os contornos representam o rendimento em ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	49
Figura 20 - Rendimento de ART em função do tempo do pré-tratamento de peróxido de hidrogênio alcalino com 9,39% concentração H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 46°C de temperatura e 1,67 Hz de agitação. Foi realizada uma hidrólise de 48 horas para cada tempo de pré-tratamento. ....	51
Figura 21 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e concentração de cinzas com a temperatura mantida em 40 °C. Os números sobre os contornos representam os ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	55
Figura 22 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de cinzas e temperatura com a concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mantida em 5%. Os números sobre os contornos representam os ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). ....	56



Figura 23 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de cinzas e concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> com a temperatura mantida em 60 °C . Os números sobre os contornos representam os ART (mg g <sup>-1</sup> do bagaço). .....	59
Figura 24 - Rendimento de ART em função do tempo do pré-tratamento com 6,32% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 3,40% (p/v) cinzas, 60°C de temperatura e 1,67 Hz de agitação. Foi realizada uma hidrólise de 48 horas para cada tempo de pré-tratamento. ....	61
Figura 25 - Rendimento de ART e glucose após hidrólise enzimática do bagaço. Pré-tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alcalino (vermelho); Pré-tratamento com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas (verde) e Sem pré-tratamento (azul). ....	63
Figura 26 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar. ....	65
Figura 27 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço hidrolisado (púrpura). ....	68
Figura 28 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço pré-tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> alcalino (azul) e com o bagaço pré-tratado submetido à hidrólise enzimática (púrpura). ....	69
Figura 29 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com amostra de cinza obtida pela queima do bagaço (verde). ....	70
Figura 30 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço pré-tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas (azul) e com o bagaço pré-tratado submetido à hidrólise enzimática (púrpura). ....	71
Figura 31 - Micrografia do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. A e B – Bagaço sem tratamento. C e D - Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. E e F – Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino e submetido à hidrólise enzimática. ....	73
Figura 32 - Micrografia do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas. A – Bagaço sem tratamento. B - Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas. C – Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas submetido à hidrólise enzimática. ....	74



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática.....	16
Tabela 2 - Potencial de oxidação de diferentes oxidantes. ....	17
Tabela 3 - Composição química (%) do bagaço da cana-de-açúcar.....	35
Tabela 4 - Quantificação dos principais metais das cinzas.....	36
Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial $2^3$ completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino, e a superfície de resposta em ART liberados após 60 horas de hidrólise enzimática. ....	40
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial $2^3$ completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	40
Tabela 7 - Efeitos e coeficientes de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento fatorial $2^3$ completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	41
Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela do pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas. ....	44
Tabela 9 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	45
Tabela 10 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	45
Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas. ....	47
Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	48
Tabela 13 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental $2^2$ composto central de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com $H_2O_2$ alcalino. ....	48

Tabela 14 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2 <sup>3</sup> completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas. ....	53
Tabela 15 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento experimental fatorial 2 <sup>3</sup> completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas. ....	53
Tabela 16 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental fatorial 2 <sup>3</sup> completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas. ....	54
Tabela 17 - Matriz do planejamento experimental planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas. ....	57
Tabela 18 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento experimental planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas. ....	58
Tabela 19 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> suplementado com cinzas. ....	58
Tabela 20 - Rendimento de ART e glucose liberados após 48 horas de hidrólise enzimática em função do tipo de pré-tratamento. ....	62
Tabela 21 - Composição química do bagaço da cana-de-açúcar após o pré-tratamento. ....	64
Tabela 22 - Valores e atribuições das bandas de FTIR. ....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ABR	Azul Brilhante do Remazol
ANOVA	Análise de variância
ART	Açúcares redutores totais
AZO-CMC	Azo-CM-Celulose
C	Concentração de cinzas
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	3,5-dinitrosalicílico
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
P	Concentração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PNP	$\rho$ -nitrofenil
PNP-C	$\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo
PNP-G	$\rho$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo
T	Temperatura
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina



<b>1</b>	<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	IMPORTÂNCIA DO ESTUDO .....	1
1.2	OBJETIVOS .....	3
1.2.1	Objetivo geral.....	3
1.2.2	Objetivos específicos .....	3
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....	5
2.1.1	Composição química dos resíduos lignocelulósicos .....	6
2.1.1.1	Celulose .....	7
2.1.1.2	Hemicelulose .....	8
2.1.1.3	Lignina.....	10
2.1.1.4	Outros Extrativos.....	11
2.1.2	Bagaço da cana-de-açúcar.....	11
2.2	PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS CELULÓSICOS .....	14
2.2.1	Método químico de pré-tratamento .....	17
2.2.1.1	Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio.....	17
2.3	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	21
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	SUBSTRATO .....	23
3.1.1	Preparo do bagaço da cana-de-açúcar .....	23
3.1.2	Preparo das cinzas do bagaço da cana-de-açúcar.....	24
3.1.3	Caracterização química .....	24
3.1.3.1	Determinação do teor de extrativos totais.....	24
3.1.3.2	Determinação do teor de celulose .....	25
3.1.3.3	Determinação do teor de holocelulose .....	25
3.1.3.4	Determinação do teor de lignina de Klason .....	26
3.1.3.5	Determinação do teor de cinzas .....	26
3.1.3.6	Quantificação de metais .....	26
3.1.3.7	Identificação espectrométrica de compostos orgânicos .....	27
3.1.3.8	Caracterização morfológica .....	27
3.2	ENZIMAS .....	27
3.2.1	Ensaio de atividade enzimática.....	27
3.2.1.1	$\beta$ -glucosidase .....	27
3.2.1.2	Exoglucanase .....	28
3.2.1.3	Endoglucanase .....	29
3.2.2	Condições ótimas de atividade da enzima.....	29
3.2.2.1	Determinação da temperatura ótima .....	29
3.2.2.2	Determinação do pH ótimo.....	29
3.3	PRÉ-TRATAMENTO .....	30
3.3.1	Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino .....	31
3.3.2	Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas.....	31

3.3.3	Planejamento experimental e análise estatística dos dados .....	31
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	32
3.4.1	Açúcares Redutores Totais (ART) .....	32
3.4.2	Quantificação da Glucose.....	33
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA .....	35
4.1.1	Bagaço da cana-de-açúcar.....	35
4.1.2	Cinzas do bagaço da cana-de-açúcar.....	35
4.2	AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DAS ENZIMAS .....	36
4.2.1	$\beta$ -glucosidase.....	36
4.2.2	Exoglucanase.....	37
4.2.3	Endoglucanase.....	38
4.2.4	Considerações .....	39
4.3	PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO ....	39
4.3.1	Planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> completo.....	39
4.3.2	Otimização das condições de pré-tratamento .....	43
4.3.3	Cinética do pré-tratamento .....	50
4.4	PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SUPLEMENTADO COM CINZAS.....	52
4.4.1	Planejamento 2 <sup>3</sup> fatorial completo.....	52
4.4.2	Otimização das condições de pré-tratamento .....	56
4.4.3	Cinética do pré-tratamento .....	60
4.5	CARACTERIZAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO.....	61
4.5.1	Quantificação dos açúcares liberados.....	61
4.5.2	Composição química do bagaço pré-tratado .....	63
4.5.3	Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.....	64
4.5.4	Caracterização morfológica.....	72
4.5.5	Considerações finais.....	75
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>91</b>



## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

---

### 1.1 IMPORTÂNCIA DO ESTUDO

Nos últimos anos tem surgido um grande interesse mundial no desenvolvimento de tecnologias que consigam aproveitar a biomassa lignocelulósica para obtenção de produtos. Entre as diferentes formas de biomassa, os resíduos lignocelulósicos tem despertado grande interesse, devido à disponibilidade em larga escala, o baixo custo na obtenção e uma possível produção energética de forma ambientalmente correta (LYND et al., 2005; BETANCUR; JUNIOR, 2010). Entre os resíduos lignocelulósicos, o bagaço é aquele considerado como principal resíduo agroindustrial brasileiro, sendo produzido em cerca de 125 kg de bagaço seco por tonelada de cana-de-açúcar (ZANIN et al., 2000). Tendo em vista que o Brasil produziu cerca de 700 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2010, somente neste ano 87,5 milhões de toneladas de bagaço seco foram produzidos. Por mais que o bagaço seja empregado para geração de energia servindo como combustível de caldeiras, ainda grande excedente se encontra sem aplicação.

O bagaço da cana-de-açúcar é composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, representando cerca de 93% de sua massa seca (ZANIN et al., 2000). A conversão desta celulose e hemicelulose em açúcares monoméricos é um processo bastante estudado devido ao grande potencial econômico que esta atividade oferece. Os açúcares monoméricos resultantes da conversão podem ser utilizados para a obtenção de produtos como etanol, polihidroxibutirato, vitamina C (ácido L-ascórbico), ácido cítrico, ácido glucônico, ácido lático, ácido polilático, sorbitol e outros.

No entanto, o bagaço da cana-de-açúcar, assim como os demais resíduos lignocelulósicos, apresenta uma natureza recalcitrante devido ao arranjo estrutural formado pelos seus componentes celulose, hemicelulose e lignina. Esta recalcitrância faz com que as enzimas celulasas não tenham acesso à celulose para realizar uma degradação eficaz e liberar os açúcares monoméricos. Uma conversão efetiva de bagaço da cana-de-açúcar em açúcares monoméricos requer três passos sequenciais: (1) redução do tamanho, (2) pré-tratamento e (3) hidrólise enzimática (ZHANG; LYND, 2004; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). Sendo assim, o principal obstáculo e dificuldade tecnológica para a produção em escala industrial de produtos fermentáveis a partir de lignocelulose é superar a recalcitrância natural destes materiais lignocelulósicos.

cos, que deve ser hidrolisado por enzimas para produzir açúcares fermentescíveis (WYMAN, 1999).

Partindo desta premissa, inúmeras técnicas de tratamento de materiais lignocelulósicos têm sido descritas com a finalidade de desprender a lignina destes materiais liberando a celulose e hemicelulose para uma posterior hidrólise enzimática obtendo açúcares monoméricos de vasta aplicação econômica. Entre as técnicas já descritas na literatura, pré-tratamentos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos têm sido utilizados (MOSIER et al., 2005; ALVIRA et al., 2010). O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino tem chamado atenção, vistos os grandes rendimentos apresentados em trabalhos recentes (MONTE; BRIENZO; MILAGRES, 2011; RABELO et al., 2011; KARAGÖZ et al., 2012). Além disso, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) tem a vantagem de não gerar resíduos, uma vez que se decompõe em água e oxigênio, sendo assim, não gera subprodutos que inibem a hidrólise enzimática. No entanto, sabe-se que a elevação do pH para valores tão altos (normalmente 11,5) exige a adição de quantidades consideráveis de hidróxido de sódio, o que resulta na geração de resíduos cáusticos impróprios para serem descartados no meio ambiente.

Devido ao problema apontado com o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, o presente trabalho estuda um processo de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio sem utilizar a hidróxido de sódio para alcalinizar o meio. Cinzas provenientes do próprio bagaço foram usadas para garantir uma oxidação eficiente do bagaço, uma vez que o peróxido de hidrogênio, isoladamente, não tem poder para modificar as estruturas lignocelulósicas envolvidas no processo de modo a favorecer a hidrólise enzimática. Em comparação com outros métodos químicos, este pré-tratamento tem como grande diferencial o fato de não utilizar ácidos e álcalis fortes, resultando em um processo com baixa carga de resíduos, e não degradando grande parte dos açúcares como ocorre nos processos ácidos (YANG; WYMAN, 2008). Além disso, as cinzas podem ser facilmente obtidas nas caldeiras da própria indústria da cana-de-açúcar, fazendo com que desta forma até mesmo as cinzas das caldeiras tenham aplicação, diminuindo ainda mais os resíduos gerados pela indústria.

Sendo assim, este trabalho estudou o pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar para posterior hidrólise enzimática. Para tanto foram avaliados dois métodos de pré-tratamento: um utilizando o peróxido de hidrogênio alcalino como um processo padrão (GOULD, 1985) e outro utilizando o peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas. Para ambos foram determinados as melhores condições de trabalho visando o

maior rendimento possível de açúcares na etapa de hidrólise enzimática; foram ainda realizadas análises químicas e físicas para caracterizar as possíveis formas que cada pré-tratamento atua sobre as fibras do bagaço.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Caracterizar, avaliar e comparar os pré-tratamentos com peróxido de hidrogênio alcalino e peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas para uma sacarificação enzimática eficiente do bagaço da cana-de-açúcar.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a composição e estruturas químicas do bagaço da cana-de-açúcar antes e após pré-tratamentos;
- b) Caracterizar a morfologia do bagaço da cana-de-açúcar antes e após os pré-tratamentos.
- c) Avaliar as condições ótimas de temperatura e pH das enzimas utilizadas para hidrólise enzimática;
- d) Estabelecer a melhor condição do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para obtenção de açúcares redutores na hidrólise enzimática;
- e) Otimizar a melhor condição para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas para obtenção de açúcares redutores na hidrólise enzimática;
- f) Comparar a eficiência entre os dois pré-tratamentos através da quantificação dos açúcares formados após hidrólise enzimática;



## **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

Este capítulo apresenta a revisão bibliográfica referente aos temas fundamentais para o entendimento do trabalho. Em seguida, são expostas algumas considerações a respeito destes temas e as suas relações com o trabalho.

### **2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA**

A biomassa de uma forma mais ampla se refere a qualquer tipo de matéria orgânica oriunda de vegetais, animais, ou ainda de processos de transformações naturais e artificiais (AGUIAR, 2010). Na grande maioria a biomassa tem origem direta ou indireta no processo de fotossíntese sendo, portanto, uma fonte renovável. Dentre as formas de biomassa existentes, a biomassa residual de lignocelulósicos tem recebido uma grande atenção nos últimos anos (LYND et al., 2005). São exemplos de resíduos lignocelulósicos o bagaço da cana-de-açúcar, sabugo de milho, farelo de cevada, palha de arroz, palha de trigo, casca de aveia, palha de sorgo, palha de milho, semente de algodão, jornal, resíduos urbanos e casca de soja (AGUIAR, 2010).

Os resíduos lignocelulósicos têm despertado grande atenção no cenário de energias renováveis, devido à disponibilidade em larga escala, o baixo custo na obtenção e uma possível produção energética de forma ambientalmente correta (LYND et al., 2005; BETANCUR; PEREIRA JR., 2010). Segundo Lynd et al. (2005), a produção de energia e muitos ciclos de utilização baseada em biomassa celulósica tem uma geração quase nula de gases do efeito estufa, quando considerado todo seu ciclo de vida. No entanto, estes resíduos quando utilizados de forma integrada e racional podem revolucionar outras indústrias além do setor energético, assim como a de alimentos, forragens e produtos químicos (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; BETANCUR; PEREIRA JR., 2010). O desenvolvimento de tecnologias que processem esta biomassa trará benefícios imensuráveis para países como o Brasil que possuem uma extensa área de alta produtividade biológica (BETANCUR; PEREIRA JR., 2010).

No Brasil, toneladas de resíduos lignocelulósicos são geradas mensalmente, estes quando não são destinados à queima para geração de energia, podem receber uma alocação incorreta, causando problemas ambientais, como por exemplo, a lixiviação de rios pelo depósito do bagaço da cana-de-açúcar, ou o despejo em estradas vicinais e mananci-

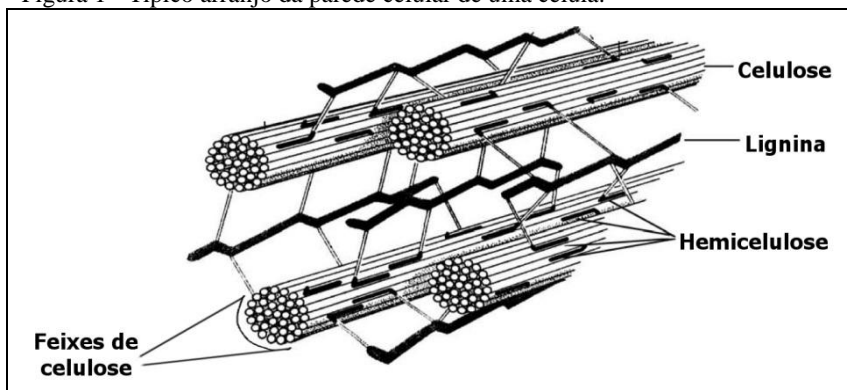
ais de água (LIMA; RODRIGUES, 2007). Portanto, um eficiente processamento nestes resíduos, não somente traria grandes avanços econômicos aumentando a cadeia produtiva, como estariam colaborando para uma destinação correta destes resíduos. Um exemplo de sucesso neste sentido foi a iniciativa dos Estados Unidos, que tornou possível o aproveitamento de resíduos celulósicos para a produção de etanol a partir do método de sacarificação do milho e dos seus subprodutos como a espiga e o sabugo (MCALOON et al., 2000). Sendo assim, o que hoje se considera subprodutos ou substrato para queima, se gerenciados da forma correta, podem apresentar muito mais benefícios devido à celulose presente em sua composição.

Embora existam as grandes vantagens que sustentam o emprego de biomassa lignocelulósica para geração de energia, não existem tecnologias de baixo custo para vencer a recalcitrância desses materiais (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999; LYND et al., 2005).

### 2.1.1 Composição química dos resíduos lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica é composta por celulose, hemicelulose e lignina, além de pequenas quantidades de outros extrativos (HAN et al., 2003). Estes componentes estão dispostos na parede celular de uma forma que as fibras de celulose ficam envolvidas em uma matriz amorfa de hemiceluloses e lignina (Figura 1). Essa matriz amorfa age como uma barreira natural impedindo o ataque de microrganismos e/ou enzimas, além de tornar esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL; WEGENER, 2003).

Figura 1 - Típico arranjo da parede celular de uma célula.



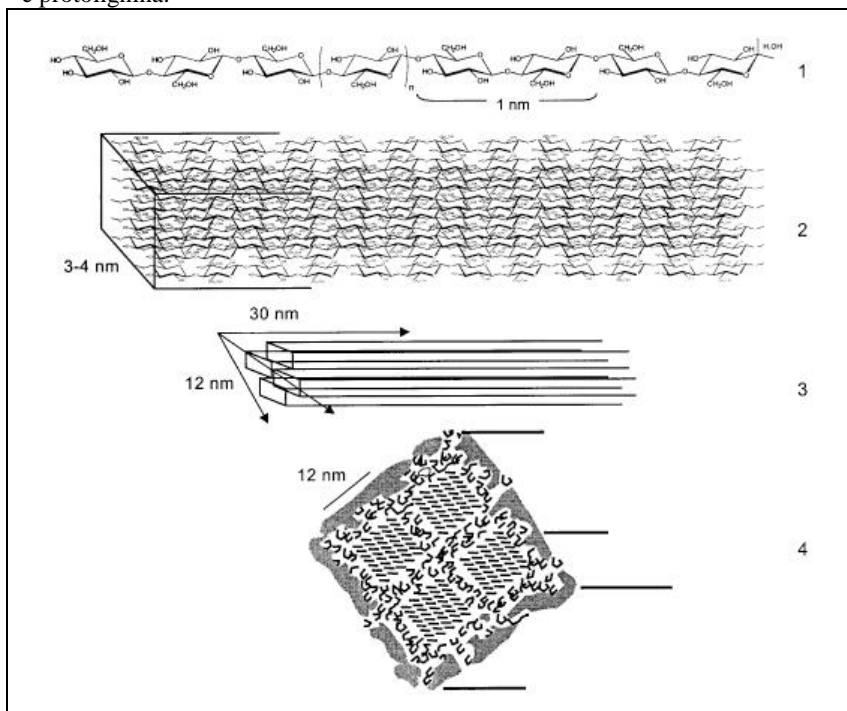
Fonte: Adaptado de Yu, Lou e Wu (2007).

### 2.1.1.1 *Celulose*

A celulose consiste em um polímero linear com aproximadamente 8000-12000 unidades de anidroglicose, ligadas entre si por poliligamções  $\beta$ -(1-4) glucosídicas. O tamanho da molécula de celulose é normalmente dado em termos do seu grau de polimerização, ou seja, o número de unidades de anidroglicose presentes em uma única cadeia (RAMOS, 2003). A ligação de duas moléculas de glicose forma a unidade estrutural básica da celulose, a celobiose (MARTINS, 2005). A ligação de várias celobioses consecutivas forma a cadeia linear da celulose. Estas cadeias lineares se ligam fortemente umas as outras por fortes ligações de hidrogênio formando fibrilas elementares que podem conter tanto regiões cristalinas como regiões amorfas (LYND et al., 2002; RAMOS, 2003). Cada fibrila elementar é formada por 36 cadeias lineares de celulose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008). Diversas fibrilas elementares, com uma espessura média de 3,5 nm, podem se associar formando cristalitos de celulose cujas dimensões dependem da origem e do tratamento da amostra. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos são unidos através de uma monocamada de hemiceluloses, constituindo estruturas de 25 nm que são envolvidas por uma matriz amorfa de hemicelulose e protolignina. Esta associação resulta em um composto natural chamado de microfibrila de celulose (Figura 2) (RAMOS, 2003; MARTINS, 2005).

A celulose apresenta regiões cristalinas e amorfas. A região cristalina é altamente ordenada devido às numerosas ligações de ponte de hidrogênio intra e intermolecular. Já a região amorfa é menos ordenada e, portanto, as cadeias apresentam uma orientação randomizada. A proporção entre as áreas cristalinas e amorfas variam de uma celulose para outra e são expressas em índice de cristalinidade (percentagem da área cristalina) (RAMOS, 2003). Alguns autores determinam que a celulose amorfa é mais susceptível à hidrólise enzimática do que a celulose cristalina, devido a desordem da cadeia que gera uma maior área superficial para o ataque das enzimas (PITARELO, 2007; ZHANG, 2008).

Figura 2 - Associação dos componentes da parede celular. (1) Esqueleto da cadeia de celulose, com a indicação do comprimento da sua unidade estrutural básica, a celobiose; (2) Arranjo das cadeias de celulose na formação da fibrila elementar; (3) Cristalito de celulose; (4) Secção transversal da microfibrila da celulose, mostrando cristalitos de celulose embebidos na matriz de hemicelulose e protolignina.



Fonte: Ramos (2003).

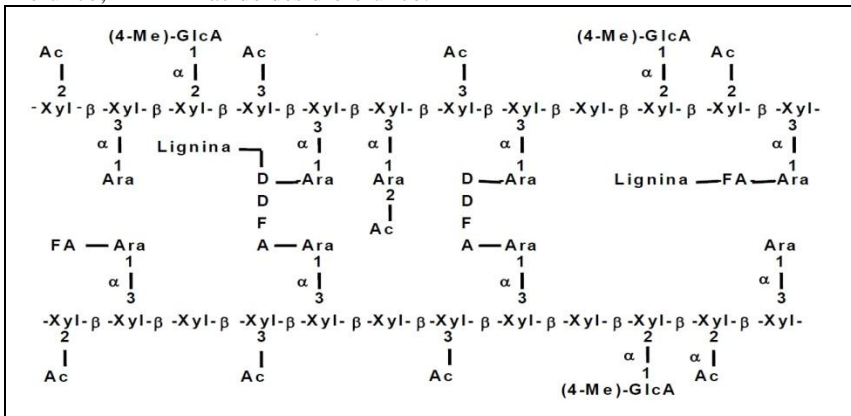
### 2.1.1.2 Hemicelulose

As hemiceluloses, também conhecidas como polioses, são heteropolímeros de plantas cuja natureza química varia de um tecido para outro, assim como de uma espécie para outra (RAMOS, 2003). São formadas por uma variedade de unidades monossacarídicas, como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico) (PITARELO, 2007). Estas unidades de pentoses, hexoses e ácidos urônicos são unidos por ligações  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4) com pontos de ramificações (1  $\rightarrow$  2), (1  $\rightarrow$  3) e/ou (1  $\rightarrow$  6) (ALMEIDA, 2009). O



grau de polimerização das hemiceluloses geralmente é baixo (média de 100-200) e a qualidade e quantidade de açúcares dependem do tipo de parede celular e do organismo analisado (JEFFRIES, 1994). As hemiceluloses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (FENGEL; WEGENER, 2003). Na Figura 3 é apresentada a estrutura química de uma xilana de gramínea.

Figura 3 - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-Dglicopiranoúônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico.



Fonte: McDougall et al. (1993).

As hemiceluloses estão estruturalmente mais relacionadas com a celulose do que a lignina. As quatro fibrilas elementares que formam o cristalito de celulose são agrupadas uma monocamada de hemicelulose, sendo posteriormente circundadas em uma matriz contendo hemicelulose e lignina (associadas entre si por meio de interações físicas e ligações covalentes) (CARVALHO et al., 2009). Embora as hemiceluloses sejam muito complexas, geralmente se apresentam em forma de bastonete, com cadeias laterais dobradas para trás na cadeia principal por meio de ligações de hidrogênio (RAMOS, 2003). Esta estrutura de bastonete facilita sua interação com celulose e lignina, resultando em uma associação forte que dá grande estabilidade ao conjunto (LAUREANO-PEREZ et al., 2005).

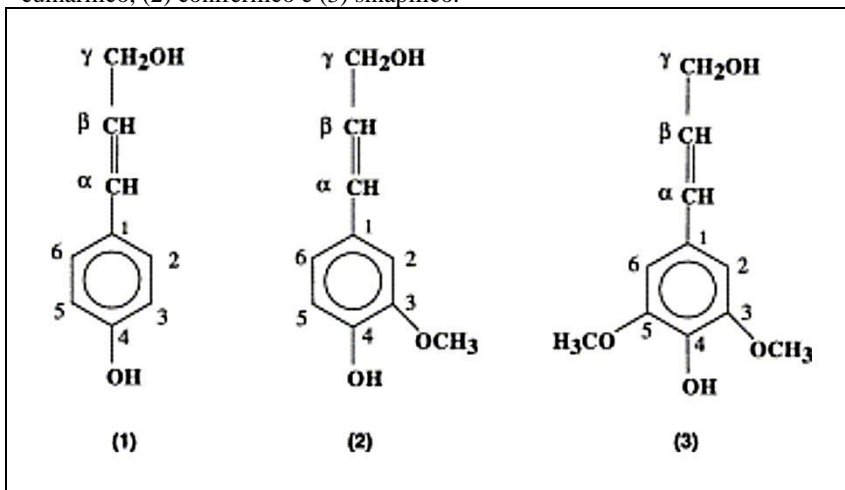
### 2.1.1.3 Lignina

Nos tecidos vegetais a lignina está geralmente combinada com a hemicelulose, e constitui-se como o mais importante componente não-carboidrato da biomassa lignocelulósica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Ela é depositada na rede de carboidratos da parede celular secundária das plantas, durante o seu crescimento (RAMOS, 2003). Trata-se de um heteropolímero amorfo que é principalmente formado pela polimerização dos álcoois hidroxicinâmílicos: p-cumarílico (unidade p-hidroxifenila), coniferílico (unidade guaiacila) e sinapílico (unidade siringila) (Figura 4), que são unidos por diferentes tipos de ligações (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A propriedade física mais importante desta macromolécula biológica é a sua rigidez, o que não só dá força ao tecido da planta, mas também impede o colapso dos elementos de água-condutores, o que por sua vez confere a planta o apoio estrutural, impermeabilização, e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (RAMOS, 2003). Este heteropolímero amorfo é também não-solúvel em água e opticamente inativo (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Todas estas características conferem à lignina uma resistência muito grande à degradação, sendo portanto, a substância protagonista em conferir recalcitrância aos resíduos lignocelulósicos.

As madeiras moles, também chamadas de coníferas, possuem ligninas que são quase exclusivamente compostas por resíduos derivados de álcool coniferil (lignina-G), enquanto que as ligninas de madeira dura, também conhecidas como folhosas, são derivadas de resíduos dos álcoois coniferil e sinapil (ligninas-GS) (FENGEL; WEGENER, 2003; MARABEZI, 2009). Em contraste, as ligninas derivadas de gramíneas (como no caso a cana-de-açúcar) e plantas herbáceas contêm os três precursores básicos: coniferil, sinapil e cumaril (ligninas-GSH) (RAMOS, 2003; MARABEZI, 2009).

Devido ao grande interesse na obtenção de plantas que forneçam maior facilidade nos processos de deslignificação, alguns estudos têm sido focados para manipular as vias de biossíntese da lignina destas plantas (CARVALHO et al., 2009). O processo de remoção da lignina é uma etapa fundamental na indústria de celulose e papel, bem como na nascente indústria de conversão da biomassa lignocelulósica.

Figura 4 - Estrutura dos fenilpropanóides que compõem a lignina: (1) p-cumarílico, (2) coniferílico e (3) sinapílico.



Fonte: Amen-Chen, Pakdel e Roy (2001).

#### 2.1.1.4 Outros Extrativos

Além da celulose, hemicelulose e lignina os materiais lignocelulósicos possuem em sua composição vários extrativos orgânicos e uma pequena quantidade de inorgânicos, tais como, potássio, sódio, cálcio e outros que foram adquiridos como nutrientes durante o seu crescimento (YU; LOU; WU, 2007).

Os extrativos orgânicos são compostos intermediários do metabolismo vegetal, desempenhando papel de reserva energética e de proteção ao vegetal contra ataque de insetos e microrganismos, muitas vezes agindo como agente inibidor nos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 2003). São exemplos de extrativos: ácidos graxos, ceras, alcalóides, proteínas, fenólicos, açúcares simples, pectinas, mucilagens, gomas, resinas, terpenos, amido, glicosídeos, saponinas e óleos essenciais (YU; LOU; WU, 2007; SILVA, 2009).

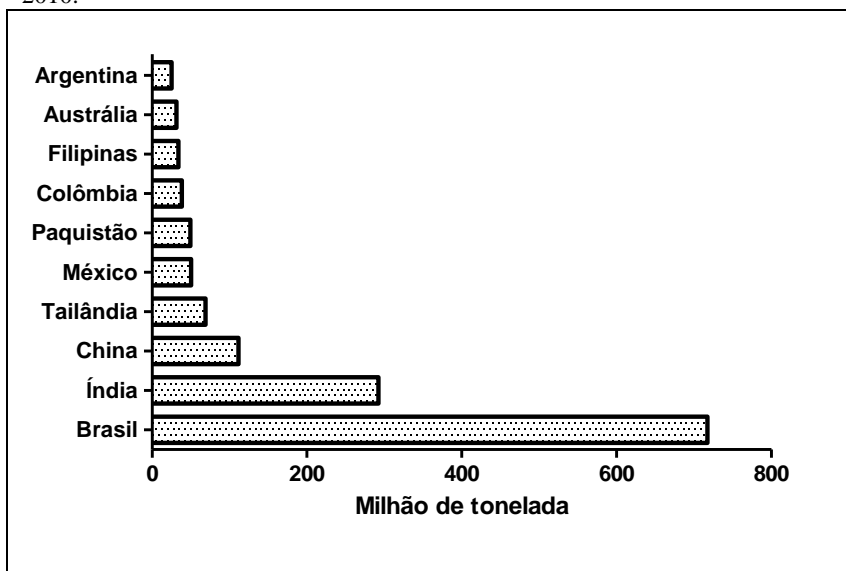
#### 2.1.2 Bagaço da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originária da Ásia e foi introduzida no Brasil no início do regime colonial para exploração da atividade açucareira (BRANDÃO, 1985). Desde o início do plantio de cana-de-açúcar, os cultivares passaram por diversas modificações que resultou

em várias espécies que se diferenciam em conteúdo de fibras e açúcar. Segundo Daniels e Roach (1987) a cana-de-açúcar é uma espécie alógama (fecundação cruzada), da família Gramíneae (Poaceae) tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum*, onde se destacam as espécies *S. officinarum* Linneus, *S. robustum* Brandes e Jeswiet ex Grassl, *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb., *S.spontaneum* Linneus e *S. edule* Hassk.

Como matéria-prima fundamental em diversas aplicações, a cana-de-açúcar se apresenta como uma forte cultura de peso econômico, sendo que a partir dela é possível produzir álcool combustível e industrial, aguardente, cera e ainda, pode ser consumida *in natura* e em pequenos comércios de caldo de cana (PINTO, 2002). Vale ressaltar ainda que o Brasil se apresenta como o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo (Figura 5), o que torna esta cultura uma das mais importantes do país.

Figura 5 – Produção dos principais países produtores de cana-de-açúcar em 2010.



Fonte: Dados obtidos na *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2012).

Em geral, os processos de aplicação da cana-de-açúcar supracitados geram resíduos como o bagaço, a palha, a vinhaça, a torta de filtro e as cinzas das caldeiras (BNDES; CGEE, 2008). No entanto, o bagaço é o resíduo em maior quantidade, no qual chega a ser considerado o prin-

principal resíduo agroindustrial brasileiro. Um simples balanço de massa tomando com base em uma tonelada de caule de cana-de-açúcar, nos mostra que são formados 750 L de suco de cana (utilizado para os processos fermentativos) e 250 Kg de bagaço, que contém cerca de 50% em umidade (ZANIN et al., 2000). A parte úmida deste bagaço além da água é constituída basicamente de sacarose e outros açúcares fermentescíveis. Mas por outro lado, restam 125 Kg de bagaço seco que contém 53,8 kg de celulose (43%), 31,3 Kg de hemicelulose (25%), 28,8 Kg de lignina (23%) e 3% de grupos acetil em heteroxilanas (correspondendo a 4 Kg de ácido acético), 6 Kg de extrativos incluindo sacarose residual (4%) e 3 Kg de cinzas (2%) (ZANIN et al., 2000). Na Figura 6 é ilustrado o contraste dos depósitos de bagaço de cana-de-açúcar frente às usinas de álcool, onde este resíduo comumente é gerado.

Figura 6 - Depósito de bagaço (resíduo) de cana-de-açúcar em usina de produção de álcool.



Fonte: Neto (2009).

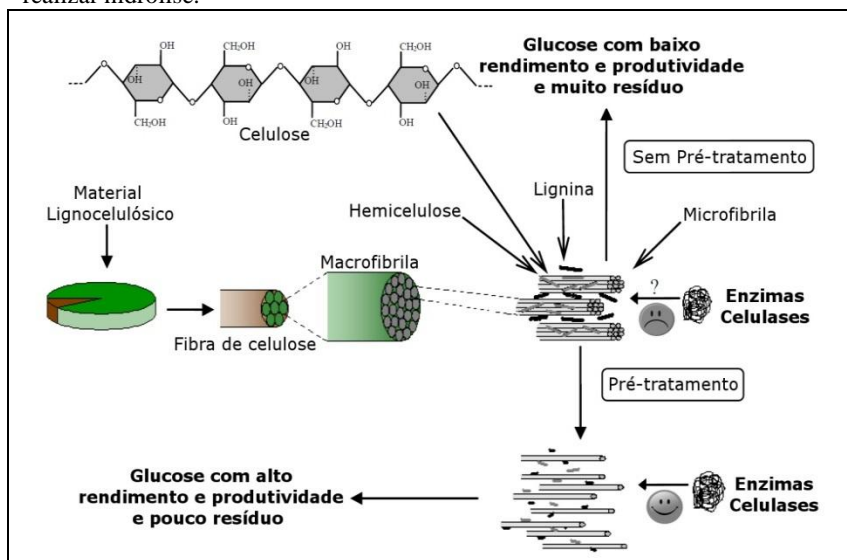
Apesar deste resíduo apresentar um grande potencial para produção de combustíveis e produtos químicos, as suas atuais aplicações se restringem à combustão para geração de energia nas usinas onde são gerados (LIMA; RODRIGUES, 2007). Uma pequena fração é usada

para forragem de gado e outros animais, no entanto ainda há excedente (ZANIN et al., 2000; BETANCUR; PEREIRA JR., 2010). Além disso, com o aumento da produção de cana-de-açúcar, em resposta ao crescimento da demanda global de etanol, mais bagaço estará disponível (BALAT; BALAT, 2009; BETANCUR; PEREIRA JR., 2010).

## 2.2 PRÉ-TRATAMENTO DE RESÍDUOS CELULÓSICOS

O bagaço da cana-de-açúcar assim como os demais resíduos lignocelulósicos, apresenta uma natureza recalcitrante devido ao arranjo estrutural formado pelos seus componentes celulose, hemicelulose e lignina. Como já visto no item 2.1, neste arranjo estrutural a celulose encontra-se protegida pela hemicelulose e lignina. Esta recalcitrância faz com que as enzimas celulases não tenham acesso à celulose para realizar uma degradação eficaz (Figura 7). Uma forma de vencer esta recalcitrância e proporcionar uma boa condição para atuação das celulases é a utilização de métodos de pré-tratamentos nestes resíduos lignocelulósicos.

Figura 7 - Efeito do pré-tratamento na acessibilidade das enzimas celulases para realizar hidrólise.



Fonte: Adaptado de Taherzadeh e Karimi (2008).

Para que o pré-tratamento seja considerado eficiente ele deve reduzir a recalcitrância do material aumentando a acessibilidade das enzimas ao polímero de celulose. No entanto, para ele se tornar viável ele precisa ter propriedades que visam um alto rendimento e baixos custos de operação (YANG; WYMAN, 2008):

- Rendimento elevado para uma diferente gama de materiais lignocelulósicos;
- Alta digestibilidade enzimática sobre os sólidos pré-tratados. O material pré-tratado deve ter rendimento superior a 90% de conversão (celulose para açúcares monoméricos) em menos de cinco dias com uma preparação enzimática inferior a 10 FPU/g celulose;
- Não apresentar uma significativa degradação de açúcares. Evitar que ocorra perda de açúcares provenientes da celulose e hemicelulose;
- Não gerar substâncias tóxicas que venham inibir a etapa de hidrólise enzimática e fermentação;
- Não necessitar de processos de moagens e/ou trituração para redução das partículas da biomassa, já que estes demandam muita energia;
- Operação em reatores de custo e tamanho moderado;
- Mínima demanda de energia.

Os resíduos lignocelulósicos possuem alguns fatores que estão intimamente ligados a sua recalcitrância à hidrólise enzimática. São estes fatores o índice de cristalinidade da celulose, o grau de polimerização da celulose, a área superficial acessível, o tamanho da partícula, a espessura da parede celular, a porosidade e a barreira de lignina juntamente com o conteúdo de hemicelulose formado ao redor das fibrilas de celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ALVIRA et al., 2010). A cristalinidade sozinha não é capaz de impedir a hidrólise quando uma quantidade suficiente de enzimas for utilizada, portanto, a soma de todos os fatores deve ser levada em consideração (RABELO, 2007).

Neste sentido, com a finalidade de atender às propriedades de viabilidade e os fatores relacionados à recalcitrância dos materiais lignocelulósicos, diversos tipos de pré-tratamentos já foram estudados. Eles podem ser classificados em físico, químico, físico-químico e biológico, de acordo com as diferentes forças ou energias consumidas durante o processo de pré-tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos para hidrólise enzimática.

<b>Método</b>	<b>Processo</b>	<b>Tipos de Mudanças</b>
Físico	Moagem e Trituração; Irradiação; Alta temperatura.	Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Aumenta a área superficial e o tamanho dos poros da partícula.
Químico	Bases; Ácidos; Gases; Agentes oxidantes e redutores; Solventes para extração da lignina.	Aumenta a área superficial; Diminui o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose; Parcial ou quase completa degradação da hemicelulose e deslignificação.
Físico-químico	Tratamento alcalino associado à explosão a vapor; Moagem com tratamento alcalino ou ácido.	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula.
Biológico	Fungos e actinomicetos.	Degradação da hemicelulose e deslignificação; Aumenta a área superficial e os poros da partícula; Diminui o grau de polimerização.

Fonte: Rabelo (2007); Taherzadeh e Karimi (2008); Alvira et al. (2010).

Todos os métodos supracitados apresentam vantagens e desvantagens referentes à sua eficiência e custo. Os métodos físicos são relativamente ineficientes no aumento de digestibilidade da biomassa e os biológicos apresentam um rendimento muito inferior aos demais. Os processos físico-químicos apresentam baixa digestibilidade quando comparados aos tratamentos simples (RABELO, 2007), e os métodos químicos muitas vezes acabam formando inibidores para as enzimas na etapa de hidrólise e fermentação (ALVIRA et al., 2010). Sendo assim, foi escolhido como objeto de estudo um método químico de pré-



tratamento, optando por um composto com baixa ou nula geração de resíduos inibidores.

### 2.2.1 Método químico de pré-tratamento

Existe uma grande variedade de métodos químicos de pré-tratamento, compreendendo mecanismos diferentes de ação. Mas, de uma forma geral, os métodos químicos conseguem deslignificar o material sem degradar a cadeia celulósica, ocasionando apenas uma parcial degradação da hemicelulose que está intimamente ligada à lignina, contribuindo para uma diminuição no grau de polimerização e índice de cristalinidade da celulose bem como em um aumento da porosidade do material (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Entre os pré-tratamentos químicos foi escolhido o método de oxidação por peróxido de hidrogênio como alvo de estudo. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é um dos oxidantes mais versáteis que existe, além de possuir um alto poder oxidante na sua forma natural (Tabela 2), ele pode ser convertido em radical hidroxila ( $\bullet OH$ ) através de catálise, obtendo um potencial de oxidação ainda maior. Além disso, o peróxido de hidrogênio não gera resíduos na biomassa, além de praticamente não formar produtos secundários (RABELO; FILHO; COSTA, 2008; RABELO et al., 2011). Com isso não interfere na etapa posterior de hidrólise enzimática e fermentação (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURÁN, 1998).

Tabela 2 - Potencial de oxidação de diferentes oxidantes.

<b>Oxidante</b>	<b>Potencial de oxidação (V)</b>
Flúor	3,0
Radical hidroxila ( $\bullet OH$ )	2,8
Ozônio	2,1
Peróxido de hidrogênio	1,77
Pergamato de potássio	1,7
Dióxido de cloro	1,5
Cloro	1,4

Fonte: Mattos et al. (2003).

#### 2.2.1.1 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio

Na natureza a degradação efetiva da lignina é realizada por microrganismos que utilizam um grupo de enzimas oxidativas que são capazes de oxidar subestruturas da lignina na presença de peróxido de

hidrogênio (ARANTES; MILAGRES, 2009). Além disso, o peróxido de hidrogênio tem sido amplamente empregado como agente de deslignificação nos processos de branqueamento nas indústrias têxtil, de papel e celulose, onde é usado como alvejante (GOULD, 1985; RABELO et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio, além de possuir um alto potencial de oxidação e um bom desempenho nos processos de deslignificação, se apresenta como um composto limpo, sendo que sua decomposição forma apenas água e oxigênio (equação 2.1). Sendo assim pode ser considerado, um agente promissor na utilização para pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.



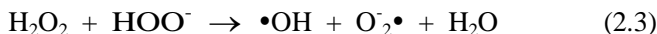
Segundo Gould (1985), a adição de hidróxido de sódio (NaOH) nas soluções com peróxido de hidrogênio faz com que o pH aumente e com isso, uma série de reações são desencadeadas levando à formação de radicais hidroxilas ( $\bullet\text{OH}$ ). Estes radicais atacam os grupos hidrofílicos dos materiais lignocelulósicos quebrando algumas ligações e promovendo a oxidação da estrutura da lignina bem como a dissolução da hemicelulose e lignina (RABELO, 2007).

Para um melhor entendimento das reações que atuam no processo de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (peróxido de hidrogênio adicionado de hidróxido de sódio) é necessário avaliar todas as reações envolvidas na sua decomposição (GOULD, 1985).

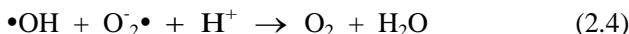
Em pH alcalino, o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se dissocia e forma o ânion hidroperóxido ( $\text{HOO}^-$ ):



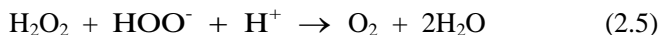
Com o pH a 11,5, o ânion hidroperóxido pode reagir com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  não dissociado para formar um radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) altamente reativo e superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) como mostra a reação abaixo (equação 2.3).



Na ausência de outros reagentes, radicais hidroxílicos e superóxidos reagem entre si formando oxigênio e água:



Então, a equação global das equações 2.3 e 2.4, formam:



Analisando as equações 2.1 e 2.5, fica claro que o máximo de oxigênio que pode ser envolvido na solução alcalina é igual à metade da fração molar de peróxido de hidrogênio. Sendo assim, se outros compostos que reagem com radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) e/ou superóxido ( $\text{O}_2\bullet$ ) estiverem presentes, haverá uma competição na equação 2.4, podendo ser observado uma redução do oxigênio na equação 2.5. Desta forma, Gould (1985) descreve que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino atua como agente oxidante da lignina.

O pH da solução de peróxido de hidrogênio influencia na reação de deslignificação de materiais lignocelulósicos. O estudo de Gould (1984) avaliou o pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino em resíduos agrícolas como palha de trigo e resíduos da colheita de milho, e constatou que a deslignificação destes materiais ocorreu apenas nos tratamentos com pH acima de 10,5 com a máxima deslignificação ocorrendo a pH 11,5 ou maior. Em pH 6,8 apenas 10-15% da lignina foi solubilizada, com isso a digestibilidade da biomassa também foi baixa.

Segundo Rabelo et al. (2011), o peróxido de hidrogênio é um método de pré-tratamento muito promissor para o bagaço da cana-de-açúcar. Em estudo comparativo com o hidróxido de cálcio, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi mais veloz (exigiu uma hora a menos) e ocorreu em temperatura ambiente, além de ser capaz de conduzir uma alta produção de glucose no processo final, mesmo quando o bagaço não foi previamente moído e/ou peneirado. Isto se explica pelo seu grande potencial oxidativo e o fato de não deixar resíduos que venha a inibir a atividade das celulasas na etapa de sacarificação. Em seu estudo, a condição ótima de pré-tratamento foi de 7,35% de peróxido de hidrogênio, incubados a 25°C durante 1 hora.

Monte, Briezo e Milagres (2011) realizaram um pré-tratamento no bagaço da cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino seguido de uma hidrólise enzimática adicionada de suco de abacaxi. A melhor condição de pré-tratamento foi de com 60°C de temperatura, 2% de peróxido de hidrogênio e a 0,5% de sulfato de magnésio por um período de 4 horas. Nestas condições, a remoção da lignina atingiu cerca de 70% e a de hemicelulose 36%. A remoção de lignina e hemicelulose do bagaço pelo pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino claramente produziu um substrato com características melhoradas para a

hidrólise enzimática por celulases, uma vez que foi atingida uma alta conversão enzimática (63%) em um curto tempo de reação (24 h). No entanto, a degradação do polímero hemicelulose não é vantajosa, sendo que este carboidrato poderia ser reduzido a unidades monoméricas de hexoses e pentoses.

Karagöz et al. (2012) utilizaram o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino na palha de colza para produção de etanol. A condição ótima de pré-tratamento foi de 5% de peróxido de hidrogênio a 50°C durante 1 hora de incubação. Com esta condição, 5,73 g de etanol foi obtida na fração líquida e 14,07 g de etanol foi produzido por co-fermentação a partir da fração sólida do pré-tratamento. Com a adição de 0,5 M de sulfato de magnésio durante o pré-tratamento melhorou o processo de deslignificação, aumentando em 0,92% a produção de etanol.

Outras tecnologias envolvendo o uso do peróxido de hidrogênio para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos já foram desenvolvidas. Takagi (1987) descreve um método de pré-tratamento para substâncias lignocelulósicas utilizando uma solução aquosa de peróxido de hidrogênio na presença do íon metálico  $Mn^{+2}$ . Segundo este autor, o íon metálico ajuda no processo de oxidação liberando radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ). Martínez-Huitle e Brillas (2009) descrevem que o peróxido de hidrogênio é comumente ativado em efluentes ácidos com íons de  $Fe^{2+}$  agindo como catalisador (reagente de Fenton), e a partir deste processo são liberados radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ), como forte oxidante de materiais orgânicos. Lucas et al. (2012) utilizaram acetato de manganês para catalisar a oxidação do peróxido de hidrogênio e promover a deslignificação de madeira. Esta madeira pré-tratada apresentou uma hidrólise enzimática 20-40% superior a não tratada. Estas tecnologias possuem em comum a utilização de metais para catalisar a liberação dos radicais hidroxilas ( $\bullet OH$ ).

Referente à utilização do peróxido de hidrogênio em conjunto com cinzas para promover o tratamento de materiais lignocelulósicos, não existem trabalhos publicados. Sendo que este trabalho está em processo de depósito do pedido de patente (Anexo 1), intitulada “Método de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares monoméricos” (QUADRI; ODISI; LIMA, 2012).

## 2.3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo de hidrólise da celulose à glucose envolve no mínimo três grupos de celulasas, que atuam de forma sinérgica e diferentemente conforme o organismo e o substrato, podendo ser genericamente caracterizadas como: endoglucanases, exoglucanases ou celobiohidrolases e  $\beta$ -glucosidases (LYND et al., 2002; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; CASTRO; PEREIRA JR, 2010; OGEDA; PETRI, 2010; ODISI et al., 2012).

As endoglucanases (EC 3.2.1.4) iniciam a hidrólise da celulose clivando de forma randômica as ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Estas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses modificadas quimicamente (solúveis), como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (MARTINS, 2005).

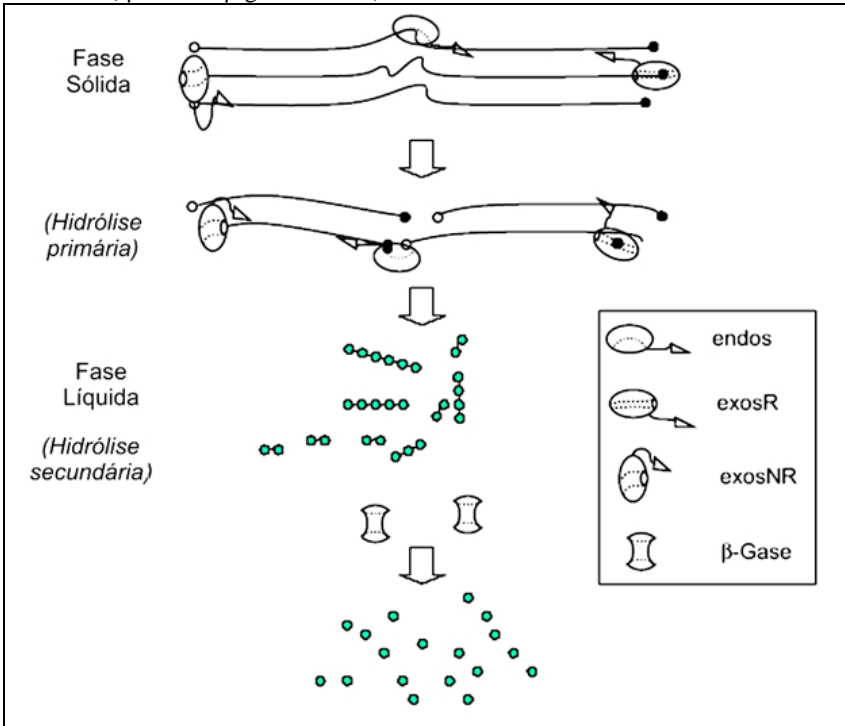
O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase (3.2.1.91) e glucano hidrolase (3.2.1.74). As glucano hidrolases são capazes de liberar glucose diretamente da fibra celulósica (CASTRO; PEREIRA JR, 2010). Já as celobiohidrolases agem de maneira progressiva em extremidades redutoras e não-redutoras da celulose, e possuem maior afinidade por celulose insolúvel ou microcristalina, liberando majoritariamente a celobiose, além de glucose e celotriose como produtos (MARTINS, 2005; FERREIRA, 2010) Estas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu próprio produto de hidrólise, a celobiose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

As  $\beta$ -glucosidases (3.2.1.21) atuam nos resíduos de celodextrina e celobiose hidrolisando-os a glucose (LYND et al., 2002; OGEDA; PETRI, 2010). Assim como as celobiohidrolases, também é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise.

O mecanismo sinérgico (Figura 8) das celulasas faz com que a velocidade de formação de produtos solúveis aumente significativamente quando comparado à velocidade de ação isolada das enzimas (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005). No mecanismo sinérgico exo-endo, as endoglucanases clivam randomicamente cadeias na superfície da celulose, fornecendo numerosos sítios adicionais para que as celobiohidrolases possam clivar (OGEDA; PETRI, 2010). Segundo Bhat e Bhat (1997), o grau de sinergismo varia conforme o tipo de celulose que é utilizada na hidrólise. Na presença de uma celulose

cristalina o sinergismo entre as endoglucanases e exoglucanases é alto, no entanto, à medida que o índice de cristalinidade diminui o sinergismo também diminui. Em derivados solúveis da celulose, como o CMC, o sinergismo é muito baixo ou ausente.

Figura 8 - Mecanismo de hidrólise da celulose pelo complexo de celulases do gênero *Trichoderma*. (Endos - endoglucanases; exosR - exoglucanases atuando nos terminais redutores; exosNR - exoglucanases atuando nos terminais não redutores;  $\beta$ -Gase -  $\beta$ -glucosidases).



Fonte: Adaptado de Zhang, Himmel e Mielenz (2006).

## CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

---

Este capítulo apresenta, de forma detalhada, as metodologias propostas para os pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar, bem como a caracterização dos materiais envolvidos nestes processos.

### 3.1 SUBSTRATO

#### 3.1.1 Preparo do bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi obtido em comércio de caldo de cana na cidade de Florianópolis, SC. O bagaço foi seco sob a luz solar durante um período de 3-4 dias até que perdesse substancialmente sua umidade. Após a pré-secagem, o bagaço foi moído em moinho analítico (Quimis - Q298A), sendo posteriormente lavado com água destilada até ficar livre de açúcares proveniente do caldo. Durante a lavagem foram realizadas diversas medidas de sólidos solúveis em refratômetro (Biobrix - 2 WAJ) até obter o valor de 0° Brix. O bagaço foi seco em estufa a 50°C por 72 horas, e em seguida, foi mantido a temperatura ambiente por 24 horas e embalado em sacos plásticos até o momento do uso.

Figura 9 - Bagaço utilizado para os ensaios de pré-tratamento.



### 3.1.2 Preparo das cinzas do bagaço da cana-de-açúcar

O bagaço foi seco sob a luz solar durante um período de 3-4 dias até que perdesse substancialmente sua umidade. Após a pré-secagem, o bagaço foi incinerado em um grande recipiente até ficar carbonizado. O bagaço carbonizado foi levado para a mufla (600°C por 8 horas) e transformado em cinzas. As cinzas foram armazenadas em tubos cônicos até o momento do uso.

Figura 10 - Bagaço carbonizado (à esquerda) e cinzas (à direita).



### 3.1.3 Caracterização química

#### 3.1.3.1 Determinação do teor de extrativos totais

Os extrativos totais foram determinados conforme a norma TAPPI T 264 cm-97 (TAPPI, 1997). Esta metodologia foi empregada também para eliminar os extrativos das amostras para análises posteriores. Os procedimentos práticos foram conduzidos em duas fases. Na primeira foi realizada a extração em solvente orgânico e na segunda extração em água.

A extração em solvente orgânico foi realizada em extrator Soxhlet. Para tanto, foram utilizados 5 g de amostra seca e 200 mL de etanol-tolueno (1:2 (v/v)). As amostras foram acondicionadas em um cartucho confeccionado com papel de filtro e colocadas dentro da coluna do Soxhlet. O solvente foi colocado em um balão de 500 mL, de massa seca conhecida, sendo que o material foi extraído por 7 horas. O balão contendo os extrativos e solventes foi levado a um evaporador sob vácuo e,



após a recuperação dos solventes, o balão com extrativos foi levado à estufa ( $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até peso constante. O teor de extrativos foi calculado com base na diferença de massas.

Para a extração com água, o material foi extraído em balão sob refluxo por 7 horas, sendo utilizadas 5 g de amostra seca em 200 mL de água. Após a extração, o material foi filtrado a vácuo em cadinho de vidro sinterizado e separado para posterior análise. Após a extração, foi separada uma alíquota de 25 mL para a determinação da massa de extrativos totais. Esta alíquota foi colocada em uma placa de petri previamente tarada e levada a estufa ( $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até peso constante. A partir da diferença de massas foi calculada a quantidade de extrativos em gramas contidos em 25 ml de solução.

Considerando a quantidade de extrativos encontrados nas duas fases, e a quantidade de amostras empregadas na extração, calculou-se o teor de extrativos em percentagem (%).

### 3.1.3.2 *Determinação do teor de celulose*

O teor de celulose foi determinado segundo a metodologia de Kuschner-Hoffner (BROWNING, 1967). Para tanto, foram empregadas 5 g de amostra livre de extrativos (item 3.1.3.1) com 125 mL de soluções alcoólicas de ácido nítrico sob refluxo, durante quatro ciclos de 1 h. Após cada ciclo, a solução de ácido nítrico alcoólica é removida e um novo volume da solução é adicionado. A solução de ácido nítrico alcoólico consistiu em misturar um volume de solução de ácido nítrico 65% (m/m) com quatro volumes de etanol com 96% de pureza. No final dos quatro ciclos, a celulose foi lavada, seca em estufa ( $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até peso constante. O teor de celulose foi calculado pela diferença de massas.

### 3.1.3.3 *Determinação do teor de holocelulose*

A holocelulose (hemicelulose + celulose) foi determinada utilizando o método de clorito de sódio (BROWNING, 1967; MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010). Uma quantidade de 1 g de fibras foi diluída em 60 mL de água destilada sob agitação magnética sob  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Depois do equilíbrio térmico, 1,5 g de clorito de sódio e 2 mL de ácido acético foram adicionados. Este procedimento foi repetido depois de 1 e 2 horas, resultando em 3 horas de reação. Por fim, a massa resultante foi filtrada e seca em estufa ( $105 \pm 2^\circ\text{C}$ ) até atingir massa constante. O teor de holocelulose foi calculado pela diferença

de massas. O teor de hemicelulose foi determinado pela diferença da holocelulose e celulose.

#### *3.1.3.4 Determinação do teor de lignina de Klason*

A quantificação do teor de lignina insolúvel de Klason foi determinada de acordo com o método de Gomide e Demuner (1986). Para tanto, 3 g de amostra livre de extrativos (item 3.1.3.1), foi tratada com ácido sulfúrico 72% a 20°C por um período de 1 h sob agitação constante. Após este período, a mistura foi diluída até uma concentração de 3% em ácido sulfúrico e incubada em autoclave (118°C) por 1 h para promover a hidrólise total dos poli e oligossacarídeos. Posteriormente, a mistura foi filtrada em cadinho de Gooch previamente tarado. O material retido foi lavado com água quente e seco em estufa (105 ± 2°C) até peso constante. O teor de lignina foi calculado pela diferença de massas.

#### *3.1.3.5 Determinação do teor de cinzas*

O teor de cinzas da amostra foi determinado de acordo com a norma Tappi 211 om-12 (TAPPI, 2012). Os cadinhos utilizados foram previamente incubados em mufla a 575°C por 1 hora. Após este período, foram adicionados 0,5 g de amostra e os cadinhos retornaram à mufla (575 °C ) por 5 horas. A amostra calcinada foi transferida para um desidsecador para resfriar até atingir a temperatura ambiente e massa constante. O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massas.

#### *3.1.3.6 Quantificação de metais*

A quantificação de metais foi realizada pelo Laboratório de Espectrometria de Massa e Atômica do Departamento de Química da UFSC. As amostras foram pesadas, aproximadamente 130 mg, em frascos de teflon, aos quais foram adicionados 5 mL de ácido nítrico bi-distilado e 1 mL de peróxido de hidrogênio supra-puro. Os mesmos foram fechados e levados ao micro-ondas (Milestone – MLS 1200) para a digestão utilizando um programa de temperatura com quatro etapas - 250 Watts, 400 Watts, 650 Watts e resfriamento - de 5 minutos cada. Em seguida, os vasos foram resfriados e adicionado 1 mL de ácido fluorídrico bi-distilado, sendo os vasos fechados e submetidos novamente ao mesmo programa do micro-ondas. Por fim, as amostras foram lidas em Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS (Perkin Elmer - NexION 300 D).

### 3.1.3.7 Identificação espectrométrica de compostos orgânicos

Para observar a ocorrência de modificações químicas na estrutura das amostras de bagaço antes e após os pré-tratamentos e a hidrólise enzimática foram realizadas análises de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos em espectrômetro Shimadzu (IRPrestige-21), usando uma resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 120 varreduras. Foram pesadas aproximadamente 3 mg de amostra e preparadas em 300 mg de pastilhas de KBr (Sigma-Aldrich - 221864). As amostras de bagaço, com e sem tratamento, utilizadas para a análise foram secas por liofilização. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química da UFSC.

### 3.1.3.8 Caracterização morfológica

Microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi utilizado para observar as características morfológicas das estruturas lignocelulósicas do bagaço. As amostras a serem observadas foram montadas sobre uma fita adesiva condutora, em seguida foram recobertas com ouro utilizando o aparelho SCD 500 da marca LEICA. Após este tratamento o material foi observado no MEV (JEOL - JSM-6390LV) utilizando uma voltagem de 15 kV. Estes procedimentos foram conduzidos no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

## 3.2 ENZIMAS

Para os ensaios de hidrólise enzimática foram utilizadas as enzimas comerciais de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich - 22178). As informações contidas na especificação do produto indicam a presença de enzimas endoglucanase e exoglucanase, excluindo a presença da enzima  $\beta$ -glucosidase. No entanto, ensaios prévios identificaram a presença das três enzimas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase), e portanto, esta formulação comercial foi utilizada como única fonte de enzimas.

### 3.2.1 Ensaios de atividade enzimática

#### 3.2.1.1 $\beta$ -glucosidase

A  $\beta$ -glucosidase foi avaliada pelo substrato cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (PNP-G, Sigma-Aldrich - N7006) se-

gundo a metodologia de Lima et al. (2009). A reação foi composta por 50  $\mu\text{L}$  do substrato PNP-G (2 mM) e 50  $\mu\text{L}$  da enzima comercial (2 mg/mL), ambos diluídos em tampão para manter o pH desejado. A reação foi incubada por 15 minutos na temperatura requerida. Posteriormente, a reação foi interrompida com 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1 M) e resfriada em temperatura ambiente. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram avaliadas em espectrofotômetro (Tecan –  $\lambda$  405 nm). A leitura foi comparada a uma curva padrão de  $p$ -nitrofenil (PNP), nas concentrações de 0,125; 0,250; 0,375; 0,5; 0,75 e 1 mM. Todos os ensaios foram realizados em quatro réplicas. Uma unidade de enzima (U) para o substrato PNP-G foi definida como a atividade da enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de PNP em um minuto.

### 3.2.1.2 *Exoglucanase*

A exoglucanase foi avaliada pelo substrato cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-celobiosídeo (PNP-C, Sigma-Aldrich - N5759), segundo Lima et al. (2009). Este substrato pode igualmente ser degradado pela  $\beta$ -glucosidase, portanto, foi realizado um ensaio prévio adicionando diferentes concentrações do açúcar Glucono Delta Lactona (Sigma-Aldrich - G4750), para inibir a atividade da  $\beta$ -glucosidase sem inibir a exoglucanase. Foram realizados paralelamente ensaios com 50  $\mu\text{L}$  do substrato PNP-G (2 mM) e PNP-C (2 mM), contendo 50  $\mu\text{L}$  da enzima comercial (2 mg/mL) e diferentes concentrações de glucono-delta-lactona (10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, e 250 mM). As reações foram incubadas, interrompidas e avaliadas em espectrofotômetro conforme item 3.2.1.1. Foi escolhida a concentração que inibia quase que totalmente a atividade da  $\beta$ -glucosidase sem afetar a atividade da exoglucanase.

Após estabelecida a forma de inibir a  $\beta$ -glucosidase, a reação foi composta por 50  $\mu\text{L}$  do substrato PNP-C (2 mM) adicionados de glucono-delta-lactona na concentração ideal e 50  $\mu\text{L}$  da enzima comercial (2 mg/mL), ambos diluídos em tampão para manter o pH desejado. As reações foram incubadas, interrompidas e avaliadas em espectrofotômetro conforme item 3.2.1.1. Todos os ensaios foram realizados em quatro réplicas. Uma unidade de enzima (U) para o substrato PNP-C foi definida como a atividade da enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu\text{mol}$  de PNP em um minuto.

### 3.2.1.3 *Endoglucanase*

A enzima endoglucanase foi avaliada com substrato Azo-CM-Cellulose (AZO-CMC, Sigma-Aldrich - 18693), segundo Lima et al. (2005). Este substrato consiste em uma molécula de azul brilhante do remazol (ABR) ligado à moléculas de CMC. A reação foi constituída de 100  $\mu$ L de AZO-CMC (4 mg/mL) e 100  $\mu$ L da enzima comercial (2 mg/mL), ambos diluídos em tampão para manter o pH desejado. A reação foi incubada por 30 minutos na temperatura requerida. Posteriormente, foram adicionados 50  $\mu$ L de HCl (1M), procedendo-se a resfriamento em banho de gelo (10 min) para estagnar a reação. Posteriormente, a reação foi centrifugada para precipitar o substrato não degradado (3500 G, por 5 min). Aliquotas de 100  $\mu$ L do sobrenadante obtido após a centrifugação foram avaliadas em espectrofotômetro (Tecan –  $\lambda$  595 nm). A leitura foi comparada a uma curva padrão de ABR, nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/mL. Todos os ensaios foram realizados em quatro réplicas. Uma unidade de enzima (U) para o substrato AZO-CMC foi definida como a atividade da enzima que catalisa a conversão de 1  $\mu$ mol de ABR em um minuto.

### 3.2.2 Condições ótimas de atividade da enzima

As enzimas comerciais foram submetidas a ensaios para determinar as condições ótimas de temperatura e pH. Para ambos, foram utilizados os procedimentos já descritos para as enzimas  $\beta$ -glucosidase (item 3.2.1.1), exoglucanase (item 3.2.1.2) e endoglucanase (item 3.2.1.3).

#### 3.2.2.1 *Determinação da temperatura ótima*

Para determinação da temperatura ótima das enzimas comerciais os ensaios com PNP-G, PNP-C e AZO-CMC foram diluídos em tampão acetato (50 mM, pH 4,8). O tampão e as enzimas foram incubados separadamente por 10 minutos nas temperaturas avaliadas (10, 20, 30, 40, 45, 50 e 60 °C), e em seguida foram misturados iniciando a reação na temperatura desejada por um tempo determinado para cada enzima.

#### 3.2.2.2 *Determinação do pH ótimo*

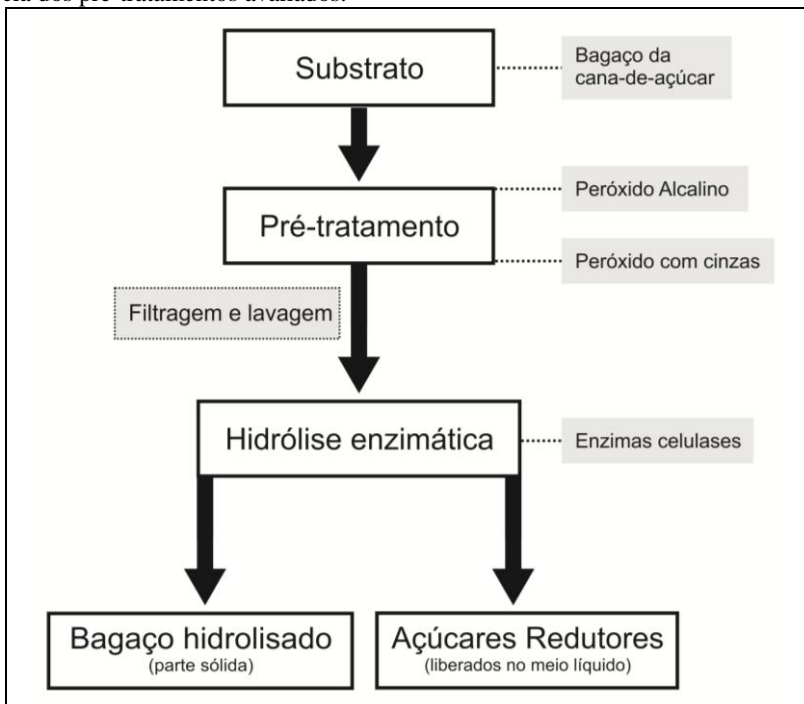
O pH ótimo das enzimas comerciais foram conduzidos com os substratos PNP-G, PNP-C e AZO-CMC diluídos em tampões acetato

(50 mM) com diferentes pHs (3,6; 4,0; 4,4; 4,8; 5,3 e 5,65). Todas as reações foram incubadas na temperatura ótima determinada na etapa anterior (item 3.2.2.1).

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTO

Foram avaliadas as condições ótimas e a eficiência de dois métodos de pré-tratamento de material lignocelulósico utilizando o peróxido de hidrogênio. O primeiro método consiste em um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (item 3.3.1), e o segundo um pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas (item 3.3.2). Os pré-tratamentos foram avaliados de acordo com a concentração de açúcares redutores totais (ART) liberados durante a hidrólise enzimática (Figura 11). Após o estabelecimento das condições ótimas de cada processo, estes foram avaliados quanto às modificações físico-químicas realizadas no bagaço.

Figura 11 – Fluxograma da metodologia aplicada para determinação da eficiência dos pré-tratamentos avaliados.



### 3.3.1 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi realizado em erlenmeyer (frasco de 125 mL), contendo 2% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar e solução final no volume de 20 mL. A concentração do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a temperatura e a frequência de agitação foram estabelecidas de acordo com o planejamento experimental. A solução foi alcalinizada com hidróxido de sódio (NaOH) até atingir pH de 11,5. As reações foram incubadas por um período de 3 horas em uma mesa agitadora orbital (Tecnal - TE421). Ao término da reação, o líquido reacional foi descartado e o material sólido foi lavado com água destilada até atingir pH neutro (7,0). Posteriormente, as amostras foram levadas para a estufa e secas em uma temperatura de 60°C até atingirem peso constante. Por fim, as amostras foram pesadas em balança analítica e armazenadas em tubos cônicos e temperatura ambiente até o seu posterior uso na etapa da hidrólise enzimática (item 3.4).

### 3.3.2 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas foi realizado em erlenmeyer (frasco de 125 mL), contendo 2% (p/v) de bagaço de cana-de-açúcar e solução final no volume de 20 mL. A concentração do peróxido de hidrogênio, a concentração de cinzas (proveniente da queima do bagaço – item 3.1.2) e a temperatura foram determinadas de acordo com o planejamento experimental. As reações foram incubadas por um período de 3 horas em agitação constante de 1,67 Hz em uma mesa agitadora orbital. Ao término da reação, o líquido reacional foi descartado e o material sólido foi lavado com água destilada até atingir pH neutro (7,0). Posteriormente, as amostras foram levadas para a estufa e secas em uma temperatura de 60°C até atingirem peso constante. Por fim, as amostras foram pesadas em balança analítica e armazenadas em tubos cônicos e temperatura ambiente até o seu posterior uso na etapa da hidrólise enzimática (item 3.4).

### 3.3.3 Planejamento experimental e análise estatística dos dados

Para a determinação das condições ótimas de pré-tratamento do bagaço foram realizados planejamentos experimentais fatoriais  $2^3$  completos para ambos os pré-tratamentos. Para o pré-tratamento com peró-

xido de hidrogênio alcalino foram analisadas três variáveis: concentração do peróxido de hidrogênio (% (v/v)), a temperatura (°C) e a frequência de agitação (Hz). Para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas foram analisadas as variáveis: concentração do peróxido de hidrogênio (% (v/v)), concentração de cinzas (% (p/v)) e a temperatura (°C). A resposta analisada foi o rendimento da reação, medido em teor de açúcares redutores totais (ART). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por uma Análise de Variância (ANOVA) utilizando um coeficiente de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

As amostras de bagaço resultante das etapas de pré-tratamento (itens 3.3.1 e 3.3.2) foram colocadas em erlenmeyer (frasco de 125 mL), juntamente com 20 mL de tampão (Acetato de sódio, 50 mM, pH ótimo da enzima - item 3.2.1.2), e em seguida foram adicionadas as enzimas na concentração final de 2 mg/mL (Equivalente à 2 U/mL, sendo 1 U corresponde à quantidade de enzimas que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucose a partir de carboximetilcelulose por minuto, a pH 5,0 e 37°C). Os erlenmeyers foram vedados com parafilme para que não houvesse uma alteração considerável do volume reacional e em seguida, foram incubados em uma mesa agitadora orbital com rotação mantida a 2,5 Hz e temperatura ótima das enzimas previamente determinadas (item 3.2.1.1).

Foram coletadas alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  durante a hidrólise enzimática em períodos de tempo pré-determinados (0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 horas). As alíquotas foram fervidas a 100°C por 10 minutos, em termobloco (Marconi – MA4004) para inativação das enzimas. Por fim, as alíquotas coletadas foram aferidas quanto à quantidade de ART (item 3.4.1).

Ao final do tempo de hidrólise, o material hidrolisado foi lavado com água destilada para remoção dos açúcares e enzimas aderidas e, em seguida, foram secos a uma temperatura de 60°C e armazenados em tubos cônicos e temperatura ambiente para posterior uso em alguma análise, caso necessário.

#### 3.4.1 Açúcares Redutores Totais (ART)

Os ART foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). O reagente de DNS foi preparado de acordo com Miller (1959) e Ghose (1987). O DNS é um reagente não específi-



co, que reage com moléculas de cinco e seis carbonos. Foram pipetados 100  $\mu\text{L}$  da amostra e mais 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS em um microtubo (1,5 mL). As reações de DNS foram conduzidas em um termobloco aquecido a 100°C, durante 15 minutos. Em seguida, os tubos foram estabilizados a 4°C durante 5 minutos. Posteriormente, 1 mL de água destilada foi adicionado e mantido a temperatura ambiente. Por fim, 100  $\mu\text{L}$  da reação foi transferida para uma microplaca (96 poços) e a absorbância avaliada em espectrofotômetro (Tecan –  $\lambda$  540 nm). Os resultados foram comparados com uma curva padrão de glucose em tampão acetato (50 mM, pH 4,0).

### 3.4.2 Quantificação da Glucose

Para a quantificação da glicose foi utilizado um teste comercial (Laborclin – Bioliquid Glicose), segundo Tietz (2006). Os ensaios são baseados na atividade da Glucose Oxidase/Peroxidase que age sobre a glucose e modificam a cor do reagente de trabalho. Os procedimentos práticos foram conduzidos de acordo com o manual do fabricante.



## **CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este capítulo apresenta os resultados obtidos dos processos de pré-tratamento e da caracterização dos materiais envolvidos.

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA**

#### **4.1.1 Bagaço da cana-de-açúcar**

O bagaço da cana-de-açúcar utilizado neste trabalho foi caracterizado quanto à sua composição química (Tabela 3). De acordo com os resultados obtidos, a quantidade de celulose, cinzas e extrativos é similar a outros estudos com bagaço (WYMAN, 1996; RABELO et al., 2011; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). No entanto, o valor de hemicelulose e lignina estão ligeiramente diferentes destes estudos. Rabelo et al. (2011) encontraram  $26,4 \pm 0,2\%$  de lignina e Wyman (1996) apresenta  $25,2\%$  de lignina, estes valores ligeiramente inferiores podem ser consequência do tipo de amostra utilizada. Rabelo (2007) analisou frações de bagaço com diferentes granulometrias, uma fração com o bagaço bruto recolhido da moenda de cana e a outra fração com o bagaço bruto peneirado, restando apenas pequenas partículas. A fração que não foi peneirada mostrou um valor superior de lignina.

Tabela 3 - Composição química (%) do bagaço da cana-de-açúcar.

<b>Componente</b>	<b>Presente trabalho</b>	<b>Wyman (1996)</b>	<b>Rabelo et al. (2011)</b>
Celulose	$41,6 \pm 0,9$	40,2	40,5
Hemicelulose	$20,9 \pm 0,8$	23,8	22,9
Lignina	$28,1 \pm 0,3$	25,2	26,4
Cinzas	$3,7 \pm 0,3$	4,0	0,6
Extrativos	$0,7 \pm 0,2$	4,4	1,6

#### **4.1.2 Cinzas do bagaço da cana-de-açúcar**

Foi realizada a quantificação de quatro metais presentes nas cinzas do bagaço da cana-de-açúcar (Tabela 4). Estes metais foram analisados tendo em vista que no estudo de Lima et al. (2005), estes metais atuaram como cofator enzimático, aumentando a atividade da enzima endoglucanase. De acordo com os resultados obtidos, existe uma quantidade superior dos metais Ca e Mg em comparação com Na e Mn. Esta

diferença é ocasionada pelo fato de que durante o processo de combustão da biomassa alguns elementos das cinzas são facilmente volatilizados, como é o caso do Na e Mn, e outros em menor extensão como o Ca e Mg (PITA, 2009).

Tabela 4 - Quantificação dos principais metais das cinzas.

<b>Metais</b>	<b>Concentração g/Kg de cinzas</b>
Sódio (Na)	1,73 ± 0,01
Magnésio (Mg)	11,04 ± 0,06
Cálcio (Ca)	14,66 ± 0,06
Manganês (Mn)	2,98 ± 0,01

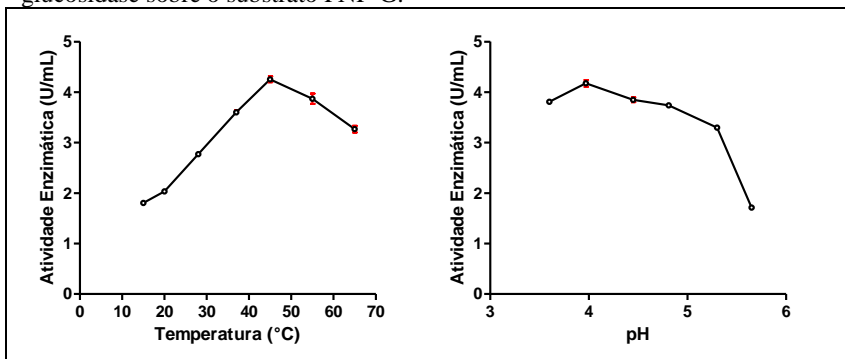
## 4.2 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DAS ENZIMAS

As enzimas celulasas ( $\beta$ -glucosidase, exoglucanase e endoglucanase) contidas na formulação comercial foram caracterizadas quanto às suas condições ótimas de temperatura e pH, para que estas fossem empregadas durante a etapa de hidrólise enzimática.

### 4.2.1 $\beta$ -glucosidase

As condições ótimas de temperatura e pH da  $\beta$ -glucosidase foram avaliadas sobre o substrato PNP-G. Na Figura 12 é possível observar que a atividade máxima foi encontrada na temperatura de 45°C e em pH 4,0. As condições de pH ácido e temperaturas mesofílicas (40-60 °C) são características comuns para enzimas  $\beta$ -glucosidasas do organismo *Aspergillus niger*. Dekker (1986) encontrou a mesma condição de pH ótimo para as  $\beta$ -glucosidasas de outra linhagem de *A. niger*, no entanto a condição de temperatura ótima foi registrada entre 60-70 °C. O mesmo acontece com Abdel-Naby, Osman e Abdel-Fattah (1999) que avaliando três  $\beta$ -glucosidasas de *A. niger*, encontraram o pH ótimo em 4,5 e as temperaturas ótimas em 55 e 60 °C. O contraste das condições ótimas de temperatura e pH das  $\beta$ -glucosidasas de uma mesma espécie revelam a importância desta etapa de caracterização.

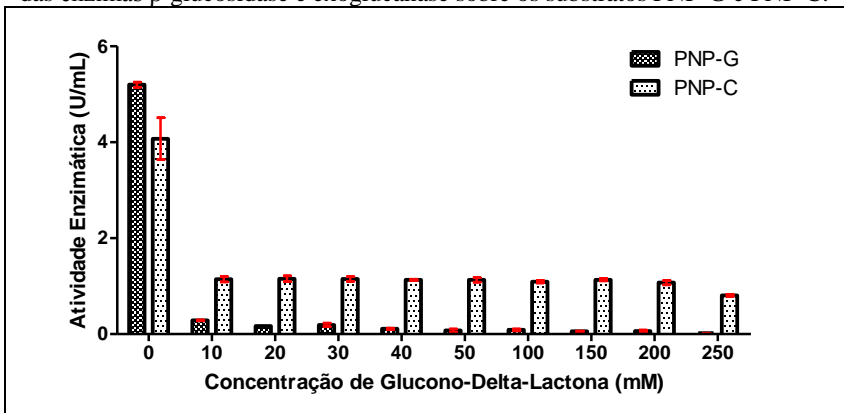
Figura 12 – Influência da temperatura e do pH na atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase sobre o substrato PNP-G.



#### 4.2.2 Exoglucanase

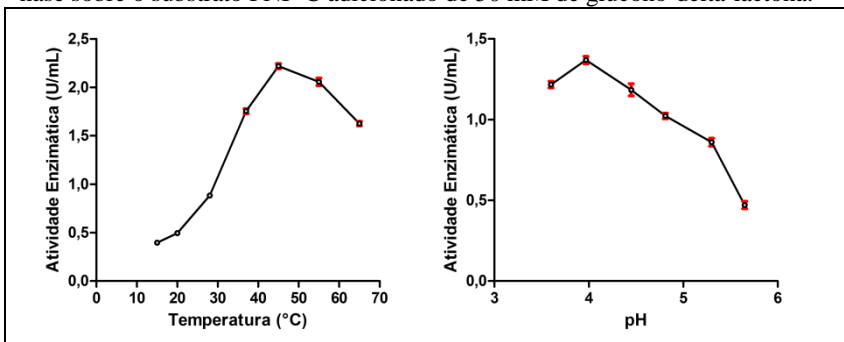
A enzima exoglucanase foi avaliada a partir do substrato cromogênico PNP-C. Para que o ensaio não fosse afetado pela atividade da  $\beta$ -glucosidase que pode igualmente degradar este substrato (PARRY et al., 2001), foi realizado um ensaio prévio, com diferentes concentrações de glucono-delta-lactona, para verificar qual concentração é capaz de inibir a atividade da  $\beta$ -glucosidase, mantendo uma boa atividade para exoglucanase. Conforme apresentado na Figura 13 na concentração de 50 mM de glucono-delta-lactona, praticamente não é possível observar atividade enzimática sobre o substrato PNP-G (específico para  $\beta$ -glucosidase), indicando que a  $\beta$ -glucosidase encontra-se inibida. No entanto, nesta concentração de 50 mM de glucono-delta-lactona é possível observar atividade enzimática sobre o substrato PNP-C (degradado por  $\beta$ -glucosidase e exoglucanase), indicando que a exoglucanase está ativa. Em valores superiores de concentração de glucono-delta-lactona, a atividade sobre o PNP-C é diminuída, indicando que maiores concentrações começam a inibir parcialmente a exoglucanase. Portanto, a concentração de 50 mM de glucono-delta-lactona foi adicionada ao ensaio de PNP-C para avaliação da influência da temperatura e pH na atividade enzimática.

Figura 13 - Influência da concentração de glucono-delta-lactona na atividade das enzimas  $\beta$ -glucosidase e exoglucanase sobre os substratos PNP-G e PNP-C.



De acordo com os resultados apresentados na Figura 14 é possível observar que a atividade ótima da exoglucanase ocorre nas mesmas condições ótimas da  $\beta$ -glucosidase (45° C e pH 4,0). Estas condições de temperatura e pH são comuns para enzimas de representantes do gênero *Aspergillus*. Estes fungos geralmente habitam ambientes ácidos e com temperatura mesofílica (OKADA, 1985), o que reflete em uma fisiologia adaptada para sobreviver nestas condições.

Figura 14 - Influência da temperatura e do pH na atividade da enzima exoglucanase sobre o substrato PNP-C adicionado de 50 mM de glucono-delta-lactona.

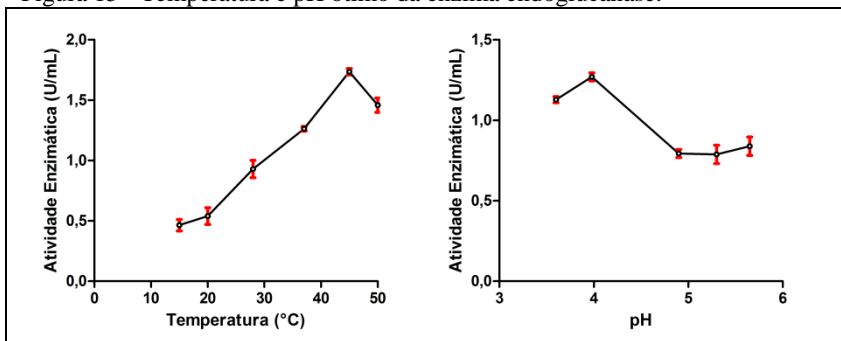


#### 4.2.3 Endoglucanase

Para a avaliação da endoglucanase foi utilizado o substrato cromogênico AZO-CMC. Esta enzima também apresentou suas condições

ótimas de atividade em 45°C de temperatura e pH 4 (Figura 15). As mesmas condições foram encontradas em outros estudos com *A. niger* (HURST et al., 1977; OKADA, 1985).

Figura 15 - Temperatura e pH ótimo da enzima endoglucanase.



#### 4.2.4 Considerações

As enzimas celulases avaliadas ( $\beta$ -glucosidase, exoglucanase e endoglucanase) apresentaram sua atividade superior nas mesmas condições de temperatura (45°C) e pH (4,0). Portanto, estas condições foram utilizadas para realizar todas as etapas de hidrólise enzimática na avaliação dos pré-tratamentos.

### 4.3 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO

#### 4.3.1 Planejamento fatorial 2<sup>3</sup> completo

Para determinar as melhores condições de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi realizado um estudo avaliando a influência de três variáveis do processo, sendo elas, concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), temperatura e agitação do meio reacional durante o pré-tratamento. Para tanto, foi realizado um planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> completo com três repetições no ponto central, utilizando as condições apresentadas na Tabela 5. Após o pré-tratamento, o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por um período de 60 horas e os ART liberados foram quantificados. O pré-tratamento mais eficaz foi encontrado utilizando as condições do ponto central.

Tabela 5 - Matriz do planejamento experimental fatorial  $2^3$  completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino, e a superfície de resposta em ART liberados após 60 horas de hidrólise enzimática.

Ensaio	$H_2O_2$ (%)	Temperatura (°C)	Agitação (Hz)	ART (mg g <sup>-1</sup> )
1	3 (-1)	20 (-1)	0 (-1)	42,6
2	7 (+1)	20 (-1)	0 (-1)	65,3
3	3 (-1)	60 (+1)	0 (-1)	46,2
4	7 (+1)	60 (+1)	0 (-1)	24,2
5	3 (-1)	20 (-1)	3,33 (+1)	45,4
6	7 (+1)	20 (-1)	3,33 (+1)	71,1
7	3 (-1)	60 (+1)	3,33 (+1)	29,8
8	7 (+1)	60 (+1)	3,33 (+1)	9,2
9	5 (0)	40 (0)	1,67 (0)	76,2
10	5 (0)	40 (0)	1,67 (0)	74,2
11	5 (0)	40 (0)	1,67 (0)	75,4
Controle	-	-	-	21,8

A influência dos fatores foi avaliada estatisticamente por ANOVA a um nível de significância de 5% (Tabela 6). A partir do valor do Teste  $F$  (597,8) para o modelo, que é muito maior do que o valor tabelado (5,050) é possível concluir que o modelo descreve os dados de forma significativa, a um nível de confiança de 95% (MONTGOMERY, 2006; ERIKSSON, 2008). Além disso, o modelo não apresenta evidências de falta de ajuste, uma vez que o valor do Teste  $F$  para a falta de ajuste (2,265) é menor do que o valor tabelado (19,16).

Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial  $2^3$  completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste $F$
Modelo	5400	5	1080	597,8 <sup>a</sup>
Resíduo	9,034	5	1,807	
Falta de ajuste	6,980	3	2,327	2,265 <sup>b</sup>
Erro puro	2,055	2	1,027	
Total	5409	10		

<sup>a</sup> F-tabelado<sub>5,5</sub> 5,05

<sup>b</sup> F-tabelado<sub>3,2</sub> 19,16

Máxima variação explicada = 99,96%

Máxima variação explicável = 99,83%



A Tabela 7 mostra os efeitos e os coeficientes do modelo de regressão para a produção de ART; os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ . Como o coeficiente de curvatura é significativo mostra que o modelo não é linear. Os efeitos principais significativos foram temperatura e agitação, sendo que ambos afetam negativamente o rendimento. A seguir, são significativas as interações concentração de  $H_2O_2 \times$  temperatura (1\*2), e temperatura  $\times$  agitação (1\*3), ambos também com influência negativa sobre o processo. Os que possuem efeitos não significativos foram concentração de  $H_2O_2$  e interação de concentração de  $H_2O_2 \times$  agitação (1\*3), para um nível de confiança de 95%. Os coeficientes não significativos foram retirados do modelo.

Tabela 7 - Efeitos e coeficientes de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento fatorial  $2^3$  completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

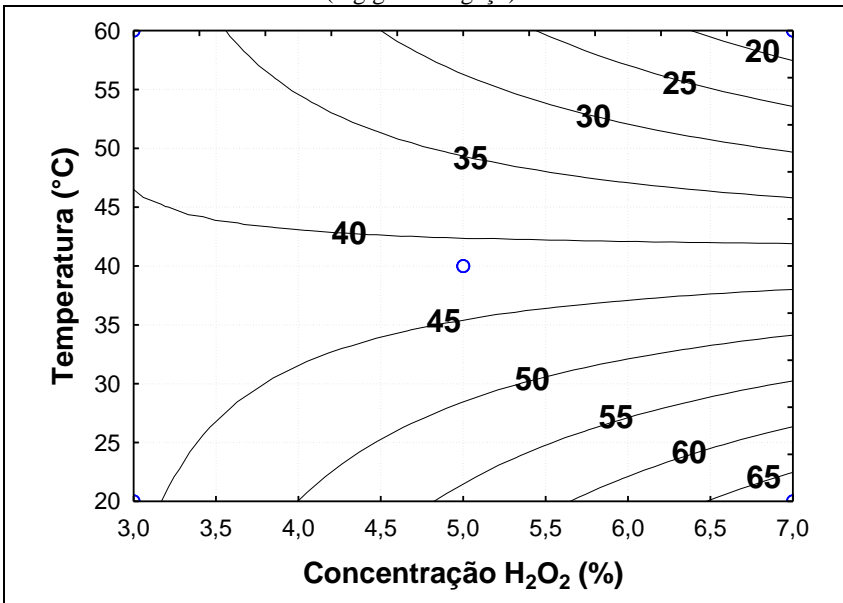
<b>Fator</b>	<b>Efeito <sup>a</sup></b>	<b>Valor p</b>	<b>Coefficientes</b>
Média	<u>41,72</u>	0,000074	41,72
Curvatura	<u>67,05</u>	0,000419	33,52
(1) Concentração de $H_2O_2$	1,481	0,174721	0,7406
(2) Temperatura	<u>-28,72</u>	0,000622	-14,36
(3) Agitação	<u>-5,702</u>	0,015431	-2,851
1*2	<u>-22,73</u>	0,000993	-11,36
1*3	1,076	0,272179	0,5378
2*3	<u>-10,00</u>	0,005092	-5,002

<sup>a</sup> Os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ .

Na Figura 16 são apresentadas as curvas de níveis da produção de ART em função da concentração de  $H_2O_2$  e temperatura, com a agitação mantida no ponto central (1,67 Hz). É possível observar que em baixa concentração de  $H_2O_2$  a influência da temperatura é pequena, mas, à medida que a concentração de  $H_2O_2$  é aumentada a influência da temperatura aumenta proporcionalmente. Quando a concentração de  $H_2O_2$  e a temperatura do pré-tratamento foram elevadas nas condições máximas utilizadas no planejamento, o bagaço não se tornou susceptível à hidrólise enzimática. Esta combinação fez com que o bagaço se tornasse um aglomerado de partículas, assumindo uma forma semelhante a uma placa. Sendo assim, quando submetido à hidrólise enzimática este bagaço

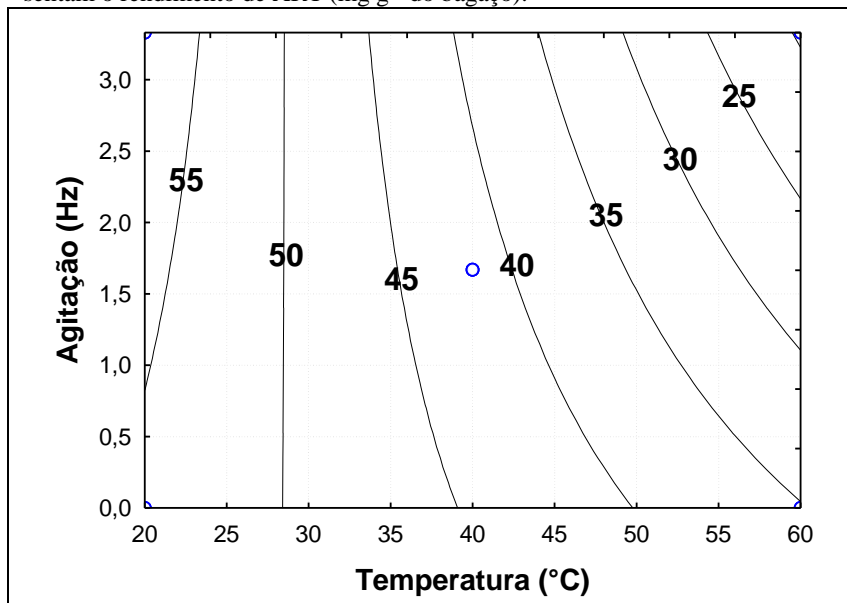
em forma de placa mostrou problemas de absorção de água, permanecendo um aglomerado, tendo sido observado evidente redução da área superficial disponível ao ataque enzimático. Portanto, a melhor condição de pré-tratamento para a hidrólise é encontrada com alta concentração de  $H_2O_2$  (7%) e baixa temperatura (20 °C).

Figura 16 - Curvas de níveis do rendimento de ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de  $H_2O_2$  e temperatura, sob agitação de 1,67 Hz. Os números sobre os contornos representam o rendimento de ART ( $mg\ g^{-1}$  do bagaço).



Na Figura 17 é apresentado o rendimento de ART em função da temperatura e agitação, quando a concentração de  $H_2O_2$  é mantida no ponto central (5%). Neste caso, observa-se que a influência da agitação é muito pequena, e que apenas uma baixa agitação é suficiente para manter o processo em um maior rendimento.

Figura 17 - Curvas de níveis do rendimento de ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e agitação, com a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 5%. Os números sobre os contornos representam o rendimento de ART ( $\text{mg g}^{-1}$  do bagaço).



De acordo com as Figuras 16 e 17 a melhor condição, entre as avaliadas no planejamento para o pré-tratamento de peróxido de hidrogênio alcalino é de 5% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 20°C de temperatura e agitação do meio reacional mantida acima de 0,8 Hz. No entanto, o modelo apresentado não é linear e o planejamento fatorial  $2^3$  completo aplicado é inadequado para determinar a curvatura do modelo (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2006; ERIKSSON, 2008). Sendo assim, novos experimentos utilizando planejamentos adequados para aferir a curvatura do modelo foram realizados para determinar as condições ótimas.

#### 4.3.2 Otimização das condições de pré-tratamento

Partindo dos resultados obtidos na etapa anterior (item 4.3.1), foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela para determinar as condições ótimas de pré-tratamento. Como foi observado que uma agitação acima de 0,8 Hz é o suficiente para manter um bom ren-

dimento, a agitação foi mantida em 1,67 Hz e apenas as condições de temperatura e concentração de  $H_2O_2$  foram reavaliadas. A melhor condição na etapa anterior foi tomada como ponto central para planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela (Tabela 8). Após o pré-tratamento, o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por um período de 48 horas e os ART liberados foram quantificados. Os pré-tratamentos mais eficazes foram encontrados nos ensaios 2, 4 e 8, onde a temperatura encontra-se mais elevada.

Tabela 8 - Matriz do planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela do pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas.

Ensaio	$H_2O_2$ (%)	Temperatura ( $^{\circ}C$ )	ART ( $mg\ g^{-1}$ )
1	5 (-1)	15 (-1)	73,3
2	5 (-1)	35 (+1)	152,0
3	9 (+1)	15 (-1)	97,6
4	9 (+1)	35 (+1)	147,6
5	4,17 (-1,41)	25 (0)	104,0
6	9,83 (+1,41)	25 (0)	116,5
7	7 (0)	11 (-1,41)	88,3
8	7 (0)	39 (+1,41)	158,6
9	7 (0)	25 (0)	100,9
10	7 (0)	25 (0)	103,1
11	7 (0)	25 (0)	107,1
12	7 (0)	25 (0)	114,5
13	7 (0)	25 (0)	106,8
Controle	-	-	38,5

A influência da temperatura e da concentração de  $H_2O_2$  foi avaliada estatisticamente pelo teste ANOVA com nível de significância de 5% (Tabela 9). De acordo com o Teste *F*, o modelo é altamente significativo a um nível de confiança de 95%, sendo que o valor de 60,54 é muito maior do que o valor tabelado (3,838). Além disso, o valor do Teste *F* para a falta de ajuste (1,308) é menor do que o valor tabelado (6,388), indicando que não existe evidência de falta de ajuste para o modelo.

Tabela 9 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste $F$
Modelo	7411	4	1853	60,54 <sup>a</sup>
Resíduo	244,8	8	30,60	
Falta de ajuste	138,7	4	34,68	1,308 <sup>b</sup>
Erro puro	106,1	4	26,52	
Total	7656	12		

<sup>a</sup> F-tabelado<sub>4,8</sub> 3,838

<sup>b</sup> F-tabelado<sub>4,4</sub> 6,388

Máxima variação explicada = 98,61%

Máxima variação explicável = 96,80%

Os efeitos e os coeficientes do modelo de regressão para a produção de ART são apresentados na Tabela 10, os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ , que são a concentração de  $H_2O_2$  linear, a temperatura linear e quadrática e a interação da concentração de  $H_2O_2$  linear  $\times$  temperatura linear (1L\*2L). A concentração de  $H_2O_2$  quadrática não foi considerada significativa para um nível de confiança de 95%.

Tabela 10 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

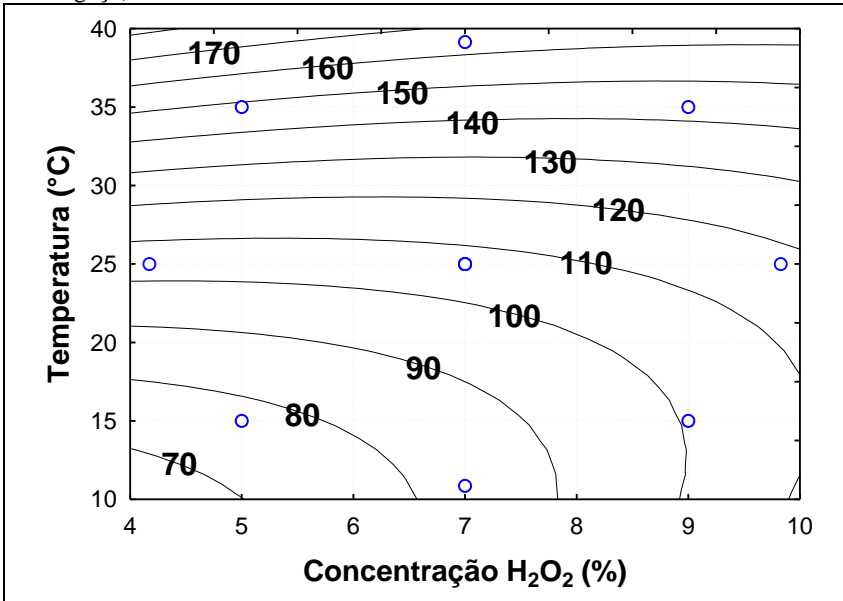
Fator	Efeito <sup>a</sup>	Valor $p$	Coefficientes
Média	<u>106,4</u>	0,000000	106,4
(1) Concentração de $H_2O_2$ (L)	<u>9,372</u>	0,047825	4,686
Concentração de $H_2O_2$ (Q)	4,181	0,352265	2,090
(2) Temperatura (L)	<u>57,02</u>	0,000002	28,51
Temperatura (Q)	<u>17,37</u>	0,004354	8,685
1L*2L	<u>-14,33</u>	0,035904	-7,169

<sup>a</sup> Os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ .

A produção de ART em função da interação entre a concentração de  $H_2O_2$  e a temperatura é apresentada na Figura 18. É possível observar claramente que a temperatura é o fator que exerce maior influência na obtenção de ART, sendo que quanto mais alta a temperatura, maior a

concentração de açúcares formados. Em relação à concentração de  $H_2O_2$  é possível ver a influência a temperaturas abaixo do ponto central; a temperaturas maiores que a do ponto central esta influência é praticamente inexistente.

Figura 18 - Curvas de níveis do rendimento dos ART liberados após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e concentração de  $H_2O_2$ . Os números sobre os contornos representam os ART ( $mg\ g^{-1}$  do bagaço).



De acordo com a Figura 18 a temperatura ótima para o pré-tratamento está acima das temperaturas avaliadas, no entanto, foi visto na Figura 16, que a temperatura de  $60^{\circ}C$  não se mostrou adequada para um pré-tratamento eficiente. Sendo assim, um novo planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela foi realizado para encontrar a melhor condição de pré-tratamento. Foram mantidas as mesmas concentrações de  $H_2O_2$  e foram escolhidas novas condições de temperatura (Tabela 11). O ensaio 8 apresentou o maior rendimento de ART, utilizando a temperatura de  $45^{\circ}C$  e concentração de  $H_2O_2$  em 9,83%.

Tabela 11 - Matriz do planejamento experimental planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas.

<b>Ensaio</b>	<b><math>H_2O_2</math> (%)</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}C</math>)</b>	<b>ART (<math>mg\ g^{-1}</math>)</b>
1	5 (-1)	38 (-1)	127,8
2	9 (+1)	38 (-1)	167,3
3	9 (+1)	52 (+1)	144,2
4	5 (-1)	52 (+1)	172,9
5	7 (0)	35 (-1,41)	137,8
6	7 (0)	55 (+1,41)	164,4
7	4,17 (-1,41)	45 (0)	143,6
8	9,83 (+1,41)	45 (0)	183,8
9	7 (0)	45 (0)	175,6
10	7 (0)	45 (0)	179,5
11	7 (0)	45 (0)	173,6
12	7 (0)	45 (0)	172,0
13	7 (0)	45 (0)	170,6
Controle	-	-	42,2

Na Tabela 12 é apresentada a ANOVA para o modelo que descreve a influência da temperatura e da concentração de  $H_2O_2$  no rendimento avaliado no planejamento experimental da Tabela 11. O Teste  $F$  aponta que o modelo é significativo dentro do nível de confiança de 95%, já que o valor de  $F$  (46,90) é bem maior que o valor tabelado (3,838). É possível observar também que não existe evidência de falta de ajuste, uma vez que o valor de  $F$  (2,399) é menor do que o valor tabelado (6,388).

Tabela 12 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste <i>F</i>
Modelo	3801	4	950,2	46,90 <sup>a</sup>
Resíduo	162,1	8	20,26	
Falta de ajuste	114,4	4	28,60	2,399 <sup>b</sup>
Erro puro	47,69	4	11,93	
Total	3963	12		

<sup>a</sup> F-tabelado<sub>4,8</sub> 3,838

<sup>b</sup> F-tabelado<sub>4,4</sub> 6,388

Máxima variação explicada = 98,80%

Máxima variação explicável = 95,91%

Na Tabela 13 são apresentados os efeitos e os coeficientes do modelo de regressão para a produção de ART, os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ ; concentração de  $H_2O_2$  linear e quadrática e a temperatura linear e quadrática. Já a interação da concentração de  $H_2O_2$  linear  $\times$  temperatura linear (1L\*2L) não foi considerada significativa para um nível de confiança de 95%.

Tabela 13 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental  $2^2$  composto central de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  alcalino.

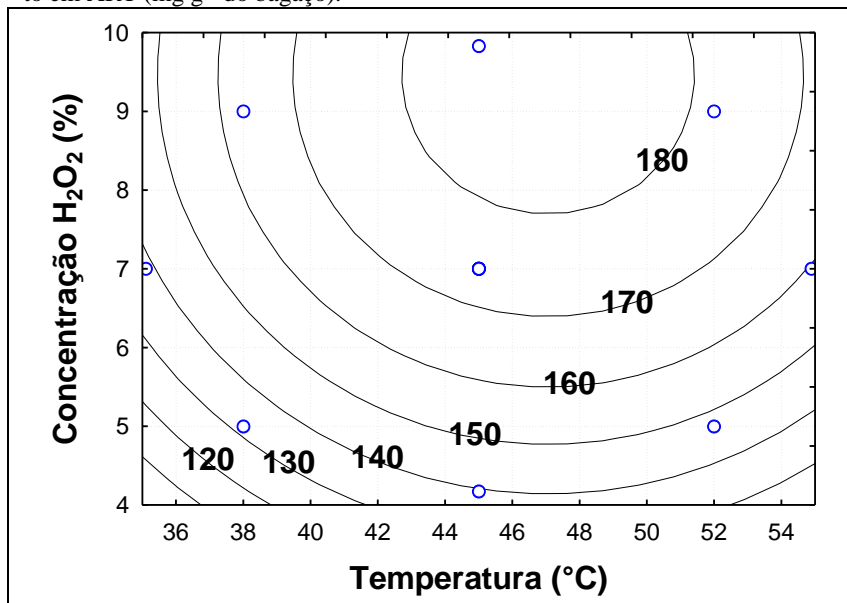
Fator	Efeito <sup>a</sup>	Valor <i>p</i>	Coefficientes
Média	<u>174,2</u>	0,000000	174,2
(1) Concentração de $H_2O_2$ (L)	<u>14,93</u>	0,001860	7,466
Concentração de $H_2O_2$ (Q)	<u>-25,33</u>	0,000119	-12,67
(2) Temperatura (L)	<u>31,29</u>	0,000019	15,64
Temperatura (Q)	<u>-12,70</u>	0,006322	-6,352
1L*2L	-5,409	0,254305	-2,705

<sup>a</sup> Os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ .

Na Figura 19 é apresentada a produção de ART em função da interação entre a concentração de  $H_2O_2$  e a temperatura. É possível observar que a condição onde a produção de ART é máxima se encontra entre as temperaturas de 42 e 50°C onde a concentração de  $H_2O_2$  se mantém entre 8 e 10%.



Figura 19 - Curvas de níveis do rendimento dos açúcares redutores após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de temperatura e concentração de  $H_2O_2$ . Os números sobre os contornos representam o rendimento em ART ( $mg\ g^{-1}$  do bagaço).



O ponto de maior produção indicado pelo modelo é pode ser obtido pela equação gerada pelo programa computacional Statistica (Equação 4.1). A solução do ponto otimizado, com maior rendimento de ART foi obtida pelo mesmo programa apresentando o valor de temperatura em  $46,17^{\circ}C$  e a concentração de  $H_2O_2$  em  $9,39\%$ .

$$ART = - 590,6155 + 25,6824 * P - 0,2585 * P^2 + 38,7489 * T - 1,5881 * T^2 - 0,1932 * P * T$$

(Equação 4.1)

Onde:

ART = Açúcares redutores totais ( $mg\ g^{-1}$  bagaço)

P = Concentração de  $H_2O_2$  (%)

T = Temperatura ( $^{\circ}C$ )

As condições ótimas obtidas diferem dos valores encontrados em outros trabalhos. Rabelo et al. (2011) avaliaram o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em bagaço da cana-de-açúcar e encon-

traram a condição ótima em 7,35% de  $H_2O_2$  e 25°C de temperatura. Estes valores estão um pouco distantes dos valores encontrados no presente trabalho. Em uma etapa anterior de planejamento experimental, foi utilizada uma condição similar a destes autores (vide Tabela 8, ensaios do ponto central), resultando em um rendimento de cerca de 40% inferior ao obtido na condição ótima encontrada no presente trabalho.

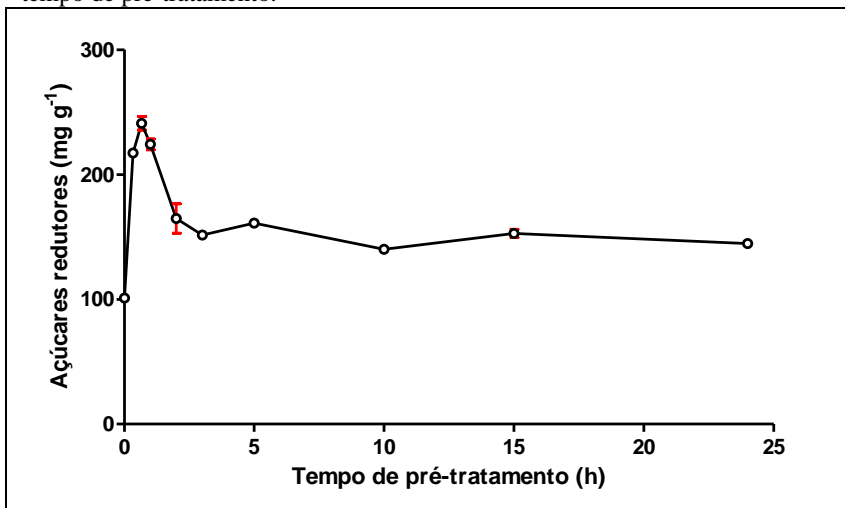
Karagöz et al. (2012) avaliaram o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em palha de colza e encontraram a condição ótima em 5% de  $H_2O_2$  e 50°C de temperatura. Neste caso a temperatura esta próxima à encontrada neste estudo, já a concentração de  $H_2O_2$  ficou em 5% pelo fato de ter sido a maior concentração avaliada por estes autores. Muito provável se fosse realizado um estudo mais aprofundado como neste trabalho, estes autores teriam encontrado um valor superior e que teria fornecido um rendimento maior.

Ainda referente ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino em bagaço de cana-de-açúcar, Monte, Brienzo e Milagres (2011) encontraram a condição ótima em 2% de  $H_2O_2$  e 60°C de temperatura, contemplando uma conversão de celulose em açúcares redutores de aproximadamente 60%. Estas condições ótimas de pré-tratamento são diferentes das condições supracitadas, no entanto, durante este pré-tratamento é adicionado sulfato de magnésio, e ainda ocorre a adição de suco de abacaxi no processo de hidrólise enzimática. Este suco contém enzimas xilanases que auxiliam na degradação da hemicelulose, constituindo uma condição diferenciada de hidrólise o que pode permitir trabalhar com uma condição ótima diferenciada de pré-tratamento.

#### 4.3.3 Cinética do pré-tratamento

A partir das condições ótimas de concentração de  $H_2O_2$ , temperatura e agitação foi realizado um novo experimento avaliando o melhor tempo (0; 0,33; 0,67; 1; 2; 3; 5; 10; 15 e 24 horas) de pré-tratamento. Após os respectivos pré-tratamentos em tempos diferentes, o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por 48 horas e os ART liberados no meio foram quantificados. Na Figura 20 é possível observar que com 40 minutos de reação de pré-tratamento obteve-se o melhor rendimento de ART. É possível observar também que um maior tempo de pré-tratamento acaba prejudicando a susceptibilidade do bagaço para as enzimas.

Figura 20 - Rendimento de ART em função do tempo do pré-tratamento de peróxido de hidrogênio alcalino com 9,39% concentração  $H_2O_2$ , 46°C de temperatura e 1,67 Hz de agitação. Foi realizada uma hidrólise de 48 horas para cada tempo de pré-tratamento.



Em geral, a maioria dos trabalhos que avaliaram as condições de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino não realizam um estudo mais aprofundado com diferentes tempos, chegando então, a obter valores até prejudiciais ao processo. Rabelo (2007), relata que nos primeiros 45 minutos da reação do pré-tratamento alcalino ocorre uma grande liberação de  $O_2$  devido a decomposição do peróxido, indicando que grande parte do peróxido de hidrogênio está presente até este período. Como é observado na Figura 20, após duas horas de pré-tratamento ocorre uma grande queda no rendimento de açúcares redutores liberados na hidrólise, o que pode estar relacionado com uma degradação dos polímeros celulose e hemicelulose. O pré-tratamento por um período após a degradação completa do peróxido de hidrogênio, acaba se tornando apenas um processo de pré-tratamento alcalino desencadeado pelo NaOH, que age de forma agressiva solubilizando grande parte da hemicelulose (ALVIRA et al., 2010), fazendo com que esta, não esteja mais disponível na etapa de hidrólise enzimática. No caso de Rabelo et al. (2011) e Karagöz et al. (2012) o tempo de 1 hora utilizado está bem próximo ao encontrado e também não apresenta uma grande diferença de rendimento. Já Monte; Brienzo e Milagres (2011) encontraram o tempo de 4 horas como melhor condição. Comparado ao presente estudo

esta condição não é adequada para se obter um melhor rendimento. No entanto, a explicação para tal condição, é que o menor tempo avaliado por estes autores foi o de 4 horas.

#### 4.4 PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SUPLEMENTADO COM CINZAS

##### 4.4.1 Planejamento 2<sup>3</sup> fatorial completo

Para determinar quais são as melhores condições de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas foi realizado um estudo avaliando a influência de três variáveis do processo, sendo elas, concentração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), concentração de cinzas (proveniente da queima do bagaço) e temperatura. Para tanto, foi realizado um planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> completo com três repetições no ponto central, utilizando as condições apresentadas na Tabela 14. Após o pré-tratamento, o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por um período de 48 horas e os ART liberados foram quantificados. Além dos experimentos do planejamento, foram inseridos dois experimentos controle, sendo, um sem pré-tratamento e outro sem pré-tratamento adicionado de cinzas na etapa de hidrólise, para verificar se a presença de cinzas pode influenciar na quantidade ART liberados. Os ensaios 4, 7, 8, 9, 10 e 11 foram os que apresentaram melhor rendimento. Pode-se observar também que o controle 1, que possui cinzas na etapa de hidrólise apresentou um resultado ligeiramente superior ao controle 2, que não teve nenhuma forma de tratamento. Esta diferença pode-se dar pela presença de metais nas cinzas atuando como cofatores para as enzimas celulasas, o que aumenta sua atividade (LIMA et al., 2005). Como já visto no item 4.1.2, as cinzas utilizadas apresentam uma quantidade considerável de metais Mg e Ca e também em menores quantidades os metais Na e Mn.

Tabela 14 - Matriz do planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suplementado com cinzas, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas.

Ensaio	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)	Cinzas (%)	Temperatura (°C)	ART (mg g <sup>-1</sup> )
1	3 (-1)	1 (-1)	20 (-1)	89,0
2	7 (+1)	1 (-1)	20 (-1)	87,3
3	3 (-1)	5 (+1)	20 (-1)	92,0
4	7 (+1)	5 (+1)	20 (-1)	110,1
5	3 (-1)	1 (-1)	60 (+1)	72,5
6	7 (+1)	1 (-1)	60 (+1)	66,6
7	3 (-1)	5 (+1)	60 (+1)	105,8
8	7 (+1)	5 (+1)	60 (+1)	111,6
9	5 (0)	3 (0)	40 (0)	107,3
10	5 (0)	3 (0)	40 (0)	105,7
11	5 (0)	3 (0)	40 (0)	108,7
Controle 1	-	3	-	60,1
Controle 2	-	-	-	49,0

A influência dos fatores foi avaliada estatisticamente pelo teste ANOVA com nível de significância de 5% (Tabela 15). O valor para o Teste *F* do modelo (29,94) é maior que o listado (5,050), portanto, o modelo gerado é significativo dentro do nível de confiança de 95%. O valor do Teste *F* para a falta de ajuste (11,59) é um pouco menor do que o valor tabelado (19,16), sugerindo que este modelo está ajustado.

Tabela 15 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> suplementado com cinzas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste <i>F</i>
Modelo	2398	5	479,7	29,94 <sup>a</sup>
Resíduo	80,10	5	16,02	
Falta de ajuste	75,75	3	25,25	11,59 <sup>b</sup>
Erro puro	4,36	2	2,179	
Total	2478	10		

<sup>a</sup> F-tabelado<sub>5,5</sub> 5,05

<sup>b</sup> F-tabelado<sub>3,2</sub> 19,16

Máxima variação explicada = 99,82%

Máxima variação explicável = 96,77%

Os efeitos e coeficientes do modelo de regressão para a produção de ART são mostrados na Tabela 16, os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ . O modelo apresentado não é linear, pelo fato do coeficiente de curvatura ser significativo. Os efeitos significativos foram temperatura e concentração de cinzas, seguido pelas interações da concentração de  $H_2O_2 \times$  concentração de cinzas (1\*2), e concentração de cinzas  $\times$  temperatura (1\*3). Os que possuem efeitos não significativos foram concentração de  $H_2O_2$  e interação de concentração de  $H_2O_2 \times$  temperatura (1\*3), para um nível de confiança de 95%, sendo assim estes coeficientes foram retirados do modelo.

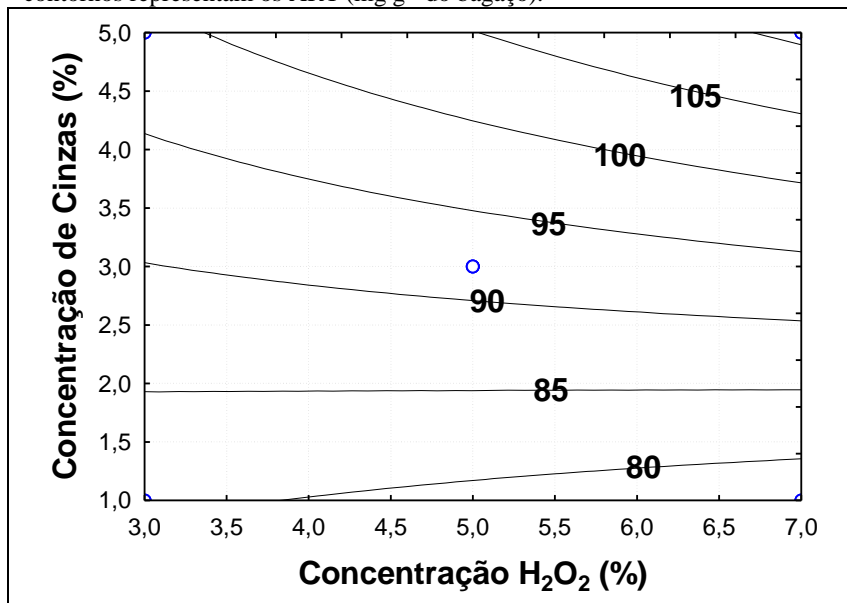
Tabela 16 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental fatorial  $2^3$  completo de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  suplementado com cinzas.

<b>Fator</b>	<b>Efeito <sup>a</sup></b>	<b>Valor p</b>	<b>Coefficientes</b>
Média	<u>91,88</u>	0,000001	91,88
Curvatura	<u>30,73</u>	0,001615	15,37
(1) Concentração de $H_2O_2$	4,081	0,068232	2,040
(2) Concentração de Cinzas	<u>26,01</u>	0,000386	13,01
(3) Temperatura	<u>-5,453</u>	0,033525	-2,726
1*2	<u>7,889</u>	0,012452	3,944
1*3	-4,122	0,066655	-2,061
2*3	<u>13,15</u>	0,002896	6,574

<sup>a</sup> Os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ .

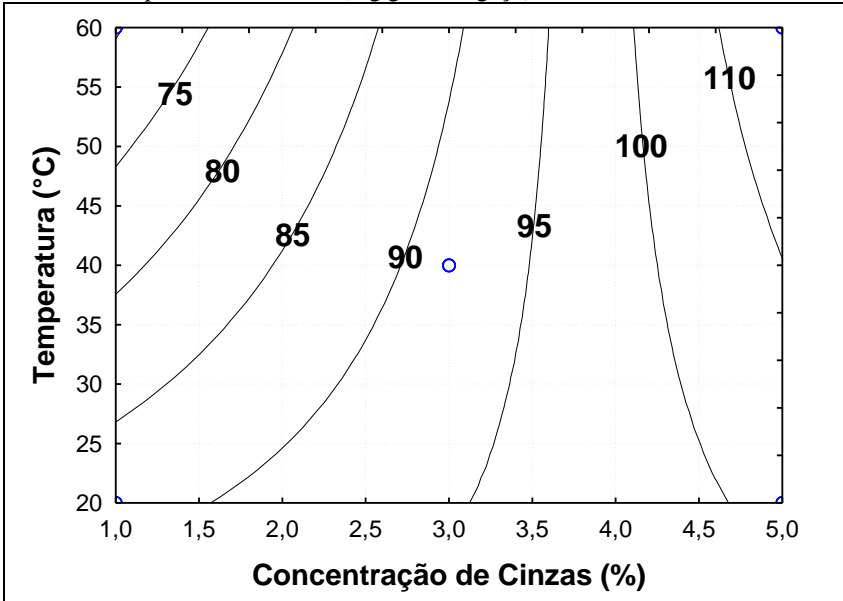
A Figura 21 mostra as curvas de níveis da produção de ART em função da interação entre a concentração de  $H_2O_2$  e concentração de cinzas com a temperatura mantida no ponto central (40 °C). É possível observar que a concentração de  $H_2O_2$  não apresenta muita influência no modelo. Sua influência é identificada apenas quando existe a interação com altas concentrações de cinzas, neste caso, observa-se que concentrações mais altas de  $H_2O_2$  tornam o pré-tratamento mais eficiente, fornecendo maior susceptibilidade ao ataque enzimático e formação de ART. Já a concentração de cinzas apresenta grande influência, sendo que quanto maior sua concentração durante o pré-tratamento, maior será a conversão em ART. A melhor condição de pré-tratamento para a hidrólise é encontrada com alta concentração de cinzas e alta concentração de  $H_2O_2$ , dentro dos valores testados. O modelo apresentado sugere que as concentrações de  $H_2O_2$  e cinzas devem ser superiores às testadas.

Figura 21 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de  $H_2O_2$  e concentração de cinzas com a temperatura mantida em  $40\text{ }^\circ\text{C}$ . Os números sobre os contornos representam os ART ( $\text{mg g}^{-1}$  do bagaço).



O rendimento de ART em função da concentração de cinzas e temperatura para a concentração de  $H_2O_2$  no ponto central (5%) é apresentado na Figura 22. A temperatura possui sua influência intimamente ligada à concentração de cinzas, sendo que quando esta muda sua concentração a temperatura pode assumir um aspecto positivo ou negativo. Para baixas concentrações de cinzas, uma baixa temperatura é a mais indicada, sendo que com uma concentração de cinzas mais elevada, uma temperatura mais alta é a condição adequada. Já a concentração de cinzas novamente apresenta grande influência, sendo que quanto maior a sua concentração, melhor é o efeito do pré-tratamento. A melhor condição é com elevada temperatura e elevada concentração de cinzas. Novamente, as condições sugeridas como ótimas pelo modelo estão acima dos valores testados, remetendo a necessidade de um novo experimento.

Figura 22 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de cinzas e temperatura com a concentração de  $H_2O_2$  mantida em 5%. Os números sobre os contornos representam os ART ( $mg\ g^{-1}$  do bagaço).



O modelo proposto para este planejamento experimental mostra que as três variáveis testadas possuem seus pontos ótimos acima dos valores testados e, portanto novos experimentos devem ser realizados com concentrações superiores. Além disso, o modelo não é linear, remetendo à necessidade de se realizar novos experimentos utilizando planejamentos adequados para aferir a curvatura do modelo (CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2006; ERIKSSON, 2008).

#### 4.4.2 Otimização das condições de pré-tratamento

Partindo dos resultados obtidos na etapa anterior (item 4.4.1), foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela para determinar as condições ótimas de pré-tratamento. Foi observado que os fatores avaliados (concentração de  $H_2O_2$ , concentração de cinzas e temperatura) apresentam seu ponto ótimo acima da faixa avaliada. No entanto, o equipamento de incubação utilizado possui sua temperatura máxima em 60°C, sendo inviável realizar experimentos com faixas su-



periores. Além disso, esta condição máxima de temperatura é bastante adequada tendo em vista que temperaturas maiores requerem gasto excessivo de energia, o que traria consequências indesejáveis para a filosofia de um processo limpo. Sendo assim, foi avaliada apenas a concentração de  $H_2O_2$  e de cinzas, com a temperatura mantida em  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . As condições limite utilizadas no experimento anterior foram utilizadas como ponto central para planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela (Tabela 17). Após o pré-tratamento, o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por um período de 48 horas e os ART liberados foram quantificados. O pré-tratamento com maior rendimento foi encontrado no ensaio 1.

Tabela 17 - Matriz do planejamento experimental planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  suplementado com cinzas, e a superfície de resposta em ART liberados após hidrólise enzimática de 48 horas.

Ensaio	Cinzas (%)	$H_2O_2$ (%)	ART ( $\text{mg g}^{-1}$ )
1	3 (-1)	5 (-1)	151,1
2	3 (-1)	9 (+1)	138,6
3	7 (+1)	5 (-1)	46,1
4	7 (+1)	9 (+1)	27,7
5	2,17 (-1,41)	7 (0)	132,6
6	7,83 (+1,41)	7 (0)	7,9
7	5 (0)	4,17 (-1,41)	123,4
8	5 (0)	9,83 (+1,41)	136,2
9	5 (0)	7 (0)	110,3
10	5 (0)	7 (0)	125,1
11	5 (0)	7 (0)	110,7
12	5 (0)	7 (0)	143,7
13	5 (0)	7 (0)	142,5
Controle	-	-	21,5

A influência da concentração de cinzas e da concentração de  $H_2O_2$  foi avaliada estatisticamente pelo teste ANOVA com nível de significância de 5% (Tabela 18). De acordo com o Teste  $F$ , o modelo é altamente significativo dentro do nível de confiança de 95%, sendo que o valor de 72,86 é muito maior do que o valor listado (4,103). Além disso, não existe evidência de falta de ajuste para o modelo, uma vez

que o valor do Teste  $F$  para a falta de ajuste (0,405) é bem menor do que o valor tabelado (6,163).

Tabela 18 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo sugerido a partir do planejamento experimental planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  suplementado com cinzas.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste $F$
Modelo	25658	2	12829	72,86 <sup>a</sup>
Resíduo	1760	10	176,1	
Falta de ajuste	694,9	6	115,8	0,435 <sup>b</sup>
Erro puro	1066	4	266,5	
Total	27419	12		

<sup>a</sup> F-tabelado<sub>2,10</sub> 4,103

<sup>b</sup> F-tabelado<sub>6,4</sub> 6,163

Máxima variação explicada = 96,11%

Máxima variação explicável = 93,58%

Na Tabela 19 são apresentados os efeitos e os coeficientes do modelo de regressão para a produção de ART, os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ . Os efeitos significativos foram a concentração de cinzas linear e quadrática. Já a concentração de  $H_2O_2$  linear e quadrática não foram significativas para um nível de confiança de 95%, assim como a interação da concentração de cinzas linear  $\times$  concentração de  $H_2O_2$  linear (1L\*2L).

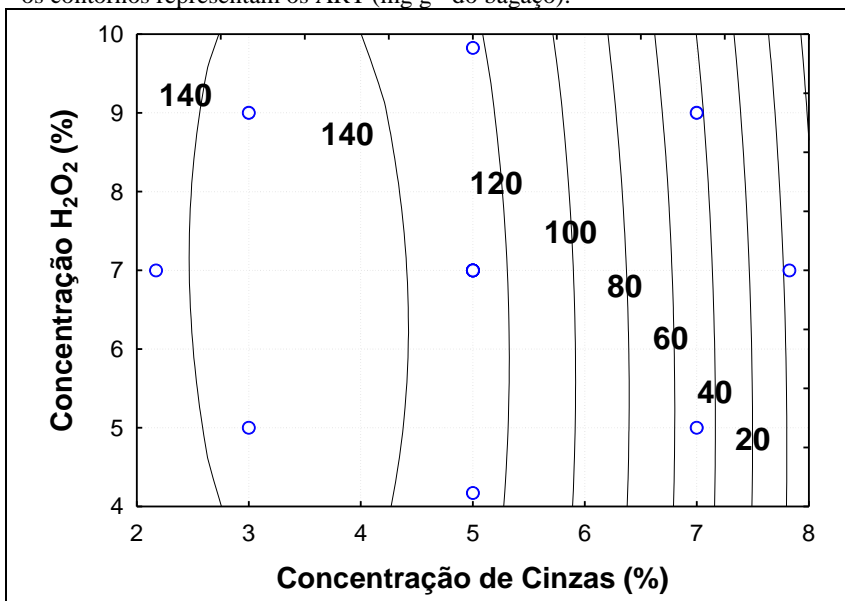
Tabela 19 - Efeitos e coeficiente de regressão do modelo sugerido a partir do planejamento experimental planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela de pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com  $H_2O_2$  suplementado com cinzas.

Fator	Efeito <sup>a</sup>	Valor $p$	Coefficientes
Média	<u>126,46</u>	0,000000	126,46
(1) Concentração de Cinzas (L)	<u>-98,06</u>	0,000048	-49,03
Concentração de Cinzas (Q)	<u>-60,78</u>	0,001399	-30,39
(2) Concentração de $H_2O_2$ (L)	-3,199	0,781754	-1,599
Concentração de $H_2O_2$ (Q)	-1,235	0,920369	-0,6175
1L*2L	-2,950	0,856432	-1,475

<sup>a</sup> Os efeitos significativos são aqueles com valor de  $p \leq 0,05$ .

Na Figura 23 são apresentadas as curvas de níveis para a produção de ART em função da interação entre a concentração de cinzas e concentração de  $H_2O_2$  durante o pré-tratamento. É possível observar que, dentro das condições testadas, a concentração de cinzas é que tem a grande influência sobre o pré-tratamento, sendo que a utilização de 3% seria a melhor condição. Uma utilização excessiva de cinzas prejudica o pré-tratamento.

Figura 23 - Curvas de níveis do rendimento dos ART após a hidrólise enzimática em função das condições de pré-tratamento de concentração de cinzas e concentração de  $H_2O_2$  com a temperatura mantida em  $60\text{ }^\circ\text{C}$ . Os números sobre os contornos representam os ART ( $\text{mg g}^{-1}$  do bagaço).



É possível obter o ponto de maior produção de ART através da equação gerada pelo programa computacional Statistica (Equação 4.2) referente ao modelo. A solução do ponto otimizado, com maior rendimento de ART foi obtida pelo mesmo programa apresentando o valor de concentração de cinzas em 3,40 % (p/v) e a concentração de  $H_2O_2$  em 6,32%.

$$\text{ART} = 44,2143 + 54,0467 * C - 7,5981 * C^2 + 3,2051 * P - 0,1543 * P^2 - 0,3687 * C * P$$

(Equação 4.2)

Onde:

ART = Açúcares redutores totais (mg g<sup>-1</sup> bagaço)

C = Concentração de cinzas (%)

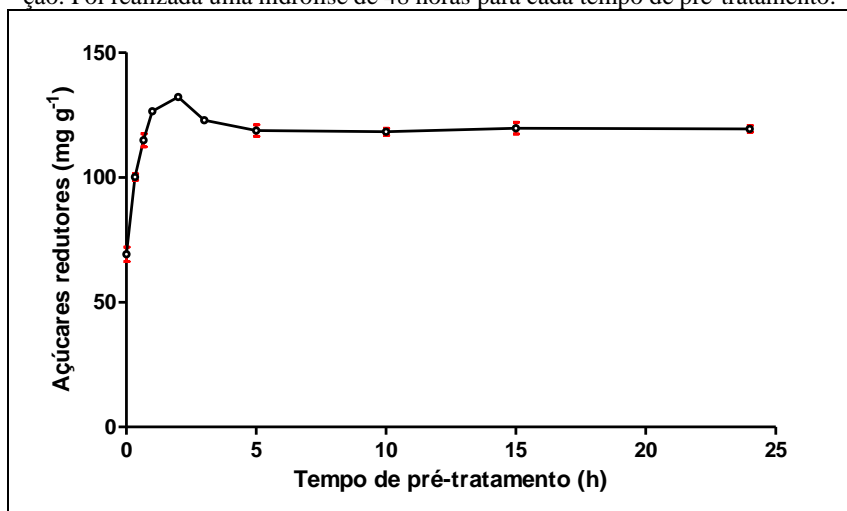
P = Concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%)

No planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup> completo foi obtido um modelo que apontava a concentração de cinzas para um valor acima de 5%, no entanto, no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> + configuração estrela o valor calculado no modelo foi de 3,40%. Esta diferença pode estar ligada ao mecanismo de ação destas cinzas neste processo de pré-tratamento. É importante lembrar que a cinza utilizada como suplemento no pré-tratamento apresenta em sua composição diversos tipos de metais (Tabela 4). Uma série de estudos mostra que alguns metais podem ser utilizados como catalisadores para decompor o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerando radicais hidroxilas (•OH), e então realizar deslignificação de materiais lignocelulósicos (MARTÍNEZ-HUITLE; BRILLAS, 2009; CRESTINI et al., 2010; LUCAS et al., 2012). Segundo Pita (2009), durante o processo de combustão para a obtenção das cinzas alguns metais se volatilizam, uns facilmente e outros em menor extensão. Com isso, é possível pressupor que cada processo de queima do bagaço para formação de cinzas possa gerar concentrações diferenciadas destes metais. Sendo assim, a concentração de cinzas não responderia linearmente à concentração do metal que poderia estar colaborando para a oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.4.3 Cinética do pré-tratamento

A partir das condições ótimas de temperatura e concentração de cinzas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado um novo experimento avaliando o tempo (0; 0,33; 0,67; 1; 2; 3; 5; 10; 15 e 24 horas) reacional de pré-tratamento. Após os respectivos pré-tratamentos o bagaço foi submetido à hidrólise enzimática por 48 horas. Os resultados são apresentados na Figura 24, onde é possível observar que com 2 horas de reação obteve-se o melhor rendimento de ART. O pré-tratamento em tempo maior acaba diminuindo a susceptibilidade do bagaço para as enzimas.

Figura 24 - Rendimento de ART em função do tempo do pré-tratamento com 6,32% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3,40% (p/v) cinzas, 60°C de temperatura e 1,67 Hz de agitação. Foi realizada uma hidrólise de 48 horas para cada tempo de pré-tratamento.



#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRÉ-TRATAMENTO

A partir das melhores condições identificadas nas etapas de pré-tratamento foram realizados estudos comparativos de rendimento de açúcares, composição e estruturas químicas e caracterização morfológica. A melhor condição para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino foi de 9,39% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 46°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 40 minutos. Já para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas a condição de 6,32% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 3,40% (p/v) cinzas, 60°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 2 horas foi a condição adequada.

##### 4.5.1 Quantificação dos açúcares liberados

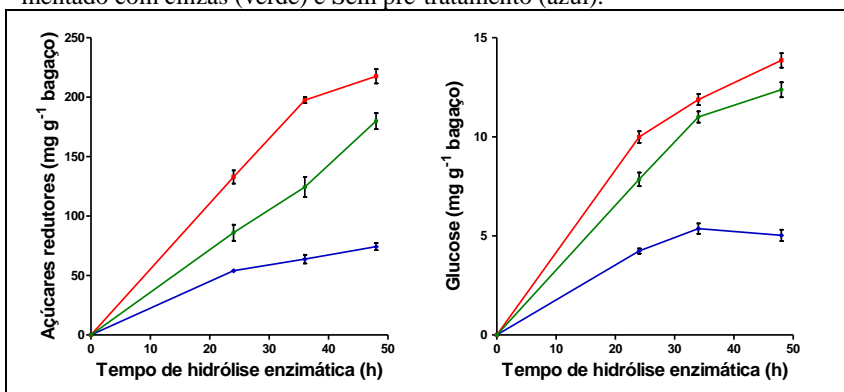
Para quantificar os açúcares liberados foi realizada a etapa de pré-tratamento (peróxido de hidrogênio alcalino e peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas) seguida pela etapa de hidrólise enzimática. Durante a hidrólise foram coletadas alíquotas nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas. Estas alíquotas foram avaliadas quanto à quantidade de glucose e

ART, conforme resultados na Tabela 20 e Figura 25. A partir dos resultados é possível observar que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas apresenta um rendimento de ART muito próximo ao pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino (cerca de 18% inferior). No entanto, o rendimento de glucose que foi avaliado por um método mais preciso não apresentou uma diferença significativa de acordo com o teste de Tukey HSD ( $p \leq 0,05$ ), demonstrando que o rendimento dos dois pré-tratamentos são equivalentes. Além disso, o pré-tratamento suplementado com cinzas apresenta um grande potencial visto as suas características favoráveis. A alcalinização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino envolve uma grande quantidade de NaOH. Para regular o pH a 11,5 em uma solução com 9,39% (v/v) de  $H_2O_2$  são necessários em média 7,30% (p/v) de NaOH (GOULD et al., 1989; MANZANO et al., 2000). Portanto, além de gerar uma grande quantidade de resíduos, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino apresenta um gasto superior de reagentes, além dos 7,30% de NaOH, são utilizados cerca de 30% a mais de  $H_2O_2$ . Em um reator com  $10 \text{ m}^3$  para a realização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino seriam utilizados cerca de 775 L a mais de  $H_2O_2$  (130 volumes) comparado ao pré-tratamento suplementado com cinzas, bem como uma adição de 730 Kg de NaOH para alcalinizar o pH em 11,5. Além disso, o pré-tratamento suplementado com cinzas apresenta uma etapa de lavagem mais reduzida, sendo que, com a utilização de cinzas o pH se mantém em torno de 8,5. Com isso é possível observar que sua aplicação possui vantagens de consumir uma quantidade inferior com reagentes químicos ( $H_2O_2$  e NaOH) e não operar em pH altos, formando resíduos altamente cáusticos.

Tabela 20 - Rendimento de ART e glucose liberados após 48 horas de hidrólise enzimática em função do tipo de pré-tratamento.

<b>Pré-tratamento</b>	<b>ART (<math>\text{mg g}^{-1}</math> bagaço)</b>	<b>Glucose (<math>\text{mg g}^{-1}</math> bagaço)</b>
$H_2O_2$ Alcalino	217,6 $\pm$ 8,5	13,9 $\pm$ 0,5
$H_2O_2$ com Cinzas	179,9 $\pm$ 9,6	12,2 $\pm$ 0,5
Sem pré-tratamento	74,3 $\pm$ 4,3	5,0 $\pm$ 0,4

Figura 25 - Rendimento de ART e glicose após hidrólise enzimática do bagaço. Pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino (vermelho); Pré-tratamento com  $H_2O_2$  suplementado com cinzas (verde) e Sem pré-tratamento (azul).



#### 4.5.2 Composição química do bagaço pré-tratado

O bagaço da cana-de-açúcar resultante de cada pré-tratamento avaliado foi caracterizado quanto à sua composição química (Tabela 21). De acordo com os resultados obtidos é possível observar que após o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a quantidade de lignina ( $0,28 \pm 0,01$  g) é muito inferior à do bagaço sem pré-tratamento ( $1,4 \pm 0,01$  g). Deste modo fica claro que este método atua desprendendo a lignina do material lignocelulósico, fazendo com que ocorra a remoção deste componente e deixando assim a celulose e hemicelulose disponível para hidrólise enzimática (GOULD, 1985). Resultados semelhantes a este pré-tratamento são apontados por Rabelo et al. (2011), Monte, Brienzo e Milagres (2011) e Karagöz et al. (2012). Já o método de pré-tratamento suplementado com cinzas não foi tão eficaz no desprendimento da lignina, sendo que ainda permanece metade da lignina permanece na matriz vegetal. Por outro lado, após o pré-tratamento  $H_2O_2$  alcalino foi observado uma perda de massa de aproximadamente 35% da hemicelulose do bagaço sem tratamento, ao passo que no pré-tratamento com  $H_2O_2$  e cinzas, a perda foi de cerca de 10%. Este resultado revela que o pré-tratamento alcalino age de modo mais agressivo, realizando não somente o desprendimento da lignina como também degradando parcialmente o polímero de hemicelulose. Este fato é relatado por Monte, Brienzo e Milagres (2011), que apontam a perda de 36% de hemicelulose após este pré-tratamento alcalino. Cabe lembrar que o pré-tratamento alcalino possui grande quantidade de NaOH em sua compo-

sição, reagente que também é utilizado para a deslignificação da madeira e formação de polpa de papel na indústria de celulose (OGUNSILE; QUINTANA, 2010), o qual é extremamente cáustico. Devido à grande quantidade utilizada de NaOH este pré-tratamento apresenta os mesmos problemas dos pré-tratamentos com as bases fortes, sendo eles, parcial degradação de carboidratos e geração de resíduos cáusticos. Utiliza-se a argumentação de que pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é um processo limpo sem geração de subprodutos para etapa de hidrólise (MONTE; BRIENZO; MILAGRES, 2011; RABELO et al., 2011; KARAGÖZ et al., 2012). No entanto, a enorme quantidade de NaOH adicionada para regular o pH em 11,5 torna este processo praticamente mais cáustico que oxidativo.

Tabela 21 - Composição química do bagaço da cana-de-açúcar após o pré-tratamento.

	<b>Sem Pré-tratamento</b>	<b>Pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Alcalino</b>	<b>Pré-tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cinzas</b>
	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Massa (g)</b>
<b>Inicial</b>	5,00	3,02 ±0,09	4,51 ±0,08
<b>Celulose</b>	2,08 ±0,04	2,01 ±0,1	2,03 ±0,04
<b>Hemicelulose</b>	1,05 ±0,04	0,70 ±0,05	0,96 ±0,07
<b>Lignina</b>	1,4 ±0,01	0,28 ±0,01	0,78 ±0,02
<b>Cinzas</b>	0,19 ±0,01	0,08 ±0,01	0,15 ±0,02
<b>Extrativos</b>	0,035 ±0,008		

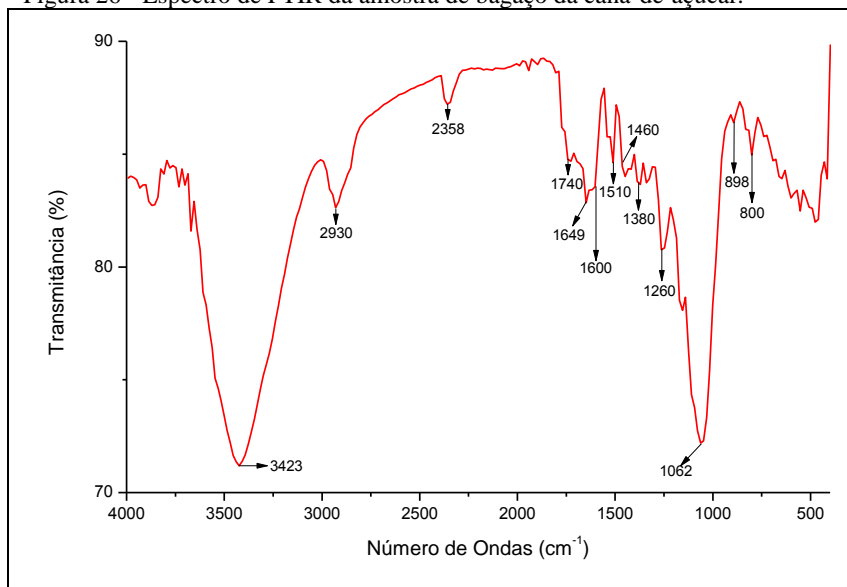
#### 4.5.3 Identificação espectrométrica de compostos orgânicos

O espectro de FTIR para a amostra do bagaço da cana-de-açúcar possui características semelhantes às de outros materiais lignocelulósicos (Figura 26). É possível identificar uma grande banda na região 4000-3300 cm<sup>-1</sup>, que aponta um estiramento O-H; uma banda na região de 3000-2800 cm<sup>-1</sup> indica um estiramento C-H em grupos metil e metileno, e uma forte faixa de sobreposição com absorções fortes e discretas na região de 1750-1000 cm<sup>-1</sup> (OWEN; THOMAS, 1989; COLOM et al., 2003; BODÍRLÁU; TEACĂ, 2009; MARABEZI, 2009; CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011). A região de 1740-1730 cm<sup>-1</sup> indica a presença de carbonila (C=O) livre. Embora todos os materiais complexos constituintes de materiais lignocelulósicos (incluindo os extrativos) possam apresentar carbonilas livre, a hemicelulose é o que possui maior quantidade destes grupamentos (OWEN; THOMAS, 1989), remetendo esta



banda à característica das xilanas (BODÎRLĂU; TEACĂ, 2009; YOON et al., 2012), que podem estar presentes em grande quantidade. Este aumento de carbonila (C=O éster) no pico  $1740\text{ cm}^{-1}$ , absorção de C-H a  $1380\text{ cm}^{-1}$  (-C-CH<sub>3</sub>), e estiramento -C-O- a  $1260\text{ cm}^{-1}$  confirmou a formação de ligações éster (SAIKIA et al., 1995; BODÎRLĂU; TEACĂ, 2009). Segundo Bodîrlău e Teacă (2009), a presença de uma banda em  $1637\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de ligações  $\beta$ -glucosídicas entre as unidades de açúcar, portanto a queda entre  $1633\text{ cm}^{-1}$  para  $1649\text{ cm}^{-1}$  é um forte indicativo da presença destas ligações. E ainda, a absorção da banda  $898\text{ cm}^{-1}$ , aponta para um estiramento C-O-C presente nas ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glucosídicas (SINDHU et al., 2010; CIOLACU; CIOLACU; POPA, 2011). Já a lignina pode ser identificada nas bandas  $1600\text{ cm}^{-1}$ ,  $1510\text{ cm}^{-1}$  e  $1460\text{ cm}^{-1}$ , que indicam a presença de anéis aromáticos dos álcoois hidroxicinâmílicos (p-cumarílico, coniferílico e sinapílico) que a constituem (COLOM et al., 2003; BODÎRLĂU; TEACĂ, 2009; MARABEZI, 2009). A banda em  $800\text{ cm}^{-1}$  colabora com a presença da lignina, sendo que esta banda faz referência ao estiramento C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de siringila e guaiacila, e em todas as posições da unidade hidroxifenila (MARABEZI, 2009).

Figura 26 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar.



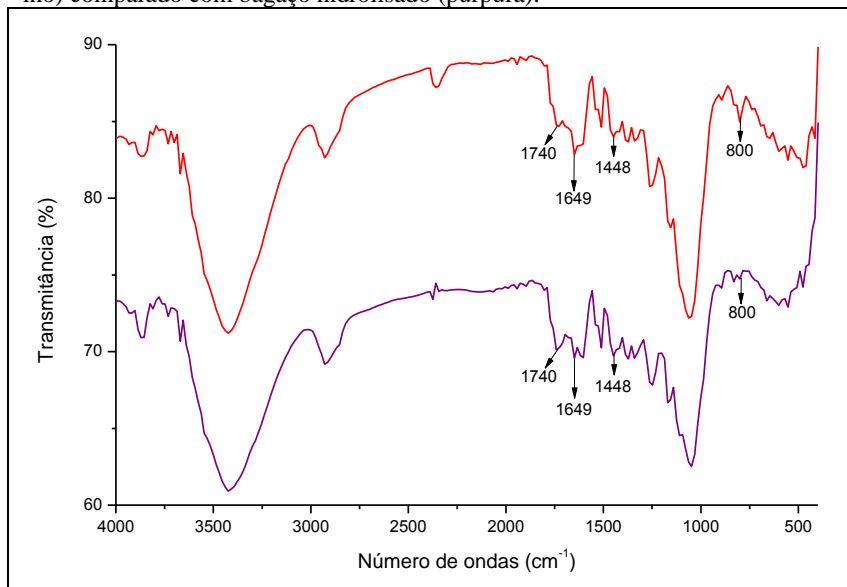
A diferença de intensidade entre as bandas 1510 e 1600  $\text{cm}^{-1}$  pode ser utilizada para diferenciar as ligninas de coníferas (alto teor de grupos guaiacila) das ligninas de folhosas (teor de siringila maior que na conífera), sendo que uma maior intensidade na banda 1510  $\text{cm}^{-1}$  é característica de conífera (OWEN; THOMAS, 1989; COLOM et al., 2003; FENGEL; WEGENER, 2003; MARABEZI, 2009). Comparando as bandas existentes no bagaço é possível observar que a intensidade na banda de 1600  $\text{cm}^{-1}$  é maior indicando que as ligninas possuem maiores quantidades de unidades siringila. No entanto, esta banda pode ser influenciada pela presença de grupos C=O, íons carboxilato e carboidratos (MARABEZI, 2009). Por fim, com uma comparação das bandas 1510  $\text{cm}^{-1}$  e 1460 $\text{cm}^{-1}$ , é possível observar que a banda 1510  $\text{cm}^{-1}$  é mais intensa, o que se enquadra dentro dos padrões estabelecidos para uma lignina-GSH (que possui os três álcoois precursores) (MARABEZI, 2009), que corresponde à lignina presente no bagaço de cana-de-açúcar. (RAMOS, 2003; MARABEZI, 2009). Na Tabela 22 são apresentados os valores e atribuições das bandas de FTIR característicos para materiais lignocelulósicos.

Tabela 22 - Valores e atribuições das bandas de FTIR.

<b>Banda cm<sup>-1</sup></b>	<b>Atribuições</b>	<b>Referências</b>
3450-3400	Estiramento O-H.	Bodîrlău e Teacă (2009);
2933-2842	Estiramento C-H em grupos metila e metileno.	Marabezi (2009); Ciolacu, Ciolacu e Popa (2011).
2360-2350	Estiramento assimétrico da molécula de CO <sub>2</sub> .	Fernandes (2005).
1740-1700	Estiramento da carbonila. C=O não conjugada	Saliba et al. (2001); Marabezi (2009).
1637	Presença de ligações β-glucosídicas entre as unidades de açúcar.	Bodîrlău e Teacă (2009).
1600	Vibração do anel aromático.	Owen e Thomas (1989);
1510	Vibração do anel aromático.	Colom et al. (2003);
1460	Deformação assimétrica C-H, em -CH <sub>3</sub> e -CH <sub>2</sub> .	Marabezi (2009).
1380	Absorção de C-H (-C-CH <sub>3</sub> )	Saikia et al. (1995);
1260	Estiramento -C-O-	Bodîrlău e Teacă (2009).
1062	Deformações do C-H e C-O.	Fengel e Wegener (2003); Rana et al. (2010).
900-890	Estiramento C-O-C presente nas ligações β-(1→4)-glucosídicas	Sindhu et al. (2010) Ciolacu, Ciolacu e Popa (2011). Yoon et al. (2012)
800	Estiramento C-H fora do plano nas posições 2 e 6 de siringila, guaiacila, e em todas as posições da unidade hidroxifenila.	Bykov (2008); Marabezi (2009).

A Figura 27 compara o espectro do bagaço com o bagaço após hidrólise enzimática de 48 horas. Não foram observadas mudanças significativas entre os dois espectros. Houve um pequeno aumento na banda de  $1740\text{ cm}^{-1}$  após a hidrólise, indicando uma maior presença de carbonilas livres, que deve ser proveniente dos terminais redutores formados após o ataque enzimático. Já a banda de  $1649\text{ cm}^{-1}$ , teve sua intensidade diminuída quando comparada com a banda de  $1448\text{ cm}^{-1}$ . Como já relatado, esta banda é característica de ligações  $\beta$ -glucosídicas (BODÍRLÄU; TEACÁ, 2009) e, portanto, esta diminuição está associada ao ataque enzimático que atua nestas ligações. É possível observar também no bagaço hidrolisado, uma pequena diminuição de intensidade da banda de  $800\text{ cm}^{-1}$  que está relacionada com o estiramento C-H fora do plano dos anéis aromáticos da lignina (siringila, guaiacila, e hidroxifenila), o que sugere ter uma diminuição destes anéis aromáticos (MARABEZI, 2009).

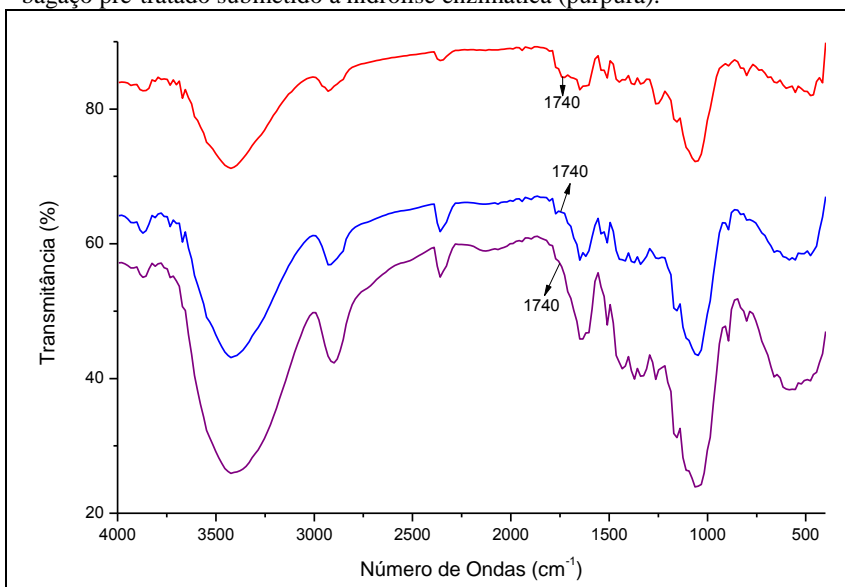
Figura 27 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço hidrolisado (púrpura).



A Figura 28 apresenta os espectros de FTIR para amostras pré-tratadas com peróxido de hidrogênio alcalino e após a hidrólise enzimática. As amostras pré-tratadas e hidrolisadas não apresentaram mudanças significativas em comparação à amostra do bagaço. É possível identi-

car apenas uma leve mudança de intensidade de algumas bandas, nas quais, não se pode afirmar uma diminuição real destes componentes, pois pode estar relacionada apenas com a homogeneidade e concentração no preparo das pastilhas de KBr. No entanto, é possível observar que a banda formada na região de  $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$  começa a reduzir sua intensidade após o pré-tratamento alcalino e some quase que totalmente após a hidrólise enzimática. Como visto anteriormente, esta região é responsável pelo estiramento das carbonilas ( $\text{C}=\text{O}$  conjugada), e uma diminuição destes grupamentos pode ser indício da diminuição de xilanas que compõe a hemicelulose (BODÍRLÄU; TEACÁ, 2009; YOON et al., 2012).

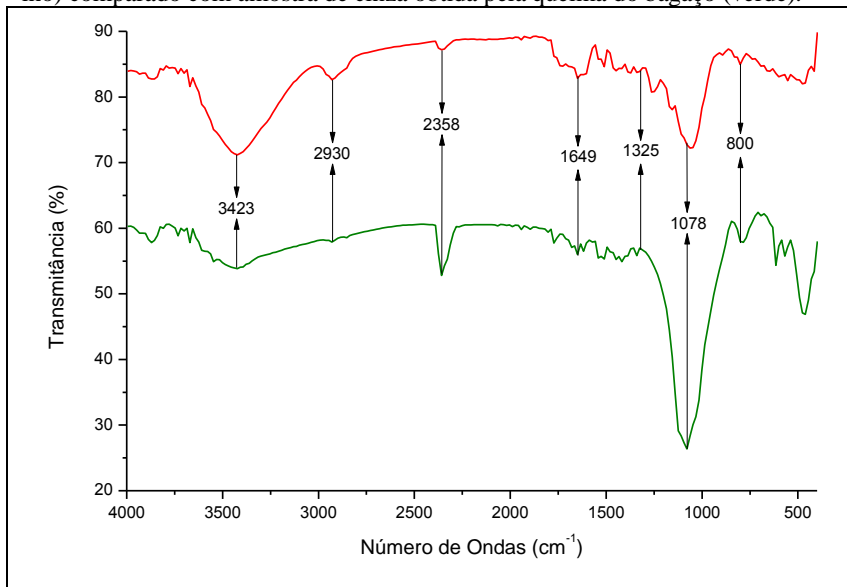
Figura 28 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço pré-tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  alcalino (azul) e com o bagaço pré-tratado submetido à hidrólise enzimática (púrpura).



A partir da comparação dos espectros do bagaço com as cinzas provenientes do bagaço (Figura 29), é possível ver algumas mudanças significativas, como uma grande diminuição da banda de estiramento O-H. ( $3423\text{ cm}^{-1}$ ), e o desaparecimento da banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$ , que indica a presença de grupos metil e metileno, além disso, um aumento significativo da banda de estiramento assimétrico do  $\text{CO}_2$  ( $2358\text{ cm}^{-1}$ ). Na região de  $1750\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  a amostra de cinzas apresenta uma quanti-

dade bem inferior de bandas. Esse tipo de modificação está associado ao processo de combustão que praticamente volatilizou quase que toda matéria orgânica presente (PAULA, 2006; PITA, 2009). É possível também observar que a banda em  $1078\text{ cm}^{-1}$ , que é responsável pelas deformações do C-H e C-O, aumenta muito a sua intensidade indicando que restou praticamente só compostos saturados. A região entre  $800$  e  $400\text{ cm}^{-1}$  no espectro das cinzas apresenta diversas bandas intensas, as quais indicam compostos de silício (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000), sendo que segundo Paula (2006) e Belini et al. (2012), a cinza do bagaço da cana-de-açúcar é composta predominantemente por dióxido de silício.

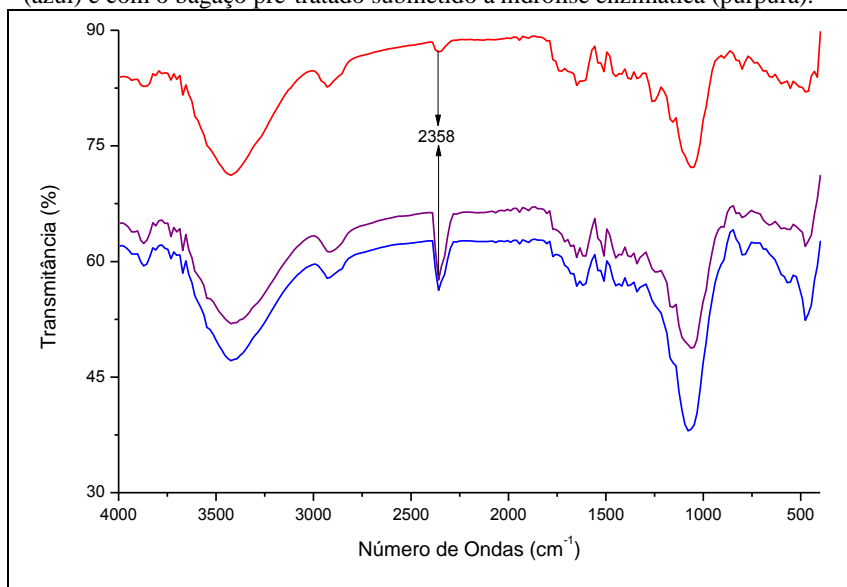
Figura 29 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com amostra de cinza obtida pela queima do bagaço (verde).



São apresentados na Figura 30 os espectros de FTIR para amostras pré-tratadas com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas e após a hidrólise enzimática deste pré-tratamento. As amostras pré-tratadas e hidrolisadas não apresentaram mudanças significativas em comparação à amostra do bagaço. É possível observar apenas que a amostra pré-tratada apresenta um comportamento um pouco diferenciado do bagaço e da amostra hidrolisada pelas enzimas. No entanto, é possível identificar que este comportamento é determinado pela influência das cinzas adicionadas para o pré-tratamento. Como por exemplo,

entre  $900 - 400 \text{ cm}^{-1}$  é possível verificar uma grande variação dos picos quando comparado o bagaço com o bagaço pré-tratado e hidrolisado, no entanto, estas mudanças são dadas pela presença das cinzas junto ao bagaço, incorporando características de compostos de silício. Como após a etapa de hidrólise parte desta cinza se perdeu, diminuindo a concentração, os traços possuem uma menor intensidade. Salvo a banda de estiramento assimétrico do  $\text{CO}_2$  ( $2358 \text{ cm}^{-1}$ ) que aumentou a sua intensidade após o pré-tratamento e continuou a aumentar na etapa de hidrólise. Como visto anteriormente (Figura 29), a banda de  $\text{CO}_2$  é característica na amostra de cinza.

Figura 30 - Espectro de FTIR da amostra de bagaço da cana-de-açúcar (vermelho) comparado com bagaço pré-tratado com  $\text{H}_2\text{O}_2$  suplementado com cinzas (azul) e com o bagaço pré-tratado submetido à hidrólise enzimática (púrpura).



Desta forma é possível observar que ambos os pré-tratamentos aplicados (peróxido de hidrogênio alcalino e peróxido de hidrogênio com cinzas) não apresentaram uma função que viesse a modificar significativamente a estrutura química do bagaço. Apenas leves modificações de intensidade e ausência da banda de carbonilas livres ( $\text{C}=\text{O}$  conjugada) relacionada com a da diminuição de xilanas que compõe a hemicelulose, no caso do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

#### 4.5.4 Caracterização morfológica

A análise de MEV do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (Figura 31) revela que o pré-tratamento induziu alterações físicas na superfície do bagaço. O bagaço não tratado apresenta fibras consistentes e lisas (Figura 31 – A e B), quase que intactas. Já o bagaço pré-tratado apresenta a superfície de suas fibras fragmentadas, as quais vistas com maior proximidade pode-se notar alguns frisos e uma maior ocorrência de pequenas fissuras (Figura 31 – C e D), provavelmente expostos pela remoção da lignina. E por fim o bagaço hidrolisado apresenta as fibras desfiadas em unidades menores - microfibrilas, uma aproximação nestas fibras revela uma grande ocorrência de fissuras (Figura 31 – E e F), criando uma superfície que se assemelha a uma rede. Portanto, a partir destas micrografias é possível ver que o pré-tratamento contribuiu para uma desorganização física das fibras, proporcionando uma maior acessibilidade para as enzimas. Observações semelhantes em micrografias de pré-tratamento de bagaço da cana-de-açúcar foram obtidas após a aplicação de ácido fórmico (SINDHU et al., 2010) e de pré-tratamentos com SO<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> (CORRALES et al., 2012).

A análise de MEV do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas (Figura 32) revela que o pré-tratamento induziu alterações físicas na sua superfície. Como já relatado, o bagaço não tratado apresenta fibras consistentes, que se encontram lisas, quase que intactas. O bagaço pré-tratado apresenta sua superfície desorganizada e com a presença de pequenos fragmentos na cor branca sobre as estruturas lignocelulósicas, os quais são as cinzas utilizadas no pré-tratamento. É possível ver a evolução de um aglomerado, que quando passa pelo pré-tratamento deixa a estrutura parcialmente desorganizada, e após a hidrólise enzimática, este aglomerado é praticamente desfeito.



Figura 31 - Micrografia do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. A e B – Bagaço sem tratamento. C e D - Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino. E e F – Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino e submetido à hidrólise enzimática.

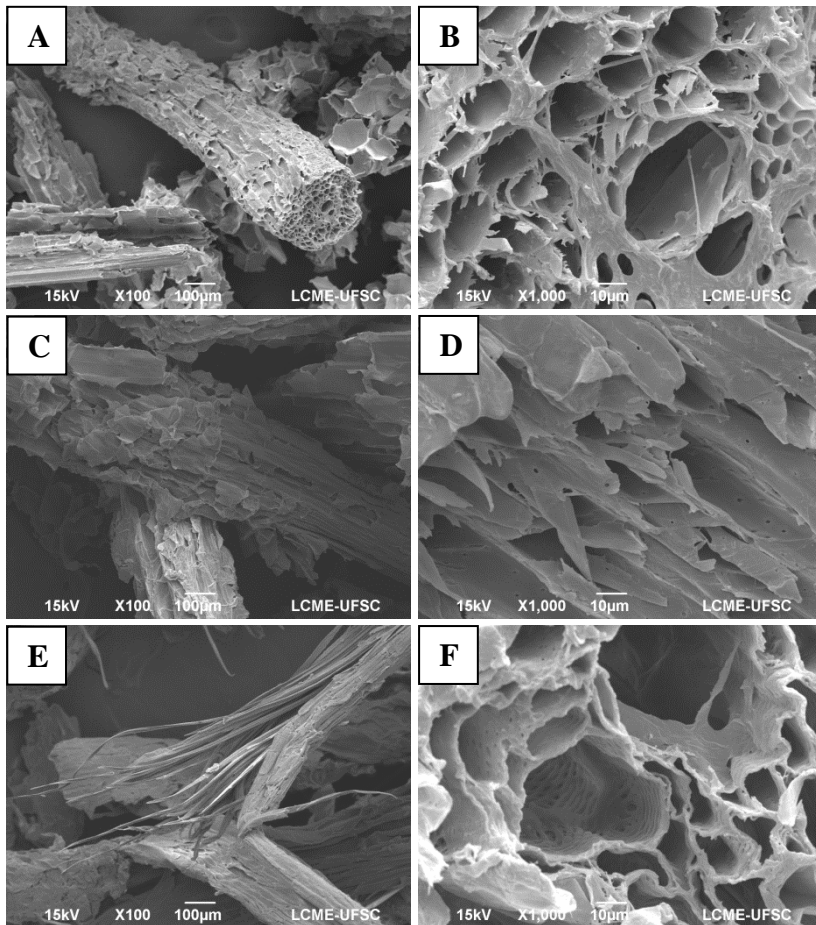
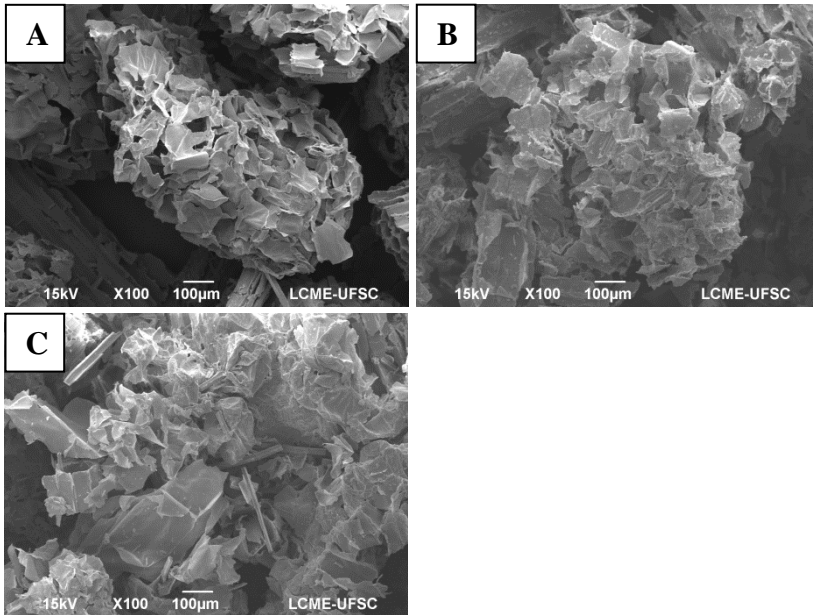


Figura 32 - Micrografia do bagaço da cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas. A – Bagaço sem tratamento. B - Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas. C – Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas submetido à hidrólise enzimática.



Comparando as micrografias dos dois pré-tratamentos (Figuras 31 e 32), observa-se que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é mais agressivo, e apresenta uma maior desorganização das fibras lignocelulósicas. No entanto, a forma em que as fibras do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino estão dispostas se assemelha muito com a forma em que o bagaço tratado com NaOH se encontra (REZENDE et al., 2011). Isto reforça a hipótese de que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, é basicamente um tratamento caustico e oxidativo, sofrendo as mesmas consequências dos tratamentos cáusticos com bases fortes, gerando resíduos de forte agressividade frente aos materiais lignocelulósicos pré-tratados, o que ocasiona a perda de carboidratos com parcial degradação de hemicelulose (MONTE; BRIENZO; MILAGRES, 2011).

#### 4.5.5 Considerações finais

O pré-tratamento com  $H_2O_2$  e cinzas quando comparado com o pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino, apresenta um rendimento um pouco inferior de açúcares redutores, no entanto, apresenta o mesmo rendimento de glucose após a hidrólise enzimática. Como o procedimento de quantificação de glucose apresenta maior precisão, é possível afirmar que ambos pré-tratamentos possuem a mesma eficiência em tratar o bagaço da cana-de-açúcar para posterior hidrólise enzimática.

Através de análises de composição química, é possível observar que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino se demonstrou mais eficiente na remoção da lignina que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  e cinzas, no entanto, este pré-tratamento degradou uma maior quantidade de hemicelulose, apresentando um desperdício de carboidratos. As análises de identificação de estruturas químicas não apresentaram modificações significativas nos grupos funcionais para os pré-tratamentos avaliados. Todavia, a partir de uma caracterização morfológica foi possível identificar uma leve desorganização nas fibras de bagaço após ambos pré-tratamentos, sendo que no pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino a desorganização foi mais intensa.

A partir do conjunto de resultados comparativos é possível verificar que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  e cinzas se apresenta menos agressivo e opera em condições mais amenas de pH do que o pré-tratamento com  $H_2O_2$  alcalino, mantendo a mesma eficiência.



## CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

---

Do trabalho aqui desenvolvido e exposto anteriormente, pode-se obter as conclusões apresentadas a seguir.

A formulação de enzimas utilizadas para etapa de hidrólise enzimática deste trabalho apresentaram todas as celulasas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glucosidase) com uma atividade ótima na mesma condição de temperatura (45°C) e pH (4,0).

Referente ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, a concentração de peróxido de hidrogênio e a temperatura influenciam no processo, enquanto que a agitação não apresenta influência. O tempo de reação também apresenta influência no processo de pré-tratamento, sendo que um tempo reduzido ou excessivo pode prejudicar o processo. A partir do modelo obtido das condições testadas, 9,39% (v/v)  $H_2O_2$ , 46°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 40 minutos permitem obter o maior rendimento de açúcares redutores após hidrólise enzimática. Este pré-tratamento é um método eficiente para remoção de lignina do bagaço da cana-de-açúcar. Além disso, uma combinação de alta concentração de  $H_2O_2$  e temperatura de 60°C durante o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino favorece a formação de uma placa, tornando o bagaço da cana-de-açúcar pouco susceptível à hidrólise enzimática.

No pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas, utilizando planejamento experimental, pode-se observar que a variável que exerce maior influência foi a concentração de cinzas. A partir do modelo obtido das condições testadas, 6,32% (v/v)  $H_2O_2$ , 3,40% (p/v) cinzas, 60°C de temperatura e agitação de 1,67 Hz por um período reacional de 2 horas permitem obter o maior rendimento de açúcares redutores após hidrólise. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas é um meio eficiente de tornar o bagaço da cana-açúcar mais susceptível à sacarificação enzimática. Este pré-tratamento apresenta após a hidrólise enzimática um bom rendimento de açúcares redutores e uma concentração de glucose igual ao pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. E ainda, apresenta condições favoráveis de consumir menor quantidade de reagentes e trabalhar em condições de pH mais ameno, quando comparado com o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio suplementado com cinzas e peróxido de hidrogênio alcalino praticamente não ocasionaram modificações químicas no bagaço de modo a serem perceptíveis na es-

pectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier. No entanto, apresentaram uma leve desorganização física nas fibras do bagaço, as quais puderam ser observadas via microscopia eletrônica de varredura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABDEL-NABY, M.; OSMAN, M.; ABDEL-FATTAH, A. Purification and properties of three cellobiases from *aspergillus niger* a20. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 76, n. 1, p. 33-44, 1999/01/01 1999.

AGUIAR, C. M. D. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *aspergillus niger***. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado) Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

ALMEIDA, M. N. **Celulasas e hemicelulasas de espécies de *acremonium* endofíticos**. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, 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, 2010.

AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass: A review. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 277-299, 2001.

ARANTES, V.; MILAGRES, A. M. F. Relevância de compostos de baixa massa molar produzidos por fungos e envolvidos na biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 1586-1595, 2009.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, n. 11, p. 2273-2282, 2009.

BELINI, U. L.; TOMAZELLO FILHO, M.; MENDES, L. M.; LEITE, M. K.; LIMA, P. M. R. D. Teor de sílica em compósitos confeccionados com bagaço de cana-de-açúcar e eucalipto. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 2, p. 250-255, 2012.

BETANCUR, G. J. V.; JUNIOR, N. P. **Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part ii: Hemicellulose hydrolysate fermentability.** ed., 2010.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JR., N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part i: Diluted acid pretreatment optimization. **Electronic Journal of Biotechnology** v. 13, n. 3, may 2010.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3–4, p. 583-620, 1997.

BNDES; CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar : Energia para o desenvolvimento sustentável.** ed., Rio de Janeiro: BNDES. 316 p. 2008.

BODÎRLĂU, R.; TEACĂ, C. A. Fourier transform infrared spectroscopy and thermal analysis of lignocellulose fillers treated with organic anhydrides. **Romanian Journal of Physics**, v. 54, n. 1-2, p. 93-104, 2009.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar: Álcool e açúcar na história e no desenvolvimento social do brasil.** ed., Brasília: Horizonte editora. 1985.

BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry.** ed., Interscience Publishers. 1967.

BYKOV, I. **Characterization of natural and technical lignins using ftir spectroscopy.** 2008. Master's Thesis (Master) Department of Chemical Engineering and Geosciences, Luleå University of Technology, Luleå, Suécia, 2008.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o statistica.** 1 ed., E-papers. 260 p. 2003.



CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CIOLACU, D.; CIOLACU, F.; POPA, V. I. Amorphous cellulose - structure and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 45, n. 1-2, p. 13-21, Jan-Feb 2011.

COLOM, X.; CARRILLO, F.; NOGUES, F.; GARRIGA, P. Structural analysis of photodegraded wood by means of ftir spectroscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 3, p. 543-549, Jun 2003.

CORRALES, R.; MENDES, F. M. T.; PERRONE, C. C.; SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; ABUD, Y.; BON, E. P. D.; FERREIRA-LEITAO, V. Structural evaluation of sugar cane bagasse steam pretreated in the presence of co<sub>2</sub> and so<sub>2</sub>. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, May 2012.

CRESTINI, C.; CRUCIANELLI, M.; ORLANDI, M.; SALADINO, R. Oxidative strategies in lignin chemistry: A new environmental friendly approach for the functionalisation of lignin and lignocellulosic fibers. **Catalysis Today**, v. 156, n. 1-2, p. 8-22, 2010.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. **Taxonomy and evolution**. In: HEINZ, D. J. Sugarcane improvement through breeding. Netherlands: Elsevier Amsterdam. p. 7-84. 1987.

DEKKER, R. F. H. Kinetic, inhibition and stability properties of a commercial  $\beta$ -d-glucosidase (cellobiase) preparation from aspergillus niger and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology Bioengineering**, n. 28, p. 1438-1442, 1986.

ERIKSSON, L. **Design of experiments: Principles and applications**. ed., Sweden: Umetrics Academy. 2008.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions.** ed., Berlin: Walter de Gruyter. 613 p. 2003.

FERNANDES, D. M. **Estudo da estabilidade térmica de blendas de poli(álcool vinílico)/lignina modificada.** 2005. 151 f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

FERREIRA, V. **Produção de  $\beta$ -glucosidase em saccharomyces cerevisiae recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração.** 2010. 132 f. Tese (Doutorado) Escola de Química, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat: Production sugar cane.** 2012. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/>. Acesso em: 08 ago 2012.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Appl. Chem.**, n. 59, p. 257-268, 1987.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: Método klason modificado. **O Papel**, v. 47, n. 8, p. 36-38, 1986.

GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 1, p. 46-52, 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, n. 3, p. 225-231, 1985.

GOULD, J. M.; JASBERG, B. K.; FAHEY, G. C.; BERGER, L. L. Treatment of wheat straw with alkaline hydrogen peroxide in a modified extruder. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, n. 2, p. 233-236, 1989.

HAN, S. O.; YUKAWA, H.; INUI, M.; DOI, R. H. Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *clostridium cellulovorans*. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 20, p. 6067-6075, October 2003.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HURST, P. L.; NIELSEN, J.; SULLIVAN, P. A.; SHEPHERD, M. G. Purification and properties of a cellulase from aspergillus niger. **The Biochemical journal**, v. 165, n. 1, p. 33-41, 1977.

JEFFRIES, T. W. **Biodegradation of lignin and hemicelluloses**. In: RATLEDGE, C. Biochemistry of microbial degradation. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 233-277. 1994.

KARAGÖZ, P.; ROCHA, I. V.; ÖZKAN, M.; ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and co-fermentation. **Bioresource Technology**, v. 104, n. 0, p. 349-357, 2012.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 1081-1099, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed., New York: W.H. Freeman & Company. 2008.

LIMA, A. O.; DAVIS, D. F.; SWIATEK, G.; MCCARTHY, J. K.; YERNOOL, D.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; EVELEIGH, D. E. Evaluation of gfp tag as a screening reporter in directed evolution of a hyperthermophilic beta-glucosidase. **Molecular biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 205-215, 2009.

LIMA, A. O. S.; QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI, W., JR.; ARAÚJO, W. L.;

SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a  $\beta$ -1,4-endoglucanase from an endophytic bacillus pumilus strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 57-65, 2005/07/01 2005.

LIMA, A. O. S.; RODRIGUES, A. L. Sacarificação de resíduos celulósicos com bactérias recombinantes como estratégia para redução do efeito estufa. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 5-18, 2007.

LUCAS, M.; HANSON, S. K.; WAGNER, G. L.; KIMBALL, D. B.; RECTOR, K. D. Evidence for room temperature delignification of wood using hydrogen peroxide and manganese acetate as a catalyst. **Bioresource Technology**, v. 119, n. 0, p. 174-180, 2012.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, september 2002.

LYND, L. R.; WYMAN, C. E.; GERNGROSS, T. U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

LYND, L. R.; ZYL, W. H. V.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577-583, 2005.

MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com reagentes químicos e pressão de vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1196-1204, 2000.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 142 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARTÍNEZ-HUITLE, C. A.; BRILLAS, E. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical

methods: A general review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 87, n. 3–4, p. 105-145, 2009.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulósico de penicillium echinulatum**. 2005. 121 f. Dissertação (Mestrado em química) Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATTOS, I. L. D.; SHIRAIISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R. Peróxido de hidrogênio: Importância e determinação. **Química Nova**, v. 26, p. 373-380, 2003.

MCALOON, A.; TAYLOR, F.; YEE, W.; IBSEN, K.; WOOLEY, R. **Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks**. Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2000. Disponível em:<[http://www.agmrc.org/media/cms/16\\_5299EA3DD888C.pdf](http://www.agmrc.org/media/cms/16_5299EA3DD888C.pdf)>.

MCDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, D.; WEYERS, J. D. B.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: Botany, chemistry and processing for industrial use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n. 31, p. 426-428, 1959.

MONTE, J. R.; BRIENZO, M.; MILAGRES, A. M. F. Utilization of pineapple stem juice to enhance enzyme-hydrolytic efficiency for sugarcane bagasse after an optimized pre-treatment with alkaline peroxide. **Applied Energy**, v. 88, n. 1, p. 403-408, Jan 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 5 ed., New Delhi: Wiley India Pvt. Limited. 696 p. 2006.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. D. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. 1ª ed., Campina Grande: Embrapa Algodão. 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NETO, O. B. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2º geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1º geração)**. 2009. 137 f. Dissertação (Mestrado) Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ODISI, E. J.; SILVESTRIN, M. B.; TAKAHASHI, R. Y. U.; DA SILVA, M. A. C.; LIMA, A. O. D. S. Bioprospection of cellulolytic and lipolytic south atlantic deep-sea bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 18-18, 2012.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

OGUNSILE, B. O.; QUINTANA, G. Modeling of soda - ethanol pulps from *carpolobia lutea*. **BioResources**, v. 5, n. 4, p. 2417-2430, 2010.

OKADA, G. Purification and properties of a cellulase from *aspergillus niger*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1257 - 1265, 1985.

OWEN, N. L.; THOMAS, D. W. Infrared studies of hard and soft woods. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 3, p. 451-455, Mar-Apr 1989.

PARRY, N. J.; BEEVER, D. E.; OWEN, E.; VANDENBERGHE, I.; VAN BEEUMEN, J.; BHAT, M. K. Biochemical characterization and mechanism of action of a thermostable beta-glucosidase purified from *thermoascus aurantiacus*. **Biochem. J.**, v. 353, n. 1, p. 117-127, 2001.

PAULA, M. O. D. **Potencial da cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento portland**. 2006. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de viçosa, Viçosa, 2006.

PINTO, R. S. D. A. **Indicadores de desempenho de frota de empresas agroindustriais canavieiras brasileiras**. 2002. 110 f. Dissertação

(mestrado) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PITA, P. V. V. **Valorização agrícola de cinza da co-combustão de bagaço de cana-de-açúcar e biomassa lenhosa**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha de cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado) Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

QUADRI, M. G. N.; ODISI, E. J.; LIMA, A. O. S. **Método de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares monoméricos**. Brasil. Pedido de Patente, n. BR 10 2012 029518, 2012.

RABELO, S.; FILHO, R.; COSTA, A. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 144, n. 1, p. 87-100, 2008.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Lorena, 2007.

RABELO, S. C.; AMEZQUITA FONSECA, N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600-2607, 2011.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

RANA, R.; LANGENFELD-HEYSER, R.; FINKELDEY, R.; POLLE, A. FTIR spectroscopy, chemical and histochemical characterisation of wood and lignin of five tropical timber wood species of the family dipterocarpaceae. **Wood Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 225-242, May 2010.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases: Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, p. 140-143, 1998.

REZENDE, C. A.; DE LIMA, M. A.; MAZIERO, P.; DEAZEVEDO, E. R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV, I. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, p. 1-18, Nov 2011.

SAIKIA, C. N.; ALI, F.; GOSWAMI, T.; GHOSH, A. C. Esterification of high  $\alpha$ -cellulose extracted from hibiscus cannabinus L. **Industrial Crops and Products**, v. 4, n. 4, p. 233-239, 1995.

SALIBA, E. D. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. D.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, p. 917-928, 2001.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of gh family 12 cellulases: Improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, n. 3, p. 246-291, 2005.

SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos. 2000.



SINDHU, R.; BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; JANU, K.; SAJNA, K.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.; PANDEY, A. Formic acid as a potential pretreatment agent for the conversion of sugarcane bagasse to bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2313-2323, 2010/12/01 2010.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAKAGI, M. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in presence of manganese compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 2, p. 165-170, 1987.

Technical Association of the Pulp and Paper IndustryTAPPI. **Preparation of wood for chemical analysis**. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 1997.

Technical Association of the Pulp and Paper IndustryTAPPI. **Ash in wood, pulp paper and paperboard: Combustion at 525°C**. Technical Association of the Pulp and Paper Industry, 2012.

TIETZ, N. W. **Clinical guide to laboratory tests**. 4 ed., Ed. Saunders. 2006.

WYMAN, C. E. **Handbook on bioethanol: Production and utilization**. 1<sup>a</sup> ed., Washington D.C.: Taylor & Francis. 442 p. 1996.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 24, p. 189-226, 1999.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 2, n. 1, p. 26-40, 2008.

YOON, L. W.; ANG, T. N.; NGOH, G. C.; CHUA, A. S. M. Regression analysis on ionic liquid pretreatment of sugarcane bagasse and assessment of structural changes. **Biomass and Bioenergy**, v. 36, n. 0, p. 160-169, 2012.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods†. **Energy & Fuels**, v. 22, n. 1, p. 46-60, 2008/01/01 2007.

ZANIN, G.; SANTANA, C.; BON, E.; GIORDANO, R.; DE MORAES, F.; ANDRIETTA, S.; NETO, C.; MACEDO, I.; LAHR FO, D.; RAMOS, L.; FONTANA, J. Brazilian bioethanol program. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1, p. 1147-1161, 2000.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.


ZHANG, Y. H. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part i: The chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

## ANEXOS

### Anexo 1 – Comprovante do depósito do pedido de patente “Método de pré-tratamento e hidrólise de materiais lignocelulósicos para obtenção de açúcares monoméricos”

<b>&lt; Uso exclusivo do INPI &gt;</b>	
 <p>INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTEÇÃO DE PATENTES</p> <p>Vídeo: 017120001436 21/11/2012 11-02 RESC</p>  <p>BR 10 2012 029518 0</p> <p>Espaço reservado ao protocolo</p>	Espaço para etiqueta
<b>DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO</b>	
<b>Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:</b>	
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas	
<b>1. Depositante (71):</b>	
1.1	Nome: Universidade Federal de Santa Catarina
1.2	Qualificação: Instituição de Ensino e Pesquisa
1.3	CNPJ/CPF: 83899526000182
1.4	Endereço Completo: Campus Universitário, S/Nº, Cx. Postal 476, Trindade
1.5	CEP: 88040-900
1.6	Telefone: 48 3721-9628
1.7	Fax:
1.8	E-mail: dit@reitoria.ufsc.br
<input type="checkbox"/> continua em folha anexa	
<b>2. Natureza:</b> <input checked="" type="radio"/> Invenção <input type="radio"/> Modelo de Utilidade <input type="radio"/> Certificado de Adição	
Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção	
<b>3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):</b>	
MÉTODO DE PRÉ-TRATAMENTO E HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS PARA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES MONOMÉRICOS	