

Olavo Micali Perrone

**Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado
com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico
por hidrólise enzimática**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista —Julio de Mesquita Filho, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto
2015

Perrone, Olavo Micali.

Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática / Olavo Micali Perrone. -- São José do Rio Preto, 2015

65 f. : il., tabs.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química. 2. Hidrólise. 3. Bagaço de cana. 4. Ozonólise. 5. Ultrassom. 6. Microondas. 7. Etanol celulósico. I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15.03

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Olavo Micali Perrone

Avaliação térmica e estrutural do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com ozônio, ultrassom e micro-ondas para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista —Julio de Mesquita Filho, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Roberto da Silva

UNESP- São José do Rio Preto – SP

Orientador

Prof. Dr. Diogo Paschoalini Volanti

UNESP- São José do Rio Preto – SP

Prof. Dr. Michel Brienzo

IPBEN - UNESP- Rio Claro – SP

São José do Rio Preto
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao orientador Professor Dr. Roberto da Silva, pelo entusiasmo, apoio, pelos ensinamentos e incentivo.

Ao professor Dr. Mauricio por todo apoio, ensinamentos e incentivos.

Aos meus pais, irmãos e avós, que sempre estiveram ao meu lado.

A minha namorada Lívia, pelo apoio e incentivo.

Aos meus amigos Airton, Bruno.

Aos meus amigos de laboratório: Marcelo, Pedro, Junior, Lúcio, Janaína, Adônis, Jéssika, Márcia, Ariane, Diego, Dani, Sidnei, Christiane e a todos que estiveram presentes durante esta etapa.

Ao Felipe pela disposição, apoio e ajuda em todos os momentos.

A todos os professores e técnicos do departamento de Química e Ciências que fizeram parte deste projeto.

À FAPESP pela bolsa de mestrado, Processo 2013/06234-3.

RESUMO

No Brasil o etanol é obtido principalmente a partir da cana de açúcar, a fibra do bagaço de cana é composta principalmente por lignina, celulose e hemicelulose, sendo possível produzir etanol celulósico a partir da sacarificação da celulose presente nessa fibra. Para se chegar ao etanol celulósico por hidrólise enzimática são necessárias pelo menos quatro etapas, sendo elas: o pré-tratamento; a hidrólise enzimática; a fermentação alcoólica dos açúcares e a destilação para a obtenção do etanol celulósico. Neste contexto o foco deste trabalho foi promover o pré-tratamento do bagaço utilizando ultrassom, micro-ondas e ozônio, a fim de, encontrar o melhor tratamento para modificação desta fibra, visando o aumento do rendimento enzimático. Após o tratamento a fibra resultante foi utilizada na hidrólise enzimática, caracterização química e avaliada térmica e estruturalmente pelas técnicas de TGA (termogravimetria), FTIR-ATR (espectroscopia no infravermelho), HPLC (cromatografia líquida), MEV, MET (microscopia eletrônica de varredura e transmissão) e DRX (difratometria de raios X). Os resultados obtidos por estas análises foram comparados ao rendimento da hidrólise enzimática e ao teor de compostos inibidores da fermentação alcoólica. Com a utilização do FTIR-ATR foi possível visualizar o efeito dos tratamentos nas diversas regiões da fibra e comprovar a redução da lignina. A partir da análise térmica por TGA foi possível observar que a maior estabilidade térmica das amostras está amplamente relacionada ao grau de celulose presente na fibra após o tratamento, com a análise por DRX foi possível determinar que a celulose cristalina não é afetada durante o pré-tratamento. A microscopia eletrônica de varredura permitiu observar as modificações causadas na superfície da fibra após os tratamentos, enquanto a microscopia eletrônica de transmissão permitiu observar que a parede celular secundária é a mais afetada pelo tratamento por ozônio. Tratamentos com ozônio em meio alcalino apresentaram baixa quantidade de compostos inibidores e melhores rendimentos durante a hidrólise, principalmente quando assistido por ultrassom. Utilizando os dados da caracterização pode-se afirmar que a utilização do ultrassom intensifica a remoção de hemicelulose e as micro-ondas intensificam a remoção da lignina nas condições de meio alcalino e ozônio, o valor de glicose obtido após a hidrólise enzimática dos tratamentos nessas condições (O₃ + NaOH), representados pela Amostra 7, foi de 391±7 mg de glicose g⁻¹ de bagaço tratado, sendo esse valor 6 vezes maior que o obtido através do bagaço sem tratamento.

Palavras-chave: Ozonólise, etanol celulósico, bagaço de cana de açúcar, ultrassom, micro-ondas.

ABSTRACT

In Brazil ethanol is produced mainly from sugar cane, fiber sugarcane bagasse is mainly composed of lignin, cellulose and hemicellulose, which can produce cellulosic ethanol from saccharification of cellulose present in this fiber. To get to cellulosic ethanol by enzymatic hydrolysis requires at least four stages: pre-treatment; enzymatic hydrolysis; alcoholic fermentation of the sugars and distillation for obtaining cellulosic ethanol. In this context the focus of this work was to pretreatment of bagasse using ultrasound, microwave and ozone in order to find the best treatment for modification of this fiber, to increase the enzyme yield. After treatment, the resulting fiber was used in enzymatic hydrolysis and chemical, thermal and structural analysis by the techniques: TGA (thermogravimetry), FTIR-ATR (infrared spectroscopy), HPLC (liquid chromatography), SEM, TEM (scanning electron microscopy and transmission) and XRD (X-ray diffraction). The results obtained by these analyzes were compared to the yield of the enzymatic hydrolysis and the content of alcoholic fermentation inhibiting compounds. With the use of FTIR-ATR was able to see the effect of the treatments in the various regions of the fiber and demonstrate the reduction of lignin. From the thermal analysis by TGA was observed that the higher thermal stability of the samples is largely related to the degree of the cellulose present in the fiber after treatment, with the XRD analysis it was determined that the crystalline cellulose is not affected during the pre-treatment. The scanning electron microscopy allowed observing the changes caused on the fiber surface after treatment, while the transmission electron microscopy allowed observing the secondary cell wall is the most affected by ozone treatment. Treatments with ozone in alkaline medium showed low amount of inhibiting compounds and better yields during hydrolysis, especially when assisted by ultrasound. Using the data of the characterization it can be stated that the use of the ultrasound enhances the removal of hemicellulose and microwave enhance the removal of lignin when in alkaline conditions and ozone treatment, the glucose value obtained after enzymatic hydrolysis of these treatment conditions (NaOH + O₃), represented by Sample 7, was 391 ± 7 mg of glucose by g⁻¹ of treated pulp, this value being 6 times greater than that obtained by untreated pulp.

Keywords: Ozonolysis, cellulosic ethanol, sugarcane bagasse, ultrasound, microwave.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Material lignocelulósico	9
Figura 2. Cadeia de celulose repetitiva, Microfibrila de celulose.	10
Figura 3. Estrutura da Lignina.....	11
Figura 4. Estrutura da parede celular vegetal.....	11
Figura 5. Tratamentos mais utilizados nas pesquisas.....	12
Figura 6. Estrutura química dos precursores monoméricos da lignina.	13
Figura 7. Híbridos de ressonância da molécula de ozônio.	13
Figura 8. Mecanismo de ação do ozônio em compostos aromáticos.	14
Figura 9. Mecanismo de ação do ozônio	14
Figura 10. Cadeia de reações que ocorrem durante a sonificação da água.	16
Figura 11. Três potenciais sítios de reações químicas em líquidos irradiados com ultrassom.....	16
Figura 12. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose.....	18
Figura 13. Representação esquemática de uma molécula de xilana.....	19
Figura 14. Espectro de <i>FTIR-ATR</i> do bagaço de cana <i>in natura</i>	21
Figura 15. Planejamento experimental dos pré-tratamentos e respectivas amostras.....	24
Figura 16. Aparelhagem utilizada nos pré-tratamentos.....	25
Figura 17. Montagem da coluna para a utilização de fluxo constante de ozônio em coluna.	25
Figura 18. Cálculo do índice de cristalinidade pelo método da intensidade dos picos.	29
Figura 19. Tempo de retenção em HPLC para arabinose, glicose e xilose.	30
Figura 20. Efeitos principais das variáveis na liberação de CFT após o pré-tratamento.	33
Figura 21. Efeitos principais das variáveis na quantificação de ART após o pré-tratamento.	34
Figura 22. Efeitos principais das variáveis, na quantificação de Glicose após a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com utilização do micro-ondas ultrassom.	37
Figura 23. Comparação entre teor de glicose obtido após hidrólise com teor de celulose e lignina obtido pela caracterização do bagaço tratado.	38
Figura 24. Espectros obtidos por <i>FTIR-ATR</i> do bagaço de cana tratado.	41
Figura 25. Espectros de <i>FTIR-ATR</i> das Amostras - 7, 11, 3 e bagaço sem tratamento.....	42
Figura 26. Espectros obtidos por <i>FTIR-ATR</i> do bagaço de cana tratado	43
Figura 27. Espectros obtidos por <i>FTIR-ATR</i> do bagaço de cana tratado..	44
Figura 28. TGA e DTG do bagaço sem tratamento, lignina e padrão de celulose.....	45
Figura 29. Termogramas de TGA e DTG das amostras 1, 2, 7 e 12.	46
Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	48
Figura 31. Glicose obtida após hidrólise enzimática de tratamentos em diferentes tempos de ozonólise.	50
Figura 32. Difractogramas de Raio-X de amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise.	55
Figura 33. Espectro de infravermelho para amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise.....	52
Figura 34. Caracterização química dos tratamentos de bagaço de cana de açúcar em diferentes tempos de ozonólise.....	53
Figura 35. Comparação entre teor de Glicose obtido após hidrólise com teor de celulose e lignina obtido pela caracterização química do bagaço tratado em diferentes tempos de ozonólise.	54
Figura 36. Eletromicrografia de varredura (MEV), amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise.	56
Figura 37. Eletromicrografia de transmissão (MET), amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teores de glicose, xilose e arabinose do hidrolisado e B.E.T. dos diferentes tamanhos de fibra.....	31
Tabela 2. Teor de ART e CFT após os tratamentos.	32
Tabela 3. Teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas no bagaço após os respectivos tratamentos.....	35
Tabela 4. Teor de glicose, xilose e arabinose quantificados por HPLC após a hidrólise enzimática com enzima comercial Prozyn [®] , nos diferentes tratamentos.....	36
Tabela 5. Principais bandas de absorção características de material lignoceluloso.	39
Tabela 6. Tabela de valores obtidos por TGA e DTG do bagaço sem tratamento (in natura) e de padrões de lignina e celulose.	46
Tabela 7. Tabela com dados obtidos por TGA e DTG para amostras com tempos variados de ozonólise.....	51
Tabela 8. Índice de cristalinidade calculado pelo método da intensidade dos picos.....	55

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1. <i>MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR</i>	9
2.2. <i>PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA</i>	12
2.2.1. Pré-tratamento com Ozônio	13
2.2.2. Pré-tratamento com Micro-ondas	15
2.2.3. Pré-tratamento com Ultrassom	15
2.2.4. Modificações no pH.....	17
2.3. <i>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</i>	17
2.4. <i>INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA</i>	19
2.5. <i>ANÁLISE TÉRMICA DO BAGAÇO TRATADO</i>	20
2.6. <i>ANÁLISE ESTRUTURAL DO BAGAÇO TRATADO</i>	21
2.6.1. Análise estrutural por FTIR-ATR.....	21
3. OBJETIVO GERAL	22
2.7. <i>METAS</i>	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. <i>PREPARO DO BAGAÇO E PADRONIZAÇÃO DO TAMANHO DA FIBRA</i>	23
4.2. <i>PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS PRÉ-TRATAMENTOS</i>	23
4.3. <i>PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO</i>	24
4.4. <i>ANÁLISE DE COMPOSTOS INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO E ART</i>	26
4.5. <i>QUANTIFICAÇÃO DO FLUXO DE OZÔNIO</i>	26
4.6. <i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO</i>	27
4.7. <i>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</i>	27
4.8. <i>ANÁLISE ESTRUTURAL DO BAGAÇO POR FTIR-ATR</i>	28
4.9. <i>PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPI ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)</i>	28
4.10. <i>PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)</i>	28
4.11. <i>ÍNDICE DE CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X</i>	29
4.12. <i>QUANTIFICAÇÃO, POR HPAEC-PAD, DO TEOR DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE LIBERADOS PELA AÇÃO ENZIMÁTICA</i>	29
4.13. <i>ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)</i>	30
4.14. <i>ÁREA SUPERFICIAL (B.E.T.)</i>	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. <i>VARIAÇÕES NO TAMANHO DA FIBRA</i>	31
5.2. <i>DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS INIBIDORES APÓS O PRÉ-TRATAMENTO</i>	31
5.3. <i>CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇUCAR APÓS O TRATAMENTO</i>	35
5.4. <i>HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO</i>	36
5.5. <i>ANÁLISE ESTRUTUTAL POR FTIR-ATR</i>	39
5.6. <i>ANÁLISE TÉRMICA POR TGA</i>	45
5.7. <i>MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA</i>	47
5.8. <i>UTILIZAÇÃO DA AMOSTRA 7 PARA ESTUDOS NA VARIAÇÃO NO TEMPO DE OZONÓLISE</i>	49
5.8.1. Hidrólise enzimática de tratamentos em diferentes tempos de ozonólise.....	50
5.8.2. Análise por TGA	51
5.8.3. Análise estrutural por FTIR-ATR para amostras com diferentes tempos de ozonólise... 52	
5.8.4. Caracterização química da fibra em diferentes tempos de ozonólise	53
5.8.5. Difração por Raios - X	54
5.8.6. Microscopia.....	56
6. CONCLUSÃO	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1. INTRODUÇÃO

No Brasil o primeiro grande investimento na indústria alcooleira foi durante a Segunda Guerra Mundial (1943), com a redução do fornecimento de gasolina devido à guerra, a produção de etanol foi aumentada, a fim de ser misturado com a gasolina para diminuir o custo do produto derivado do petróleo. Com o fim da guerra a produção de etanol entrou em crise devido ao baixo preço da gasolina, tendo seu novo auge apenas em 1975 com a criação do programa Pro-álcool, em resposta a crise do petróleo de 1973, inicialmente o etanol foi misturado à gasolina e depois utilizado em carros 100% movidos a etanol. No final da década de 80 ocorreu uma nova crise no setor alcooleiro, devido novamente ao baixo preço da gasolina e a falta de álcool no mercado, sendo necessária a sua importação.

Após quase duas décadas de pouco desenvolvimento, o etanol ressurgiu forte no início do século XXI com o surgimento de políticas verdes e a preocupação com o fim das reservas de petróleo, tendo seu grande auge com o desenvolvimento de carros bicompostíveis em 2003. Por volta de 2012 com a descoberta do pré-sal e a necessidade de importação, o etanol tem vivido uma fase de incerteza. Nesse cenário o etanol celulósico tem surgido como promessa para contornar a situação. Para o ano de 2014 está previsto para entrar em funcionamento duas usinas de etanol celulósico no Brasil, sendo a primeira, a unidade da GranBio em São Miguel dos Campos, em Alagoas, e a segunda da empresa Raízen em Piracicaba-SP, com produção anual estimada de 80 e 40 milhões de litros de etanol respectivamente (ZAPAROLLI, 2014).

Juntos Brasil e Estado Unidos da América são responsáveis por aproximadamente 83,1% da produção mundial de etanol (EIA, 2011). No Brasil o etanol é obtido principalmente a partir da cana de açúcar. Aproximadamente 80 litros de etanol podem ser produzidos para cada tonelada de cana colhida (MAPA, 2012), rendimento que exige uma área cultivada relativamente grande para manter o mercado abastecido. Após a extração do caldo de cana para produção de etanol, a fibra resultante (bagaço) torna-se um dos principais subprodutos da usina de açúcar e etanol. A fibra é constituída principalmente de material lignocelulósico e contém em sua estrutura aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000; PAULY; KEEGSTRA, 2008; TRAVAINI et al., 2013). Este material pode ser hidrolisado por enzimas para a produção de açúcares fermentescíveis. Entretanto o material lignocelulósico é altamente recalcitrante devido à presença de lignina, celulose cristalina e ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina dificultando o acesso das

enzimas ao substrato e reduzindo o rendimento da hidrólise, tornando o processo inviável (PANDEY et al., 2000; MOSIER et al., 2005). Neste cenário é necessário realizar o pré-tratamento do bagaço, a fim de alterar a estrutura do material lignocelulósico.

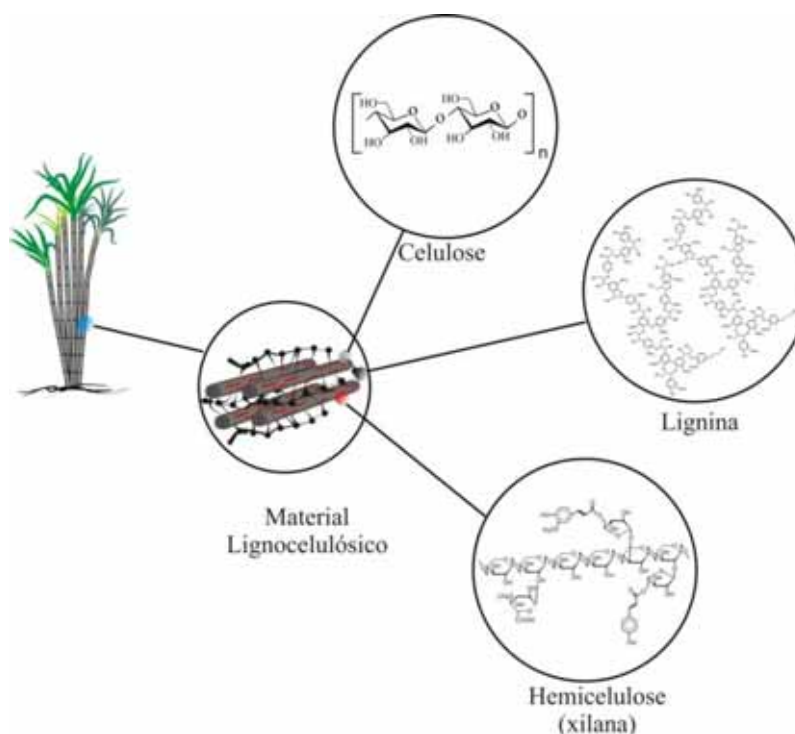
Um pré-tratamento ideal deve alterar a estrutura da fibra sem que ocorra a perda de carboidratos, aumentar o rendimento da hidrólise enzimática, não formar subprodutos que inibem a fermentação alcoólica, além de apresentar baixo custo (SUN; CHENG, 2002). O tratamento por ozônio tem sido relatado como sendo eficiente para desestruturação do material lignocelulósico do qual o bagaço de cana de açúcar é composto, o ozônio é altamente reativo com compostos que possuem ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons (GARCÍA-CUBERO et al., 2009). Portanto a lignina é o material mais provável de ser oxidado pela ação do ozônio devido principalmente a estrutura aromática de seus precursores e a grande quantidade de ligações duplas entre carbonos, uma vez que as principais vantagens da utilização de ozônio no tratamento é que a reação por ele empregada aparentemente não gera produtos que podem inibir a hidrólise ou fermentação alcoólica e as reações podem ser realizadas em temperatura e pressão ambiente (TRAVAINI et al., 2013). A irradiação por meio de ultrassom tem a capacidade de aumentar a área superficial do substrato por meio de um fenômeno conhecido como cavitação acústica (SUSLICK et al., 1986), o que facilita o acesso da enzima ao seu substrato aumentando a taxa de hidrólise. A irradiação por ultrassom tem sido empregado e testado em vários trabalhos com materiais lignocelulósicos (WOOD, 1997; LIU et al., 2007a; SUN et al., 2004a; VELMURUGAN; MUTHUKUMAR, 2011). A irradiação por micro-ondas tem a capacidade de elevar a temperatura das amostras em um curto tempo e desta forma desestabilizar o material lignocelulósico. Diversos trabalhos têm utilizado as micro-ondas no tratamento de materiais lignocelulósicos (ZHU et al., 2005; CHEN et al., 2011; OOSHIMA et al., 1984 ; BINOD et al., 2012; MORETTI et al., 2014). Um estudo utilizando essas três técnicas para o tratamento do bagaço de cana de açúcar ainda não foi relatado. Neste trabalho buscou-se realizar o tratamento do bagaço de cana de açúcar utilizando micro-ondas, ultrassom e ozônio em diferentes condições químicas, a fim de encontrar o melhor tratamento para o aumento do rendimento enzimático.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO E ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR

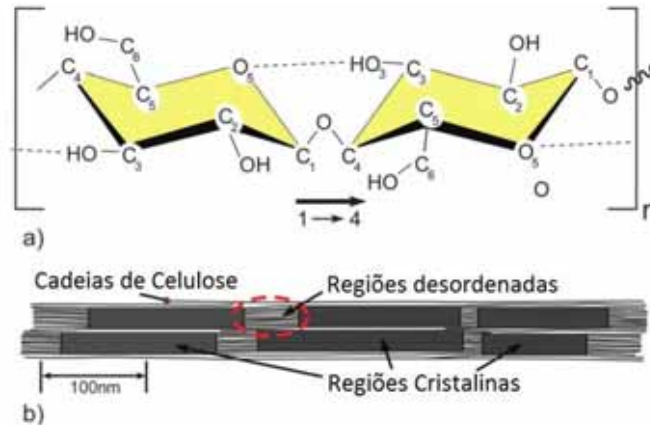
O material lignocelulósico é a matéria prima mais abundante no planeta para produção de combustíveis, é composta por três componentes principais, sendo eles: celulose, hemicelulose e lignina (Figura 1) (PAULY; KEEGSTRA, 2008; ZHANG, 2008; MOSIER et al., 2005). Tais componentes estão ligados entre si e dão sustentabilidade e resistência as plantas (ZHANG, 2008; LI et al., 2010). A biomassa geralmente é um resíduo de baixo valor, produzido como subproduto de vários setores industriais como. No Brasil o bagaço de cana de açúcar tem sido utilizado para produção de energia elétrica (PANDEY et al., 2000) e mais recentemente para a produção de etanol celulósico com a criação de novas usinas de produção de etanol celulósico (ZAPAROLLI, 2014).

Figura 1. Material lignocelulósico



A celulose é um polissacarídeo linear formado por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1→4) com aproximadamente 8.000 a 12.000 unidades de glicose, sendo o polímero mais abundante na natureza e um dos principais constituintes da parede celular vegetal (ARO et al., 2005) (Figura 2, a).

Figura 2. a) Simplex unidade de cadeia de celulose repetitiva, ligação β -1-4, ligações de hidrogênio intra-cadeiras (linhas tracejadas); b) Microfibrila de celulose exibindo as regiões amorfas e cristalinas.



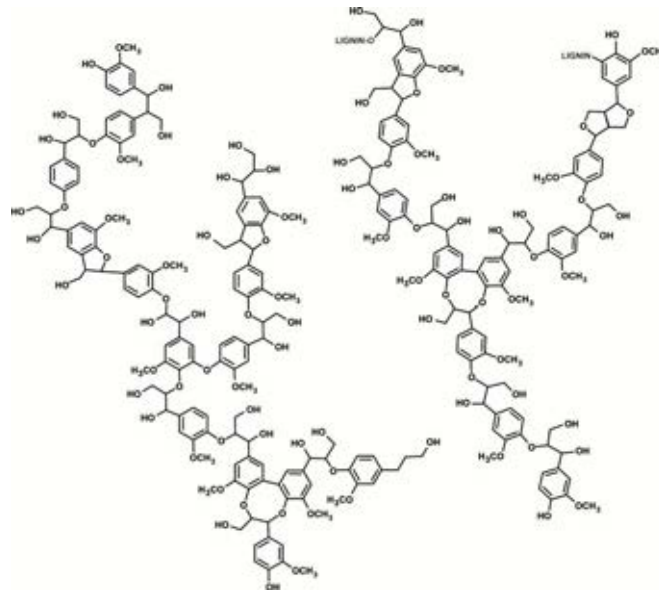
Fonte: (MOON et al., 2011)

A celulose pode ser classificada como cristalina ou amorfa (Figura 2, b). A celulose cristalina é formada a partir de cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio de forma organizada, esta organização nas ligações torna a celulose cristalina persistente e insolúvel, dificultando a penetração de água e enzimas, por outro lado, a celulose amorfa é menos organizada e mais solúvel, sendo mais fácil a sua degradação (ALIYU; HEPHER, 2000; POSTEK et al., 2011; MOON et al., 2011).

Já a hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, tendo uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares diferentes (ARO et al., 2005), podendo ser formada por pentoses (Figura 13) (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) ou ácidos urônicos (4-*O*-ácido metilglucurônico e ácido galacturônico) (RAMOS, 2003; EBRINGEROVA; HEINZE, 2000).

A lignina é um polímero complexo e insolúvel, ramificado por unidades de fenilpropanóides unidos por ligações carbono-carbono ou éter (Figura 3), que formam uma rede de ligações cruzadas no interior da parede celular (ARO et al., 2005) conferindo uma estrutura resistente ao impacto e ao ataque de micro-organismos, além de dificultar o acesso das enzimas. (TUOMELA et al., 2000; BARAKAT et al., 2015; MOSIER et al., 2005; ZHANG, 2008).

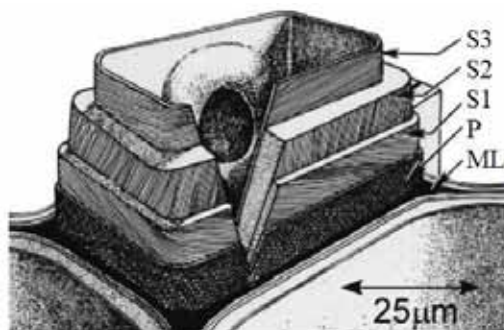
Figura 3. Estrutura da Lignina



Fonte: (CRESTINI et al., 2010)

A estrutura da parede celular é constituída por três componentes: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é o componente presente entre as células, rica em substâncias pécicas, situada entre paredes primárias de células vizinhas (Figura 4, ML), permitindo a união e a comunicação química entre tais células. As primeiras paredes a serem formadas são as paredes celulares primárias, são as mais externas e são produzidas durante o desenvolvimento da célula (Figura 4, P), variam em espessura e apresentam camadas distintas, tais paredes apresentam microfibrilas de celulose em sua composição que são resistentes a água e a degradação, em sua massa podem possuir 85% de polissacarídeos (hemicelulose, e pectinas) e 10% de proteínas (MCNEIL et al., 1984).

Figura 4. Estrutura da parede celular vegetal. ML – Lamela media P – parede celular primária, S1, S2 e S3- primeira segunda e terceira camada da parede celular secundaria.



Fonte: (POSTEK et al., 2011)

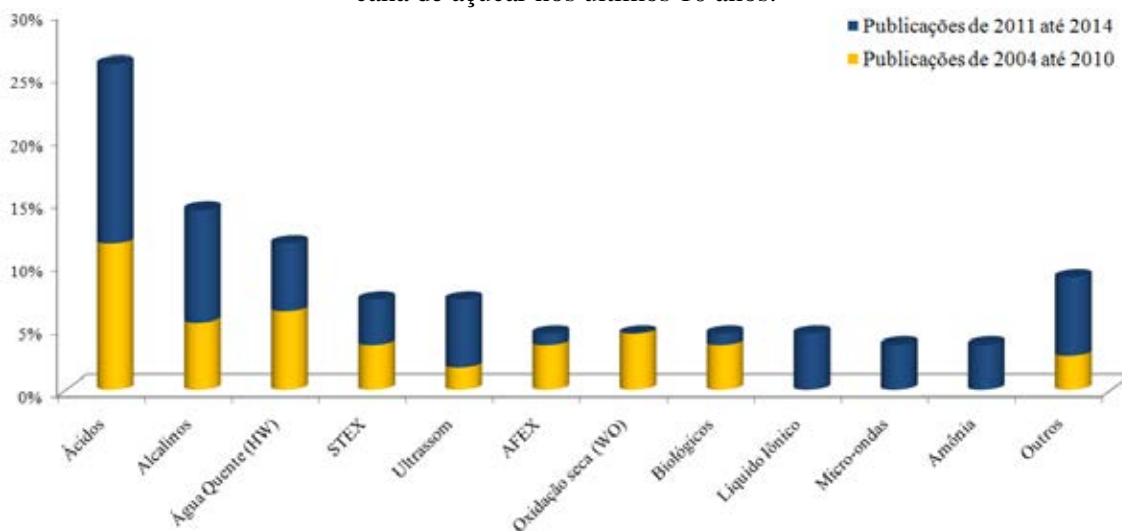
Paredes sintetizadas a partir de células que concluíram a fase de crescimento são conhecidas como paredes secundárias, tais paredes apresentam camadas múltiplas e contém em sua estrutura a lignina, sendo, portanto, mais rígida que a parede primária. A parede celular secundária pode apresentar até três camadas conhecidas como S1, S2 e S3 (Figura 4, S1, S2 e S3) (FENGEL; WEGNER, 1989; AGARWAL, 2006; PAULY; KEEGSTRA, 2008)

O material lignocelulósico é altamente recalcitrante devido à presença da celulose cristalina, lignina e das ligações cruzadas entre hemicelulose e lignina na parede celular vegetal (ZHANG, 2008; BLANCH; WILKE, 1982 apud LI et al., 2010).

2.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA

O propósito do pré-tratamento é alterar a estrutura do material lignocelulósico, a fim de facilitar o acesso da enzima ao seu substrato, o pré-tratamento deve resultar principalmente no aumento da superfície do substrato e/ou degradação da lignina (MOSIER et al., 2005). Um pré-tratamento ideal deve: 1) Alterar a estrutura da fibra sem que ocorra a perda de carboidratos; 2) Aumentar o rendimento da hidrólise enzimática; 3) Não deve formar subprodutos que inibem a fermentação alcoólica, 4) Possuir baixo custo (SUN; CHENG, 2002). Um levantamento com aproximadamente cem publicações, voltadas para o tratamento do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol celulósico, durante os últimos 10 anos, tem demonstrado que inúmeros métodos de tratamentos têm sido utilizados (Figura 5).

Figura 5. Tratamentos mais utilizados nas pesquisas direcionadas ao tratamento do bagaço de cana de açúcar nos últimos 10 anos.

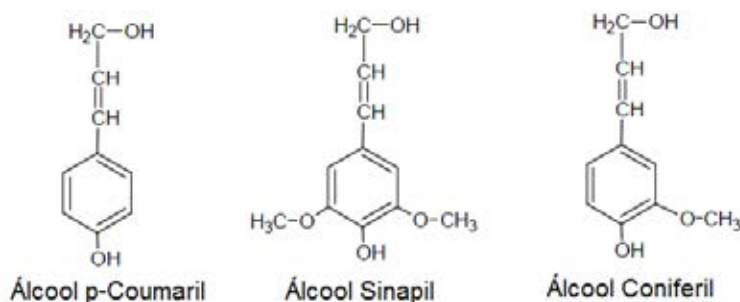


Observa-se que os tratamentos utilizando ácidos ou bases diluídas têm sido os mais utilizados nos últimos 10 anos, entretanto nos últimos 4 anos (de 2011 a 2014) a tendência tem sido empregar técnicas menos tradicionais, tais como micro-ondas, ultrassom, líquido iônico, amônia diluída e outros (ozônio, glicerol, organosolv e peróxidos), a fim de aumentar o rendimento e reduzir principalmente a formação de composto inibidores da fermentação alcoólica.

2.2.1. Pré-tratamento com Ozônio

O ozônio é altamente reativo com compostos que possuem ligações duplas conjugadas e grupos funcionais com alta densidade de elétrons (GARCÍA-CUBERO et al., 2009). A complexa estrutura da lignina baseia-se em três principais precursores monoméricos, álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-coumarílico (AMEN-CHEN et al., 2001) (Figura 6). Portanto as ligações duplas da lignina podem pertencer tanto ao anel aromático quanto à cadeia alifática, desta forma, a grande quantidade de ligações duplas entre carbono torna a lignina o componente lignocelulósico mais provável de ser oxidado pela ação do ozônio.

Figura 6. Estrutura química dos precursores monoméricos da lignina.



Fonte: (AMEN-CHEN et al., 2001)

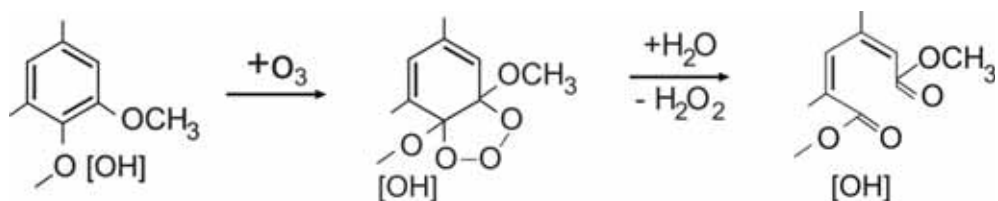
A reação do ozônio pode acontecer por radicais livres ou por ataque eletrofílico direto, dependendo do pH (GLAZE et al., 1987 apud TEZCANLI-GÜYER; INCE, 2004), durante a ressonância da molécula de ozônio, o oxigênio terminal positivo torna-se o sitio eletrofílico da molécula, sendo por sua vez mais reativo que o sitio nucleofílico (Figura 7).

Figura 7. Híbridos de ressonância da molécula de ozônio.



O passo inicial para ozonização é o ataque eletrofilico das posições ativadas pelo oxidante (Figura 8) (GIERER, 1986). Após a reação é consumido uma molécula de água e liberado peróxido de hidrogênio, mas o mais importante é a abertura do anel aromático provocado pela reação.

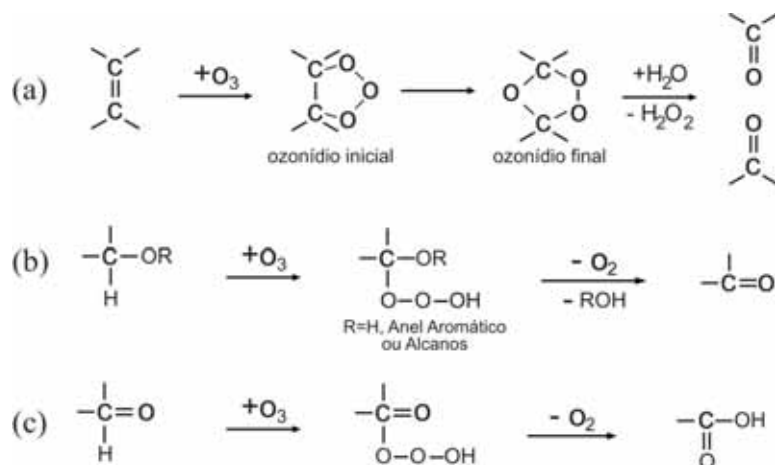
Figura 8. Mecanismo de ação do ozônio em compostos aromáticos.



Fonte: (GIERER, 1986)

Em meio alcalino o ozônio é instável e sua decomposição gera radicais hidroxilas que possuem potencial de oxidação maior que do próprio ozônio, por outro lado, em pH ácido a estabilidade do ozônio é mantida (MASTEN et al., 1994; NASCIMENTO et al., 1998; GIERER, 1986).

Figura 9. Mecanismo de ação do ozônio em: a) alcenos; b) alcanos e cadeia lateral do anel aromático; c) Aldeídos.



Fonte: (GIERER, 1986)

A reação do ozônio com alcenos (Figura 9, a) leva a quebra da ligação dupla entre carbonos e a formação de C=O correspondentes a cetonas, aldeídos ou ácidos carboxílicos. O ozônio pode reagir também com a cadeia lateral por ligação éter, tanto em aromáticos quanto em alcanos, levando a separação da cadeia lateral e do anel aromático (Figura 9, b). Aldeídos

estruturais e ou aldeídos formados por outras reações podem reagir com o ozônio produzindo ácidos (Figura 9, c). As reações contidas na Figura 8 e a Figura 9 (a) são as mais importantes rotas de degradação de compostos aromáticos e alcenos pelo ozonólise (GIERER, 1986).

A principal vantagem da utilização de ozônio é que compostos inibidores da fermentação alcoólica, tais como, compostos furânicos, vanilina, siringaldeído, ácido cumárico e ácido ferúlico podem não ser gerados durante o processo de ozonólise. (TRAVAINI et al., 2013; KAUR et al., 2012).

2.2.2. Pré-tratamento com Micro-ondas

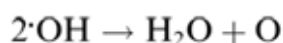
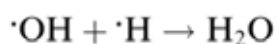
As micro-ondas atuam sobre as moléculas de água, provocando um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento (SANSEVERINO, 2002). A importância da utilização das micro-ondas está principalmente na facilidade de obtenção de elevadas temperaturas em poucos segundos (aproximadamente 260°C, dependendo do solvente) e na uniformidade do aquecimento. Segundo Binod et al. (2012) utilizando a espectroscopia de infravermelho foi possível observar mudanças estruturais na fibra do bagaço de cana de açúcar causadas pelo tratamento utilizando micro-ondas. Já Chen et al. (2011) estudaram os efeitos do pré-tratamento do bagaço de cana irradiado por micro-ondas na presença de ácido sulfúrico diluído, variando o tempo de irradiação e a temperatura, e observaram que as mudanças estruturais ocorridas no bagaço com tratamento por micro-ondas estão principalmente ligadas a temperatura, enquanto que o tempo de aquecimento pouco afeta a estrutura do bagaço; além disto, observou que com o emprego das micro-ondas o teor de hemicelulose foi reduzida significativamente e a estrutura cristalina da lignina desapareceu.

2.2.3. Pré-tratamento com Ultrassom

O tratamento com ultrassom em meio líquido leva à formação de microbolhas na solução com temperaturas de até 5000 K e pressão na ordem de 1000 atm, fenômeno conhecido como cavitação acústica (SUSLICK et al., 1986). Três possíveis reações podem ocorrer devido ao fenômeno da cavitação acústica (RIESZ et al., 1990; INCE et al., 2001): a primeira reação ocorre no interior da microbolha e compreende à reação de oxidação pelo

contato dos radicais livres formados pela sonólise da água (Figura 10) com compostos presentes no interior ou em contato com a microbolha (Figura 11, a).

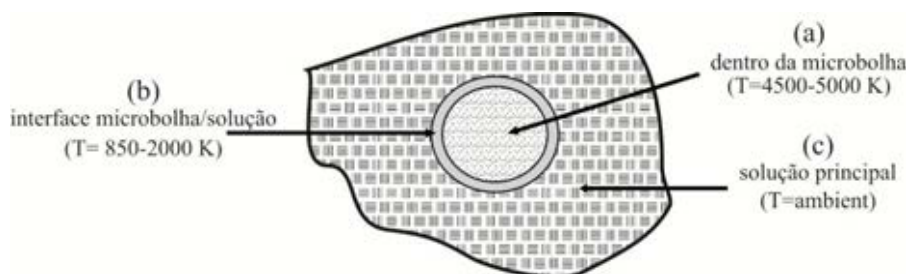
Figura 10. Cadeia de reações que ocorrem durante a sonificação da água.



Fonte: (TEZCANLI-GÜYER; INCE, 2004)

A segunda reação é uma reação térmica e ocorre devido à temperatura superficial da microbolha, na ordem de 2000 K (Figura 11, b); por fim, a micro bolha pode entrar em colapso e liberar os radicais formados em seu interior para a solução principal (NAM et al., 2003; INCE et al., 2001) (Figura 11, c).

Figura 11. Três potenciais sítios de reações químicas em líquidos irradiados com ultrassom.



Fonte: (INCE et al., 2001)

As reações que ocorrem devido à irradiação com ultrassom podem romper as paredes celulares da fibra, facilitando a penetração de solventes no material celulósico e aumentando a transferência de massa (LIU et al., 2007a).

2.2.4. Modificações no pH

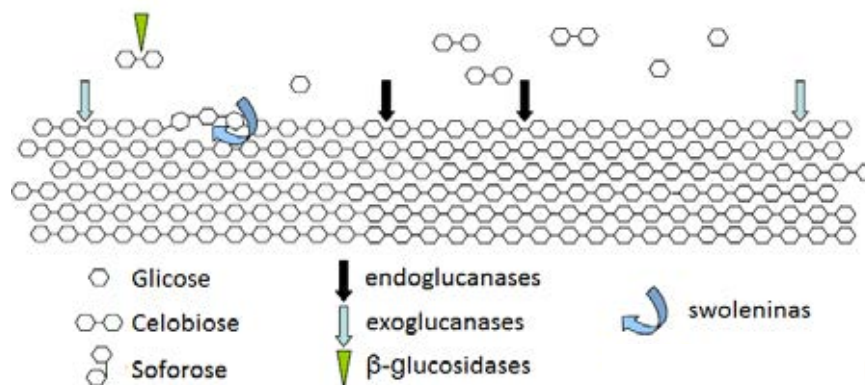
O ozônio é um poderoso oxidante ($E^\circ = +2.07 \text{ V}$) que possui certa estabilidade em condições ácidas, entretanto, o ozônio se degrada rapidamente quando em soluções alcalinas, levando a formação de radicais hidroxilas que por sua vez é um oxidante ainda mais poderoso ($E^\circ = +3.06 \text{ V}$) a formação de radicais pode tornar o tratamento mais severo em condições alcalinas, mas por outro lado torna a ação do ozônio inespecífica e pode causar a degradação de carboidratos.

As micro-ondas em meio ácido podem aumentar a área superficial do bagaço devido ao inchaço ocorrido durante o aquecimento, além disto, o aumento de temperatura leva a diminuição do pH final da solução, isto ocorre devido a liberação de ácidos orgânicos presentes no bagaço (CHEN et al., 2011). Por outro lado, um estudo feito por Zhu et al., (2005) com palha de arroz indica que a utilização das micro-ondas em meio alcalino pode aumentar a taxa de hidrólise devido a remoção de lignina e hemicelulose.

2.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para avaliar a qualidade do pré-tratamento é necessário promover a hidrólise enzimática do material pré-tratado, é utilizado um complexo celulolítico composto geralmente por celulases. As celulases são enzimas que hidrolisam as ligações β (1 \rightarrow 4) da celulose. Para que ocorra a hidrólise da celulose é necessária a ação conjunta das endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases. As endoglucanases (EC 3.2.1.4) atacam aleatoriamente regiões de baixa cristalinidade da celulose, no interior da molécula, hidrolisando as ligações β (1 \rightarrow 4) e gerando novas terminações de cadeia. Já as exoglucanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) degradam a molécula resultante da ação das endoglucanases pela remoção de unidades de Glicose ou celobiose e, por fim, as β -glucosidases ou Celobiasas (EC 3.2.1.21) hidrolisam a celobiose, liberadas pela ação das exoglucanases, liberando Glicose (Figura 12) (ARO et al., 2005; RIEDEL et al., 1997; GÓMEZ, 1985).

Figura 12. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose, principais atividades celulolíticas e sítios de ação dos três principais grupos de celulases.

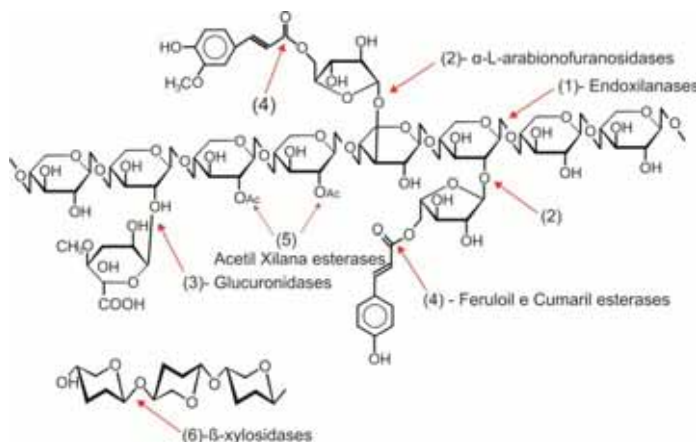


Fonte: adaptado de Aro et al., (2005)

As ações combinadas das endoglucanases e exoglucanases modificam a superfície da fibra de celulose acelerando a velocidade de liberação de glicose por facilitar o acesso das β -glucosidases aos seus substratos. Além destas enzimas, outras proteínas como as expansinas e as swoleninas são relatadas como desestabilizadoras da estrutura da celulose cristalina, o que favorece a sua sacarificação (ARO et al., 2005).

A hidrólise da hemicelulose é realizada pelo conjunto de enzimas denominado hemicelulases. A hidrólise ocorre pela ação conjunta de endoenzimas, que clivam internamente a cadeia principal, exoenzimas, que liberam açúcares monoméricos, e enzimas auxiliares, que conduzem a liberação de outros monossacarídeos e/ou dissacarídeos (ARO et al., 2005). A xilana (Figura 13) é o principal componente da hemicelulose, e sua degradação requer um conjunto de esterases e glucanases, estas enzimas são produzidas por fungos e bactérias e são em sua maioria extracelular (CHÁVEZ et al., 2006).

Figura 13. Representação esquemática de uma molécula de xilana e as respectivas ações das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanasas; 2 - α -L-arabionofuranosidas; 3 – glucuronidas; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases; 6- β -xylosidasas.



Fonte: adaptada de Chávez et al., 2006.

A hidrólise da xilana envolve as endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8), que são enzimas que hidrolisam as ligações internas β (1 \rightarrow 4) da cadeia principal da molécula de xilana, resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato, as α -L-arabinofuranosidas (EC 3.2.1.55), que são enzimas que hidrolisam grupos terminais da cadeia de hemicelulose, as exo-1,4- β -xilosidase (EC 3.2.1.37), que hidrolisam os oligossacarídeos em xilose e as acetil xilana esterases (EC 3.1.1.72), que hidrolisam grupos acetato da cadeia principal, sendo estas as principais enzimas, outras enzimas que também atuam na degradação da xilana são as α -D-glucuronidas (EC 3.2.1.139), feruloil (EC 3.1.1.73) e cumarílico (EC 3.1.1.-) esterases (WONG et al., 1988; ARO et al., 2005).

2.4. INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

As condições extremas na qual o bagaço é submetido durante os pré-tratamentos podem gerar subprodutos inibidores da fermentação alcoólica, portanto, uma grande quantidade de açúcares fermentáveis liberados não indica alto rendimento na produção de etanol celulósico. Os inibidores da fermentação são divididos em 3 grandes grupos baseados em sua origem, sendo eles: 1) Derivados furânicos; 2) Compostos fenólicos totais; 3) Ácidos fracos (PALMQVIST et al., 2000).

Quando a hemicelulose é hidrolisada são liberados para o meio a xilose, manose, ácido acético, galactose e glicose, já a celulose é hidrolisada a glicose, A xilose é degradada a

furfural e o hidroximetilfurfural (HMF) é formado a partir da degradação de hexoses quando em altas temperaturas e meio fortemente ácido, além disso, ácido levulínico e ácido fórmico podem ser formados pela quebra do HMF e do furfural (PALMQVIST et al., 2000; ROSATELLA et al., 2011). Os compostos fenólicos são provenientes da estrutura e degradação da lignina e são inibidores da fermentação, entre eles os principais compostos da degradação da lignina são: siringaldeído, ácido cinâmico, ácido 4-hidroxibenzóico, e vanilina (XIMENES et al., 2010a).

2.5. ANÁLISE TÉRMICA DO BAGAÇO TRATADO

A definição das técnicas termoanalíticas adotada pela IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e ASTM (*American Society for Testing and Materials*) é a seguinte:

Grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada.

Durante a decomposição térmica do bagaço de cana de açúcar, cada um dos 3 principais componentes do material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina) tem características específicas, as quais são baseadas nos tipos de ligações existentes entre os componentes e na sua estrutura polimérica. O TGA (do inglês, *Thermal Gravimetric Analysis*) representa a porcentagem de perda de massa em função da temperatura, enquanto o DTG (do inglês, *Differential Thermal Gravimetric Analysis*) representa a derivada da TGA.

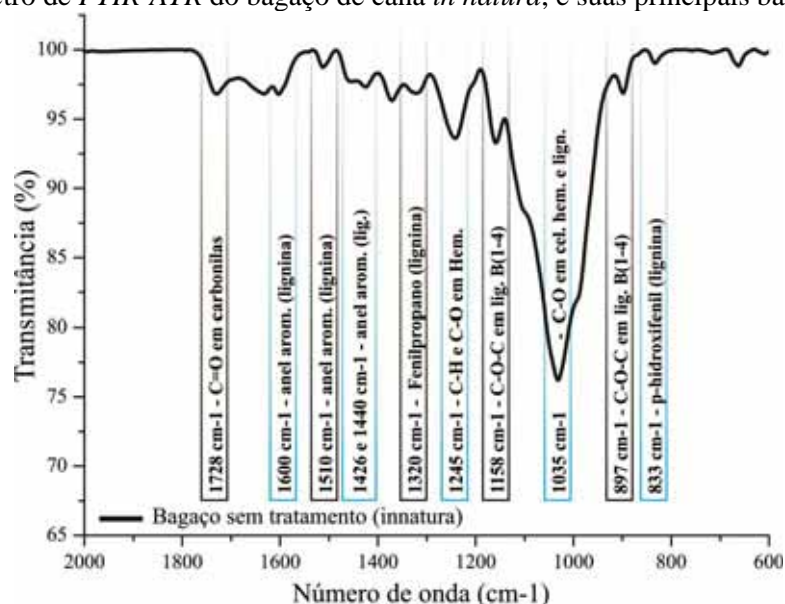
A técnica termoquímica TGA foi utilizada para relacionar o grau de desestruturação da fibra de bagaço de cana de açúcar após os diferentes tratamentos. A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica baseada na variação da massa de uma amostra em função da temperatura em um ambiente com atmosfera e temperaturas controladas.

2.6. ANÁLISE ESTRUTURAL DO BAGAÇO TRATADO

2.6.1. Análise estrutural por FTIR-ATR

A energia de radiação infravermelha é absorvida pela molécula quando a radiação eletromagnética irradiada possui frequência de radiação correspondente à frequência de vibração da molécula (MCMURRY, 2005). Quando a radiação infravermelha é absorvida é alterado o estado vibracional das ligações da molécula, (SOLOMONS, 2001). Se durante a vibração a molécula sofrer variação em seu momento dipolar o sinal será captado e observado a partir de um espectro. A Reflectância Total Atenuada (ATR) é necessária para a análise em bagaço de cana, uma vez que o bagaço não é translúcido. A técnica ATR consiste na passagem do feixe de luz infravermelho por um cristal, que esta em contato com a amostra, e a variação no sinal pode ser detectada.

Figura 14. Espectro de *FTIR-ATR* do bagaço de cana *in natura*, e suas principais bandas de absorção.



Na Figura 14 é mostrado o espectro de infravermelho do bagaço de cana *in natura* no qual se observa as principais bandas para análise da estrutura do bagaço de cana por espectrofotometria vibracional.

3. OBJETIVO GERAL

Realizar o tratamento do bagaço de cana de açúcar utilizando ozônio, micro-ondas e ultrassom em condições ácidas ou alcalinas, para promover alterações na estrutura lignocelulósica para facilitar o acesso enzimático à celulose, a fim de aumentar o rendimento na produção de açúcares fermentescíveis, visando a produção de etanol celulósico.

2.7. METAS

- Realizar o tratamento do bagaço de cana padronizado com ozônio, micro-ondas, ultrassom e variações no meio (alcalino ou ácido).
- Quantificar o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e compostos furânicos (Hidroxiacetilfurfural (HMF) e Furfural) após o tratamento do bagaço de cana de açúcar.
- Quantificar o teor de açúcares redutores totais (ART) após os diferentes tratamentos do bagaço de cana de açúcar.
- Promover a caracterização química da fibra após os diferentes tratamentos.
- Avaliar a estabilidade térmica do bagaço tratado por meio da Termogravimetria (TGA).
- Avaliar o impacto dos diferentes tratamentos na fibra do bagaço por Espectrofotometria no Infravermelho (FTIR-ATR).
- Avaliar os teores de glicose, xilose e arabinose liberadas após a hidrólise, por cromatografia de troca aniônica (HPAEC-PAD) e comparar o resultado obtido com o valor do bagaço sem tratamento (*in natura*).
- Estudar o efeito da variação na quantidade de ozônio no tratamento com maior rendimento enzimático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

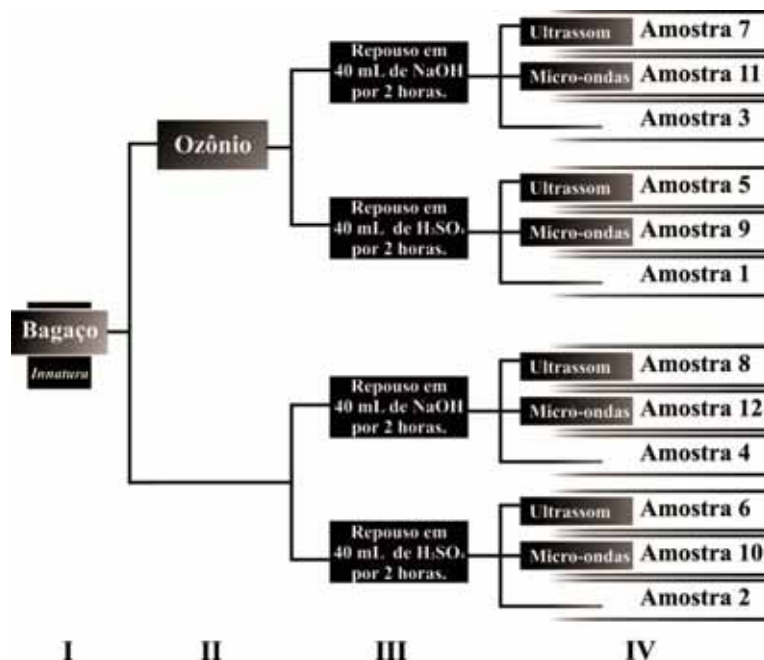
4.1. PREPARO DO BAGAÇO E PADRONIZAÇÃO DO TAMANHO DA FIBRA

O bagaço foi coletado em usinas da região de São José do Rio Preto-SP e corresponde a uma mistura de várias espécies de cana de açúcar cultivada na região, o bagaço coletado foi lavado três vezes com água destilada quente (~35°C) e em seguida seco em estufa a 42°C por 24 horas. O bagaço previamente lavado e seco foi triturado em um triturador industrial utilizando duas peneiras, uma de poros de 1 mm e outra de poros de 3 mm, a seguir foi peneirado em peneiras de 0,84 mm, 1,41 mm e 3,36 mm. Utilizou-se o bagaço com fibra menor que 0,84 mm, entre 0,84 mm e 1,41 mm e entre 1,41 mm e 3,36 mm, o bagaço retido na peneira de 3,36 mm foi descartado.

4.2. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS PRÉ-TRATAMENTOS

Foram selecionadas três variáveis para o pré-tratamento do bagaço, sendo elas: oxidação por ozônio, variações no meio (ácido ou alcalino), e irradiação por ultrassom ou micro-ondas. A fim de conhecer o efeito de cada variável sobre a resposta final (teor de CFT, ART ou glicose) foi utilizado planejamento fatorial completo, tanto para os tratamentos envolvendo ultrassom, quanto para micro-ondas dando um total de 12 amostras, mais o bagaço sem tratamento, conforme Figura 15.

Figura 15. Planejamento experimental dos pré-tratamentos e respectivas amostras.



- I – Bagaço peneirado em peneira de 0,84 mm, lavado e seco em estufa a 42°C por 24 horas.
 II – Ozonólise realizada em coluna de vidro sob fluxo constante de ozônio por 60 minutos.
 III – Repouso da amostra por 2 horas em solução (H₂SO₄ (0,1 mol L⁻¹) ou NaOH (0,1 mol L⁻¹)).
 IV – Aplicação de ultrassom ou micro-ondas.

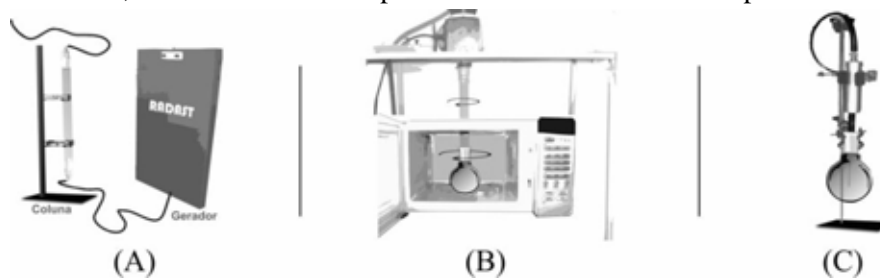
Fonte: elaborada pelo autor.

O ozônio foi quantificado e o fluxo injetado na coluna contendo o bagaço a ser tratado foi de 32 mg min⁻¹. Os tempos para irradiações por micro-ondas (4 min) e ultrassom (5 min) foram previamente determinados.

4.3. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO

O gás ozônio foi obtido usando o gerador Radast 10C, Ozoxi-Ozônio (Figura 16, A). O forno de micro-ondas empregado foi o ME21S da Electrolux com modificações e adaptado com rotação do balão que contém as amostras (Figura 16, B). Para a irradiação por ultrassom foi utilizada uma sonda ultrassônica da Fisher Scientific, Modelo 50 Sonic Dismembrator, operante na frequência de 22 kHz e potencia de 50 W (Figura 16, C).

Figura 16. Aparelho gerador de ozônio Radast 10C, Ozoxi-Ozônio; O forno de micro-ondas ME21S da Electrolux; Sonda ultrassônica operante a 22 kHz utilizada nos pré-tratamentos.



Fonte: elaborada pelo autor.

A injeção de ozônio na amostra foi realizada através da sua passagem por uma coluna de vidro (45 x 2,5 cm) contendo o bagaço de cana de açúcar, inicialmente foram pesados 20 g de bagaço e colocados na coluna, tal sistema foi montado conforme a Figura 17, o bagaço em coluna foi submetido ao fluxo de ozônio por 1 hora (32 mg min^{-1}) correspondente a uma produção de aproximadamente 96 mg de O_3 por grama de bagaço ($20 \text{ g} \times 32 \text{ mg min}^{-1} \times 60 \text{ min}$), depois de mantido em fluxo de ozônio o bagaço foi desempacotado e homogeneizado para as próximas etapas do tratamento.

Figura 17. Montagem da coluna para a utilização de fluxo constante de ozônio em coluna.



Fonte: elaborada pelo autor.

Após o tratamento com ozônio alíquotas de 2 g do bagaço foram colocadas em balões de 250 mL com 40 mL de solução (ácida ou alcalina) e mantidas em repouso por 2 horas. Transcorrido o tempo de repouso, o bagaço foi submetido à irradiação por micro-ondas ou ultrassom. Por fim, a fração solubilizada correspondente ao pré-hidrolisado foi recolhida, centrifugada, filtrada e utilizada para quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) e compostos furânicos (HMF e furfural). O bagaço tratado foi lavado com água destilada, seco a 42°C até obter peso constante e armazenado protegido de luz e da umidade para posterior hidrólise enzimática, análise estrutural, análise térmica e caracterização química.

4.4. ANÁLISE DE COMPOSTOS INIBIDORES DA FERMENTAÇÃO E ART

O teor de compostos fenólicos totais solúveis no pré-hidrolisado foi avaliado pelo método Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927). O reagente de Folin-Ciocalteu tem sua coloração alterada de amarelo para diferentes intensidades de azul, de acordo com a concentração de compostos fenólicos em solução. A reação foi conduzida adicionando-se 3,0 mL da amostra filtrada e diluída e 0,2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em tubos, aos quais, após 5 minutos na ausência de luz, foram adicionados 0,8 mL de solução de Na_2CO_3 (150 g L^{-1}). Após 30 minutos em repouso, as absorbâncias a 760 nm foram medidas. Foi traçada curva de calibração utilizando como padrão o ácido gálico, e os resultados foram expressos em mg de CFT g^{-1} de bagaço tratado.

A determinação de compostos furfênicos foi realizada por HPLC, Dionex uHPLC 3000, com bomba P680, compartimento de coluna a 35°C , fluxo de 1 mL min^{-1} e coluna EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 CN de fase reversa, a fase móvel isocrática foi composta por 90% de H_2O e 10% de metanol. O tempo de retenção para o HMF no método utilizado foi de 7,0 minutos enquanto para o furfural foi de 8,4 minutos. O comprimento de onda absorvido pelo furfural foi de 275,6 nm, enquanto para o HMF foi de 282,8 nm, a partir do tempo de retenção e do comprimento de onda absorvido pelos compostos foi possível detectar e quantificar sua presença nas amostras tratadas.

Os açúcares redutores totais solúveis do pré-hidrolisado foram determinados pelo método de Miller (MILLER, 1959) que se fundamenta na redução do reagente ADNS (Ácido 3,5-Dinitrosalicílico), por conta da ação de açúcares redutores, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, reação que apresenta alteração de coloração do amarelo para tons castanhos. A reação foi feita adicionando-se 0,5 mL da amostra filtrada, juntamente com 0,5 mL do reagente ADNS em tubos que foram colocados em banho de ebulição por 10 minutos. A partir disso, os tubos foram resfriados em banho de gelo por 5 minutos e a cada um deles foi adicionado 4,0 mL de água destilada, as amostras seguiram para determinação espectrofotométrica em espectrofotômetro à 540 nm.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DO FLUXO DE OZÔNIO.

O fluxo de ozônio foi determinado de acordo com o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), passando-se o gás ozônio gerado por

dois *Traps* (*Trap A* e *Trap B*) ligados em série por aproximadamente 1 minutos, cada *Trap* foi preenchido com 200 mL de solução 2% de Iodeto de Potássio. Após aproximadamente 10 minutos, alíquotas da solução do *Trap A* e *B* foram retiradas e tituladas com tiosulfato de sódio (0,01 N). O cálculo do fluxo de ozônio foi realizado utilizando a fórmula contida na referencia.

4.6. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO

A caracterização do bagaço foi realizada conforme Sluiter et. al. (2002). Inicialmente pesou-se uma alíquota de 300 mg do bagaço e adicionados em um erlenmeyer de 200 mL, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico 72% e deixados em repouso por 5 minutos, após o repouso foram adicionados 85 mL de água, as amostras foram submetidas a autoclave (121°C) por 1 hora para a hidrólise ácida. O sobrenadante foi filtrado em filtros previamente pesados e realizado leitura espectrofotométrica em 240 nm para quantificar a lignina solúvel, logo em seguida foi determinado o teor de glicose, xilose, HMF e furfural por HPLC-Dionex. O material sólido retido no filtro foi lavado com 150 mL de água quente, para lavagem de todo ácido remanescente no conjunto amostra/filtro, secos em estufa a 105°C por 24 horas e pesados para obtenção da lignina insolúvel. O material restante foi submetido à mufla à 550°C para obtenção da cinza ácida de cada amostra. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Para conhecer o efeito dos diferentes tratamentos em relação à liberação de glicose, o bagaço foi submetido à ação de enzimas (complexo enzimático comercial – Prozyn®).

A hidrólise foi realizada em tubos de 50 mL, com 0,25 g de bagaço de cana provenientes dos diferentes tratamentos. O complexo enzimático foi diluído para ter-se 1 mg mL⁻¹ de proteína, correspondente a 32 FPU g⁻¹ os tubos foram colocados em banho de hidrólise a 60°C, com agitação orbital a 150 rpm por 24 horas. O melhor tempo de hidrólise foi previamente determinado.

4.8. ANÁLISE ESTRUTURAL DO BAGAÇO POR FTIR-ATR.

Após o pré-tratamento o bagaço foi seco em estufa a 60°C até peso constante, aproximadamente 100 mg de bagaço foram prensados para formulação de um disco de 12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Os espectros foram coletados em espectrofotômetro Perkin Elmer (*FT-IR Spectrum Two – UART Two*) na região de 600 a 4000 cm^{-1} . Devido a heterogeneidade do bagaço o feixe de luz foi direcionado em pelo menos 8 posições e construído um espectro médio para cada amostra.

4.9. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% + paraformaldeído 4% em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 7,3) por 96 h, lavado em tampão fosfato e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão por 2 h. A seguir, o material foi lavado em água destilada e contrastado em bloco com acetato de uranila 0,5% em água destilada por 1 h. A desidratação foi realizada em série crescente de soluções de acetona, e a infiltração em mistura de Araldite® e acetona (1:1) por 12 h, sendo a inclusão feita em Araldite® puro. Os cortes semi-finos, obtidos dos blocos, foram corados com uma mistura de azul de metileno 1% com azur II 1% em bórax 1% (1:1) e examinados ao microscópio de luz para seleção de blocos com material de interesse. Dos blocos selecionados foram obtidos cortes ultrafinos, que foram contrastados com solução alcoólica saturada de acetato de uranila e posteriormente com citrato de chumbo. Os materiais foram analisados e fotografados ao MET, modelo CM-100 da Philips e também no Tecnai Spirit da FEI Company.

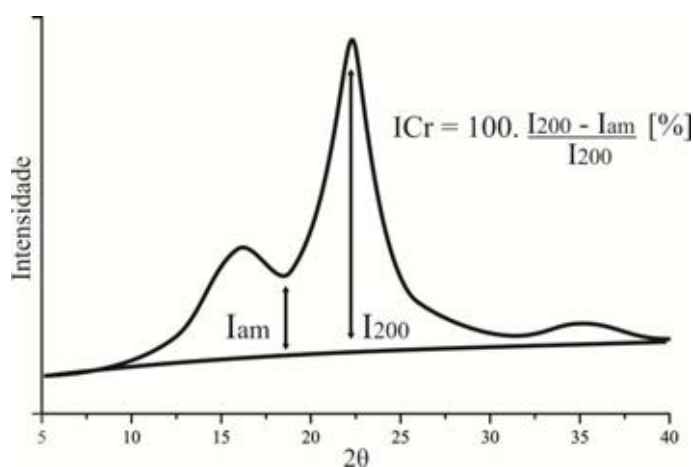
4.10. PREPARO DO MATERIAL PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O material foi fixado por 24 h em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,3), pós-fixado em tetróxido de ósmio 0,5% no mesmo tampão por 30 min, desidratado em séries crescentes de soluções alcoólicas. O material foi seco em CO₂ líquido em aparelho de Ponto Crítico CPD 010 (Balzers Union) e recoberto com ouro em metalizador MED da Balzers Union. A análise do material e a documentação fotográfica foram realizados em MEV modelo Quanta 200 da Fei Company.

4.11. ÍNDICE DE CRISTALINIDADE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Foi utilizado um difratômetro de raios-X de bancada, modelo Rigaku miniflex 300, Tóquio - Japão, radiação de Cu e linha K,L = 1,542 Å (30 kV e 10 mA). A abrangência da varredura foi de 5° a 40°, com velocidade de varredura 1° min⁻¹. O índice de cristalinidade foi calculado pelo método proposto por Seagal et al., (1959).

Figura 18. Cálculo do índice de cristalinidade pelo método da intensidade dos picos conforme proposto por Seagal et al, (1959). I_{am} – intensidade do pico amorfo em aproximadamente 18°, I_{200} – Intensidade do pico cristalino em aproximadamente 22°.



Fonte: (TERINTE et al., 2011).

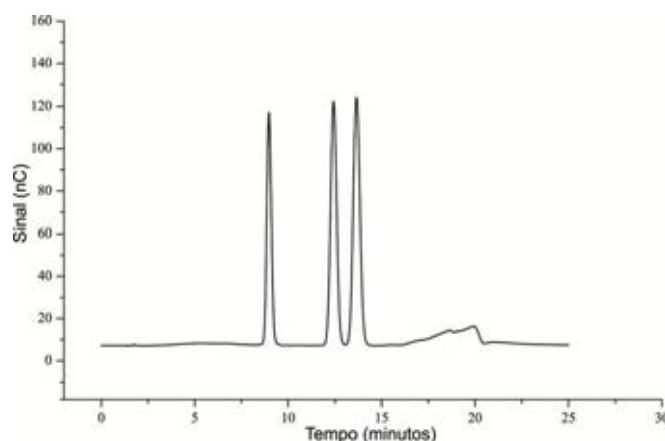
Pelo método proposto por Seagal et al., (1959) o índice de cristalinidade é calculado a partir da relação entre a intensidade máxima de difração em ~22° representada por I_{200} (pico cristalino) e a intensidade mínima de difração ~18, representado a fração amorfa (I_{am}) (Figura 18),

4.12. QUANTIFICAÇÃO, POR HPAEC-PAD, DO TEOR DE GLICOSE, XILOSE E ARABINOSE LIBERADOS PELA AÇÃO ENZIMÁTICA.

A quantificação da glicose e xilose e arabinose foi realizada por meio da cromatografia de troca aniônica, utilizando o HPAEC-PAD (Thermo Scientific (Dionex) ICS-5000) com coluna de troca aniônica CarboPac® PA-1 a 25°C e compartimento a 30°C, com diluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 MΩ e desgaseificada com N₂, o fluxo utilizado

foi de 1 mL min^{-1} com os solventes: A (água ultra pura) e B (500 mM de NaOH), utilizou-se eluição isocrática de 0 a 12 minutos com 4,8% de B e 95,2% de A, de 12 minutos a 16 minutos foi utilizado 100% de B para a limpeza da coluna, e por fim dos 16 minutos aos 25 minutos 4,8% de B e 95,2% de A para condicionamento da coluna.

Figura 19. Tempo de retenção em HPLC para arabinose, glicose e xilose.



Os tempos de retenção para arabinose, glicose e xilose para o método utilizado foram de respectivamente 8,97; 12,43 e 13,65 minutos conforme Figura 19.

4.13. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando o equipamento TG 4000 – Perkin Elmer[®], a técnica foi utilizada para verificar as mudanças ocorridas na estabilidade térmica da fibra após os tratamentos. Foram utilizados aproximadamente 10 mg de amostra e a temperatura foi controlada de 30 a 700°C com taxa de aquecimento de $50^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de nitrogênio (20 mL min^{-1}).

4.14. ÁREA SUPERFICIAL (B.E.T.)

As áreas superficiais foram obtidas através de cálculos baseados na metodologia proposta por Brunauer, Emmett e Teller (1938), denominado BET. Por essa metodologia o cálculo da área da superfície total é feito pela determinação do volume de nitrogênio necessário para formar uma monocamada sobre o material, adsorvido em diversas pressões.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VARIAÇÕES NO TAMANHO DA FIBRA

Após o bagaço ser peneirado em peneiras de 0,84 mm; 1,41 mm e 3,36 mm, a fibra foi submetida à hidrólise enzimática, sem tratamento prévio, com enzima comercial (Prozyn®). Após a hidrólise o sobrenadante foi filtrado e utilizado para quantificar glicose, xilose e arabinose por HPLC. Na Tabela 1 são exibidos os teores de glicose, xilose e arabinose do hidrolisado dos diferentes tamanhos de fibra.

Tabela 1. Teores de glicose, xilose e arabinose do hidrolisado e B.E.T. dos diferentes tamanhos de fibra.

Tamanho da peneira (mm)	Glicose (mg de Glicose g⁻¹ de bagaço)	Xilose (mg de Xilose g⁻¹ de bagaço)	Arabinose (mg de Arabinose g⁻¹ de bagaço)	Área superficial (BET) (m² g⁻¹)
0,84	75±8	22±1	8,0±0,9	0,8 ± 0,1
0,84-1,41	54±4	16±1	5,6±0,4	0,6 ± 0,1
1,41-3,36	35±1	13±1	3,5±0,1	0,4 ± 0,1

Os dados obtidos indicam que com a utilização da fibra peneirada em 0,84 mm obtém-se melhor desempenho na liberação de açúcares durante a hidrólise enzimática, o que pode ser explicado principalmente pelo aumento da área superficial facilitando a enzima no acesso a seu substrato (celulose / hemicelulose). Por ter sido mais representativo, em todos os tratamentos a seguir foi utilizado bagaço peneirado em 0,84 mm.

5.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS INIBIDORES APÓS O PRÉ-TRATAMENTO

Os compostos fenólicos totais (CFT) são formados a partir da quebra da lignina enquanto o teor de açúcares redutores totais (ART) durante o pré-tratamento se relaciona com a desestruturação de celulose/hemicelulose. A solubilização de CFT durante os pré-tratamentos indicam a despolimerização das fibras do bagaço, facilitando o ataque enzimático, mas por outro lado tais compostos são inibidores da fermentação alcoólica, portanto uma quantidade excessiva de CFT pode ser um problema para as etapas futuras de produção do

etanol celulósico. Na Tabela 2 são relacionados os teores de ART e CFT liberados após os diferentes tratamentos.

Tabela 2. Teor de ART e CFT após os tratamentos.

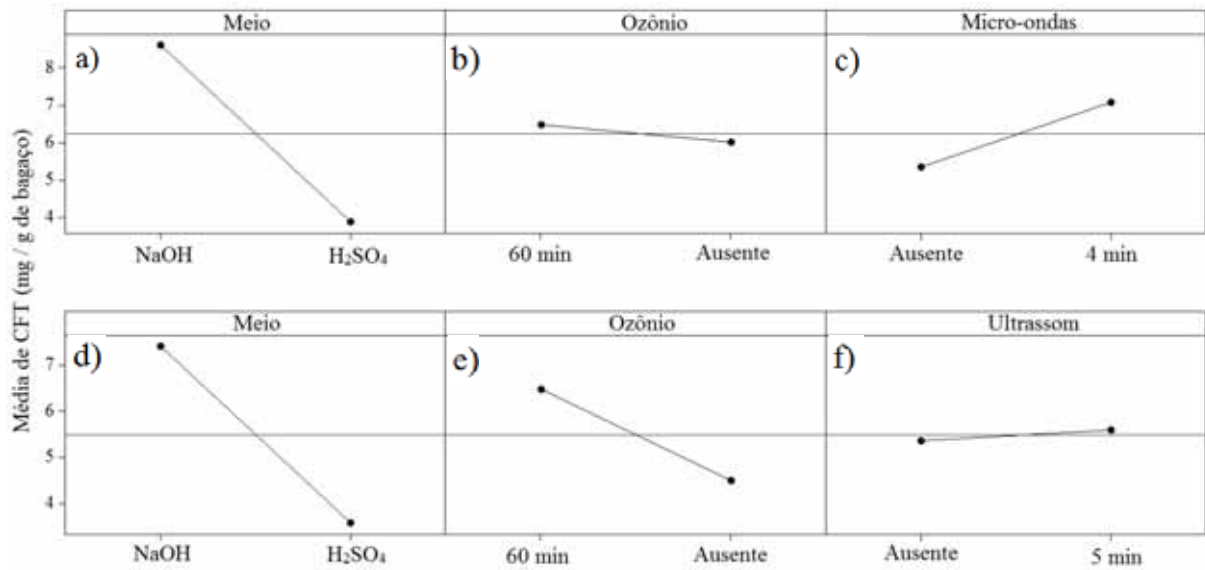
Tratamento	Meio (0,1 mol L ⁻¹)	O₃ (min)	Irradiação*	ART (mg de ART g ⁻¹ de bagaço)	CFT (mg de CFT g ⁻¹ de bagaço)
1	H ₂ SO ₄	60	0	0,6±0,1	6,4±0,4
2	H ₂ SO ₄	0	0	0,3±0,1	0,7±0,1
3	NaOH	60	0	48,3±0,9	6,7±0,1
4	NaOH	0	0	1,2±0,1	7,1±0,2
5	H ₂ SO ₄	60	UT	0,9±0,1	6,3±0,1
6	H ₂ SO ₄	0	UT	0,6±0,1	0,9±0,1
7	NaOH	60	UT	47±3	6,5±0,1
8	NaOH	0	UT	2,0±0,1	8,7±0,3
9	H ₂ SO ₄	60	MO	1,6±0,1	6,4±0,1
10	H ₂ SO ₄	0	MO	5,4±0,2	2,0±0,1
11	NaOH	60	MO	33,6±2,6	6,4±0,1
12	NaOH	0	MO	2,5±0,2	12,6±0,1

* 5 min para ultrassom (UT) e 4 min para micro-ondas (MO)

A partir dos dados obtidos para compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais após os pré-tratamentos, é possível a elaboração, com auxílio de programas estatísticos, de figuras que facilitem a interpretação dos dados. A média de todos os valores das variáveis, mínima (H₂SO₄, sem O₃ e sem irradiação) e máxima (NaOH, O₃ e com irradiação), é calculada, tais valores são representados como um ponto na figura (Figuras 20, 21 e 22), é calculada também a média total, representada pela linha que corta cada eixo (Figuras 20, 21 e 22), quando o ponto da média da variável estiver acima da linha (média geral) indica que a utilização daquela variável gera uma resposta positiva na liberação do composto (glicose, CFT ou ART), caso contrário a resposta é negativa.

Os efeitos principais de cada variável na solubilização de compostos fenólicos totais após o pré-tratamento do bagaço seguem na Figura 20.

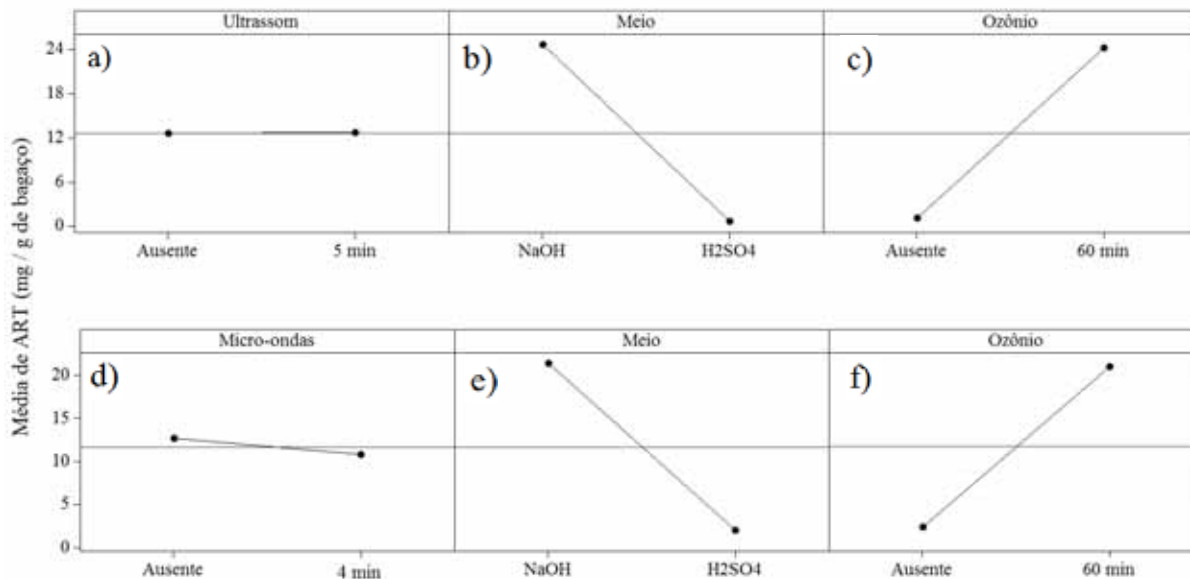
Figura 20. Efeitos principais das variáveis na liberação de CFT após o pré-tratamento do bagaço com a irradiação por micro-ondas e ultrassom.



Na Figura 20 as retas ascendentes indicam que o nível da variável (mínimo ou máximo) tem uma resposta favorável à liberação do composto, enquanto as retas descendentes indicam que o nível da variável tem uma resposta desfavorável, já as retas horizontais indicam que o nível da variável não interfere na resposta final. A resposta estudada nesta Figura foi a solubilização de CFT e a partir dela pode-se observar que a utilização do meio alcalino (Figura 20, a) e d)) e micro-ondas (Figura 20, c)) foram as variáveis mais favoráveis na liberação de CFT; já a utilização do ozônio teve maior efeito na liberação de CFT nos pré-tratamentos utilizando o ultrassom (Figura 20, e)) . Observa-se ainda que com a irradiação por micro-ondas obtêm-se uma média (linha) maior de CFT em relação aos tratamentos com ultrassom.

Na Figura 21 são apresentados os efeitos principais de cada variável na quantificação de ART após o pré-tratamento do bagaço.

Figura 21. Efeitos principais das variáveis na quantificação de açúcares redutores totais após o pré-tratamento com a irradiação por micro-ondas e ultrassom.



Observa-se a partir da (Figura 21) que a utilização de ozônio e meio alcalino favoreceram a solubilização de açúcares redutores totais durante o pré-tratamento (Figura 21, b), c), e) e f)), tanto para os tratamentos com micro-ondas (Figura 21, e) e f)), quanto para os tratamentos com ultrassom (Figura 21, b) e c)). Não houve reposta significativa com a utilização do ultrassom (Figura 21, a)), enquanto que com a utilização das micro-ondas tem-se uma leve resposta negativa (Figura 21, d)), ou seja, redução de ART após os tratamentos, isso pode estar relacionado principalmente a degradação dos açúcares devido as altas temperaturas atingidas (aproximadamente 250°C). Em altas temperaturas e meio ácido a glicose pode ser facilmente degradada a HMF enquanto a xilose pode ser degradada a furfural, tais compostos foram detectados apenas nas amostras 9 e 10 tratadas em meio ácido e altas temperaturas (micro-ondas).

5.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR APÓS O TRATAMENTO

A caracterização química do bagaço de cana de açúcar seguiu-se conforme Sluiter et. al. (2002). Observa-se que no bagaço sem tratamento utilizado nos diversos tratamentos, obteve-se 38,3% de celulose, 19,3% de hemicelulose, 28,7% de lignina e 2,7% de cinzas (Tabela 3).

Tabela 3. Teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas no bagaço após os respectivos tratamentos.

Tratamento	Meio (0,1 mol L ⁻¹)	O ₃ (min)	Irradiação*	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
1	H ₂ SO ₄	60	0	46,2±2,2	16,0±1,1	27,3±0,4	2,0±0,2
2	H ₂ SO ₄	0	0	38,4±0,9	16,8±0,3	34,2±0,9	1,6±1,2
3	NaOH	60	0	51,8±2,2	14,1±1,1	25,9±0,4	1,8±0,6
4	NaOH	0	0	39,2±1,0	16,4±0,4	30,8±1,0	1,2±0,3
5	H ₂ SO ₄	60	UT	42,7±2,7	14,5±1,4	24,8±1,2	1,9±0,1
6	H ₂ SO ₄	0	UT	36,3±1,3	15,4±1,3	34,2±2,3	2,3±0,1
7	NaOH	60	UT	48,9±1,0	11,2±0,6	26,0±0,8	3,1±0,3
8	NaOH	0	UT	41,2±0,4	18,6±0,3	30,0±1,7	0,9±0,1
9	H ₂ SO ₄	60	MO	46,7±0,7	9,5±0,2	32,5±1,8	2,4±0,9
10	H ₂ SO ₄	0	MO	39,2±1,7	17,9±1,1	34,6±1,1	1,2±0,2
11	NaOH	60	MO	51,7±3,3	16,0±1,2	22,3±1,5	1,5±0,2
12	NaOH	0	MO	42,0±2,7	17,3±0,9	26,8±2,6	2,6±0,1
Bagaço sem tratamento				38,3±2,7	19,3±0,6	28,7±2,7	2,7±0,1

* 5 min para ultrassom (UT) e 4 min para micro-ondas (MO)

Fonte: elaborada pelo autor.

É possível observar um aumento no teor de celulose após o tratamento em praticamente todas as amostras, entretanto o aumento nas amostras tratadas com ozônio é expressivamente maior em relação aos tratamentos sem a utilização de ozônio, assim como a utilização de meio alcalino em relação ao meio ácido, há ainda menor quantidade de hemicelulose nas amostras tratadas com meio alcalino em relação às tratadas em meio ácido. Já o teor de lignina é menor em praticamente todas as amostras utilizando ozônio, a deslignificação é ainda aumentada com a utilização de meio alcalino e irradiação tanto por micro-ondas quanto por ultrassom.

5.4. HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO

A hidrólise do bagaço pré-tratado foi realizada utilizando o tempo ótimo de hidrólise de 24 horas. Depois de transcorrido o tempo de hidrólise as amostras foram diluídas e filtradas para a quantificação dos açúcares (glicose, xilose e arabinose).

Na Tabela 4 estão relacionados os teores glicose, xilose e arabinose solubilizadas pela hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, utilizando enzima comercial.

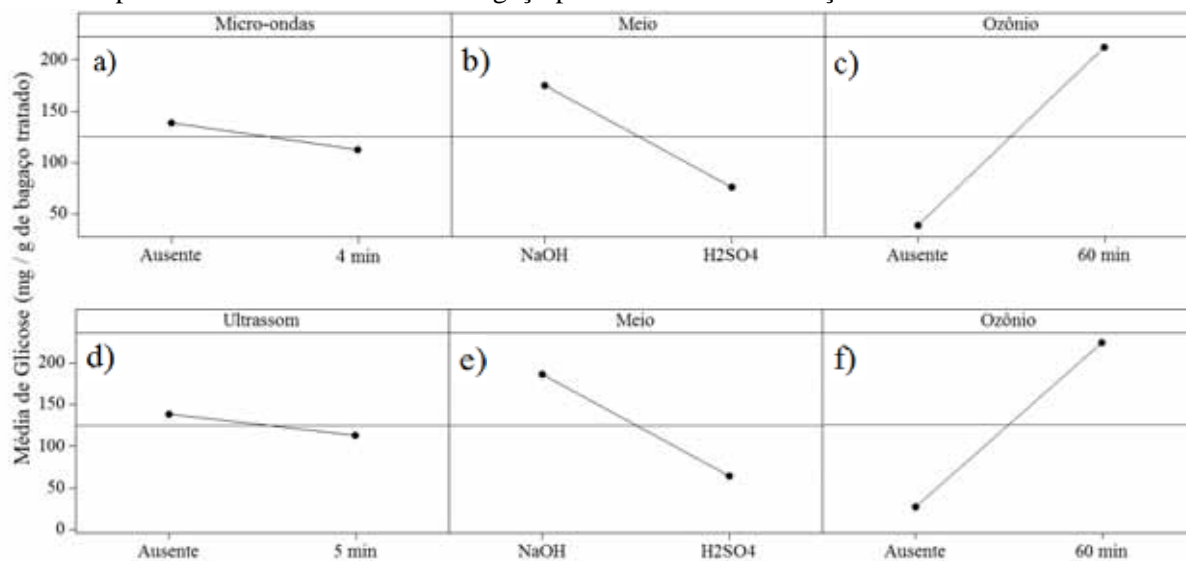
Tabela 4. Teor de glicose, xilose e arabinose quantificados por HPLC após a hidrólise enzimática com enzima comercial Prozyn[®], nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Meio (0,1 mol L ⁻¹)	O ₃ (min)	Irradiação*	Glicose (mg g ⁻¹ de bagaço)	Xilose (mg g ⁻¹ de bagaço)	Arabinose (mg g ⁻¹ de bagaço)
1	H ₂ SO ₄	60	0	145±16	33±6	10,1±0,5
2	H ₂ SO ₄	0	0	53±4	20±1	10,8±0,7
3	NaOH	60	0	354±12	75±10	5,6±0,9
4	NaOH	0	0	-	-	-
5	H ₂ SO ₄	60	UT	53±1	16±1	9,1±0,3
6	H ₂ SO ₄	0	UT	53±12	26±5	8±2
7	NaOH	60	UT	391±7	79±9	5,1±0,9
8	NaOH	0	UT	-	-	-
9	H ₂ SO ₄	60	MO	3,0±0,2	37±6	2,5±0,5
10	H ₂ SO ₄	0	MO	99±14	46±8	4,4±0,7
11	NaOH	60	MO	345±6	75±1	4,6±0,8
12	NaOH	0	MO	-	-	-
Bagaço sem tratamento				66±4	23±1	7,1±0,2

* 5 min para ultrassom (UT) e 4 min para micro-ondas (MO)

Com o uso da Tabela 4 foi elaborada a Figura 22, na qual é possível observar de forma simplificada os efeitos principais das variáveis na liberação de glicose após a hidrólise enzimática.

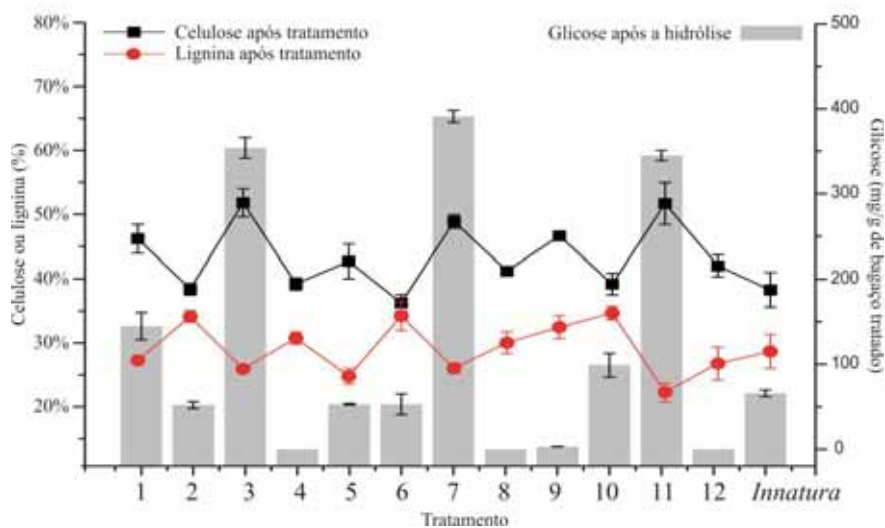
Figura 22. Efeitos principais das variáveis, utilizadas no pré-tratamento, na quantificação de Glicose após a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com utilização do micro-ondas ultrassom.



A utilização de ozônio e meio alcalino nos pré-tratamentos foram as variáveis que mais influenciaram no aumento de rendimento da hidrólise enzimática (Figura 22, b) c) e) e f)). Com a irradiação por ultrassom e micro-ondas os efeitos foram ligeiramente desfavoráveis ao rendimento enzimático (Figura 22, a) e d)), provavelmente devido a formação de compostos não favoráveis a hidrólise devido a irradiação. Porém tal resposta é uma média do conjunto de tratamentos, quando é observado cada amostra individualmente tem-se que a Amostra 7 ($O_3 + NaOH + UT$) a presença do ultrassom pode ter sido uma variável importante no aumento do rendimento quando comparada à Amostra 3 ($O_3 + NaOH$), provavelmente devido a formação das micro-bolhas durante o processo de sonicação, as quais podem formar poros no material, aumentando a acessibilidade enzimática (MOSIER et al., 2005; VELMURUGAN; MUTHUKUMAR, 2011).

Na Figura 23 a quantidade de celulose (linha preta) e lignina (linha cinza), obtida a partir do bagaço após o tratamento, é comparada com a quantidade de glicose (barras) obtida a partir da hidrólise enzimática.

Figura 23. Comparação entre teor de glicose obtido após hidrólise com teor de celulose e lignina obtido pela caracterização do bagaço tratado.



Observa-se que o aumento da celulose e a redução da lignina após o pré-tratamento são os principais fatores para o aumento do rendimento enzimático, tal resultado fica evidenciado nas Amostras 3, 7 e 11 (Figura 24), todas as três amostras tratadas na presença de ozônio e posterior repouso em NaOH por duas horas.

5.5. ANÁLISE ESTRUTURAL POR FTIR-ATR.

As principais bandas de absorção características do material lignocelulósico são listadas na Tabela 5:

Tabela 5. Principais bandas de absorção características de material lignocelulósico.

Tipo de vibração e grupos funcionais	Nº de onda (cm ⁻¹)	Ref.
Vibração do C-H fora do plano em unidades de <i>p</i> -Hidroxifenil. (Lignina)	833	Faix, 1991; Hoareau et al., 2004;
Estiramento em C-O-C de ligações β-glicosídicas β(1→4)	897	Gupta et al., 1987; Moses et al., 2004; Zhang et al., 2011
Originado do estiramento de C-O em celulose, hemicelulose e lignina, ou estiramento de C-O-C em celulose e hemicelulose. (xilanas)	1035	Liu et al., 2007; Ju et al., 2011
Estiramento em C-O-C de ligações β-glicosídicas β(1→4)	1158	Oh, 2005; Zhang et al., 2011
Absorção por C-H e estiramento C-O em grupos acetil de hemiceluloses	1245	Ju et al., 2011; Liu et al., 2007
Estiramento de -CH ₂ em celulose e hemicelulose	1320	Cao e Tan, 2004
Vibração do esqueleto de fenilpropano (lignina)	1426	Tejado et al., 2007
Vibração no anel aromático (lignina)	1440	
Vibração no anel aromático (lignina)	1510	Stewart, 1998; Xu et al., 2006; Liu et al., 2007; Sun et al., 2004b
Vibração no anel aromático (lignina)	1600	
Estiramento em C-O (cetona não conjugada, éster ou grupos carboxílicos)	1728	Hoareau, (2004); Sun et al., 2004b
Estruturas centrais de celulose e hemicelulose (estiramentos C-H)	2906	
Estruturas centrais de celulose e hemicelulose (estiramentos -OH)	3200 - 3500	Yang et al.,(2007); Ju et al., 2011

As bandas de absorção na região de 1440 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹ são associadas à absorção de infravermelho pela presença de lignina (STEWART, 1998). Bandas localizadas na região de 1426 cm⁻¹ correspondem às vibrações do anel aromático de esqueleto fenilpropanóico, típicos de espectros de lignina (TEJADO et al., 2007). Já a banda de absorção em 897 cm⁻¹ é característica das ligações glicosídicas β(1→4) (GUPTA et al., 1987); a banda presente em 833 cm⁻¹ é indicativa da presença de unidades de *p*-hidroxifenil (FAIX, 1991) um dos precursores da lignina e as bandas localizadas em 1158 cm⁻¹ derivam do estiramento do grupo C-O-C de ligações glicosídicas β(1→4) (OH, 2005).

Já as vibrações na região de 1728 cm⁻¹ correspondem ao estiramento da carbonila (HOAREAU, 2004). A presença de carbonila na faixa entre 1730 – 1700 cm⁻¹ e não entre 1675 – 1660 cm⁻¹ indica que a carbonila não está conjugada com o anel aromático (LIU et al., 2008). As bandas localizadas em 1320 cm⁻¹ são atribuídas às vibrações do grupo -CH₂ presentes na celulose e hemicelulose (CAO; TAN, 2004).

As bandas de absorção na região de 3200 a 3500 cm⁻¹ são atribuídas à absorção pela celulose (YANG et al., 2007), mais especificamente ao estiramento O-H. Já a banda 660 cm⁻¹

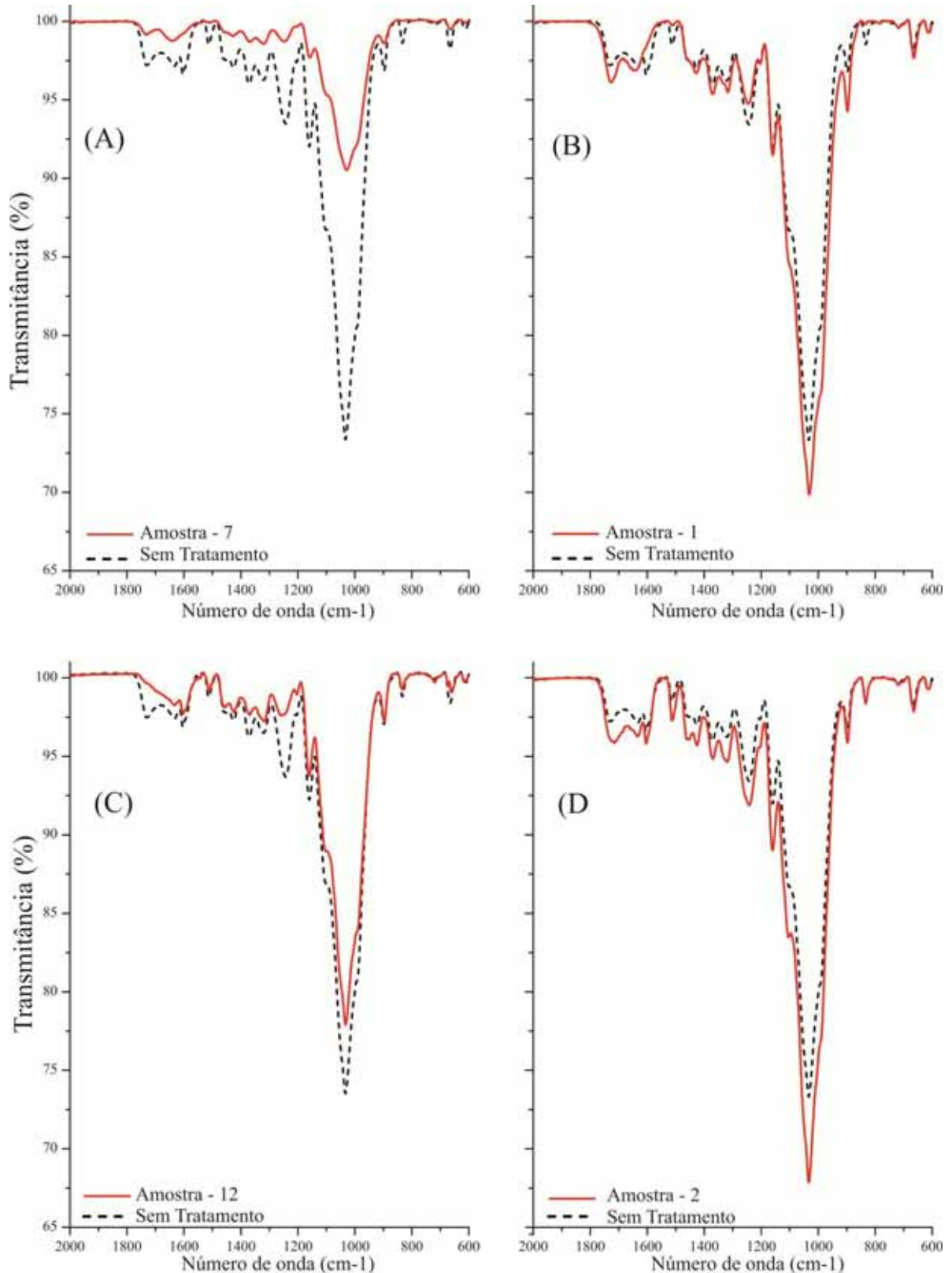
é definida como CO₂ atmosférico (deformação e vibração) e representado como contaminação (GÜNZLER, 2002); por fim, Ju et al. (2011) correlacionam as bandas de absorção nas regiões de 1035, 1245, 2906 cm⁻¹ e de 3200 a 3500 cm⁻¹ como sendo absorções características das estruturas de celulose e hemicelulose.

A partir do espectro da fibra do bagaço de cana de açúcar sem tratamento é possível comparar as modificações ocorridas após o tratamento do bagaço e identificar qual componente do material lignocelulósico foi mais afetado pelo tratamento, a utilização desta técnica juntamente com a análise térmica, quantificação de açúcares fermentescíveis e caracterização química podem dar informações importantes sobre a desestruturação da fibra.

A eficiência do pré-tratamento pôde ser verificada a partir da análise por FTIR-ATR, a partir do espectro de infravermelho do bagaço sem tratamento foi possível comparar as modificações estruturais provocadas após cada tratamento. Verifica-se que com a utilização de ozônio durante o tratamento as bandas de absorção nas regiões de 1600 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹ e 833 cm⁻¹ (Figura 24, A e B) são completamente reduzidas. Nos espectros das amostras com tratamento ácido (Figura 24, B e D) as regiões das bandas de 1440 cm⁻¹ e 1426 cm⁻¹ aumentam, enquanto nos espectros dos tratamentos alcalinos (Figura 24, A e C) essas bandas sofrem reduções. O tratamento ácido sem tratamento por ozônio não modificou a fibra, sendo seu espectro bem próximo ao do espectro sem tratamento (Figura 24, D), todos os espectros de amostras tratadas em meio ácido sem a utilização de ozônio foram semelhantes (Figura 26, B). O tratamento alcalino sem tratamento por ozônio reduziu grande parte das bandas e não apresenta a banda de absorção na região de 1728 cm⁻¹ (Figura 24, C).

Modificações nas bandas de absorção características de Lignina. As bandas de absorção nas regiões de 1440 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹ são associadas à absorção de infravermelho pela lignina (STEWART, 1998; XU et al., 2006). Bandas localizadas na região de 1426 cm⁻¹ correspondem às vibrações do anel aromático de esqueleto fenilpropanóico, típicos de espectros de lignina (TEJADO et al., 2007). A vibração presente em 833 cm⁻¹ é indicativa da presença de unidades de *p*-Hidroxifenil (FAIX, 1991; HOAREAU et al., 2004) um dos precursores da lignina. Devido a semelhança entre os espectros de amostras tratadas com duas variáveis semelhantes, foram selecionadas 4 amostras representativas para serem discutidas, sendo elas: Amostra 1, Amostra 2, Amostra 7 e Amostra 12.

Figura 24. Espectros obtidos por FTIR-ATR do bagaço de cana tratado, (A) Espectro de infravermelho da Amostra 7 em comparação com bagaço sem tratamento; (B) Espectro da Amostra 1 em comparação com o bagaço sem tratamento; (C) Espectro da Amostra 12 em comparação com o bagaço sem tratamento; (D) Espectro da Amostra 2 em comparação com o bagaço sem tratamento.

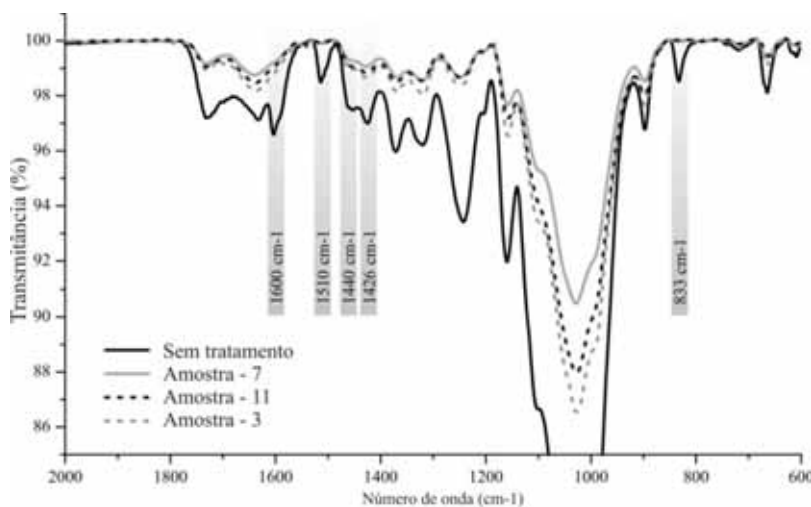


Fonte: elaborada pelo autor.

O espectro da Amostra 7 (Figura 24, A) é o espectro do tratamento no qual se obteve o maior rendimento de glicose durante a hidrólise. Ao comparar o espectro da Amostra 7 com o espectro do bagaço sem tratamento é observado que as bandas nas regiões de 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} e 833 cm^{-1} de absorção pela estrutura da lignina (STEWART, 1998; XU et al., 2006; TEJADO et al., 2007; FAIX, 1991; HOAREAU et al., 2004) sofreram diminuições expressivas.

No tratamento utilizando ozônio em meio ácido (Figura 24, B) ocorre modificações apenas nas bandas em 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 833 cm^{-1} de absorção pela estrutura da lignina, enquanto as bandas em 1426 cm^{-1} e 1440 cm^{-1} não sofreram reduções. Por outro lado, nas amostras sem tratamento por ozônio não ocorrem modificações significativas nas bandas de absorção de lignina, tanto em meio alcalino (Figura 24, C), quanto em meio ácido (Figura 24, D).

Figura 25. Espectros de FTIR-ATR das Amostras - 7, 11, 3 e bagaço sem tratamento



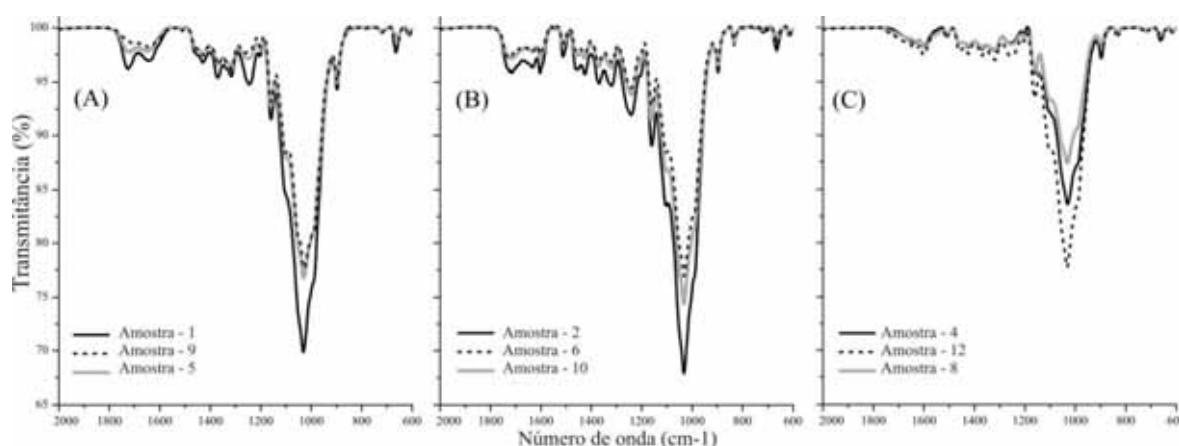
Fonte: elaborada pelo autor.

A utilização de ozônio modificou as 5 principais bandas de absorção da estrutura da lignina na Amostra 7 e também as bandas de absorção da estrutura de hemicelulose, enquanto na Amostra - 1 apenas 3 dessas bandas foram modificadas (regiões de 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 833 cm^{-1}), o que pode explicar o maior rendimento de hidrólise da Amostra 7 em relação à Amostra 1, além disso os espectros das Amostras 7, 11 e 3, todas tratadas em meio alcalino e por ozônio, são muito parecidas nessas regiões (Figura 26).

Modificações nas bandas de absorção pelas estruturas de Celulose e Hemicelulose. A banda em 897 cm^{-1} é da absorção pelas ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (GUPTA et al., 1987; MOSES; FROST, 2004), as bandas localizadas em 1158 cm^{-1} são do estiramento do grupo C-O-C de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ (OH et al., 2005; ZHANG et al., 2011) e a banda localizada na região de 1320 cm^{-1} são de vibrações do grupo $-\text{CH}_2$ presentes na celulose e hemicelulose (CAO; TAN, 2004). Ju et al. (2011) relacionam as bandas em 1245 cm^{-1} , como sendo de absorção das estruturas centrais de hemicelulose. Por fim a banda em 1035 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento de C-O em celulose, hemicelulose ou lignina (LIU et al., 2007; MOSES; FROST, 2004) ou ao estiramento de C-O-C em xilanas (JU et al., 2011). No tratamento com ozônio em meio alcalino (Figura 24, A) ocorre redução nas bandas de absorção pela ligação glicosídica são reduzidos assim como na banda 1245 cm^{-1} de absorção pela hemicelulose, podendo indicar redução da hemicelulose.

No tratamento ácido com tratamento por ozônio, representado pela Amostra 1 algumas bandas atribuídas a absorção pela lignina foram reduzidas, expondo as ligações glicosídicas e aumentando a intensidade da banda 897 cm^{-1} , nessa amostra não foi observado reduções nas bandas atribuídas a ligações glicosídicas ou hemicelulose. Todas as amostras tratadas em meio ácido e ozônio apresentam espectros semelhantes (Figura 26, A).

Figura 26. Espectros obtidos por FTIR- ATR do bagaço de cana tratado, (A) Espectro de infravermelho da Amostra 1, 9 e 5; (B) Espectro da Amostra 2, 6 e 10; (C) Espectro da Amostra 4, 12 e 8.

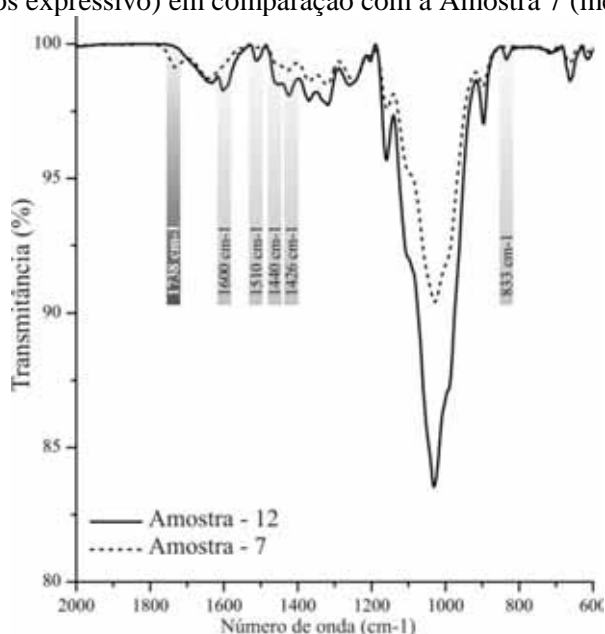


Fonte: elaborada pelo autor.

Modificações na banda de absorção pelo grupo carbonila. As vibrações na região de 1728 cm^{-1} correspondem ao estiramento da carbonila (HOAREAU et al., 2004). A presença de carbonila na faixa entre $1730 - 1700\text{ cm}^{-1}$ e não entre $1675 - 1660\text{ cm}^{-1}$ indica que a carbonila

não está conjugada com o anel aromático (LIU et al., 2008). A banda em 1728 cm^{-1} é maior nos tratamentos ácidos (Figura 24, B e D) e este aumento é atribuído as condições ácidas do meio, já em amostras tratadas em solução alcalina essa banda sofre diminuição. Na Amostra 12 a banda não é observada e sua ausência pode estar relacionada com a formação de ácidos fracos, inibidores da fermentação.

Figura 27. Espectros obtidos por FTIR-ATR do bagaço de cana tratado. Espectro da Amostra 12 (tratamento menos expressivo) em comparação com a Amostra 7 (melhor tratamento).



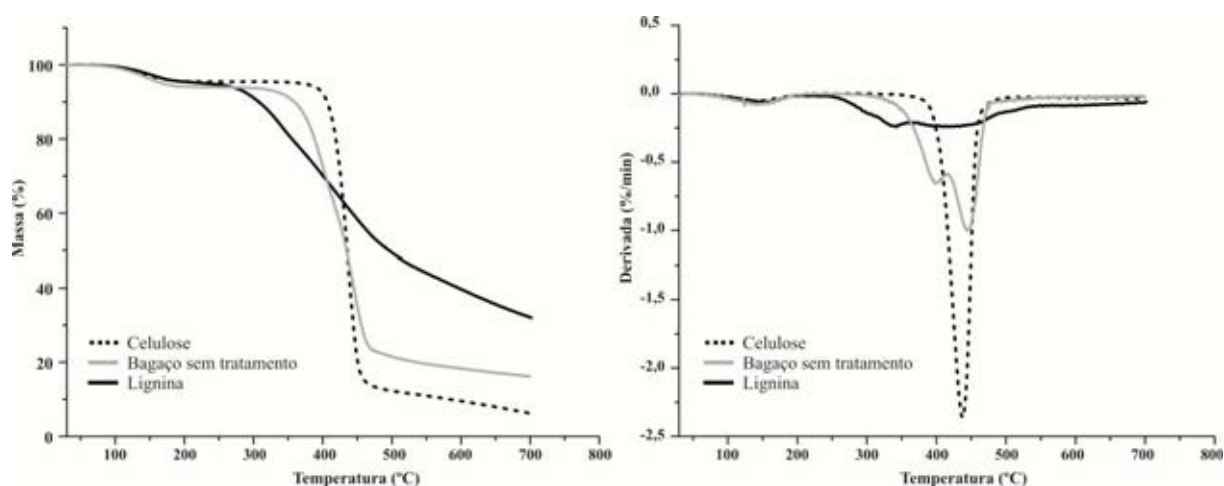
Fonte: elaborada pelo autor.

O maior rendimento durante a hidrólise enzimática foi observado na Amostra 7, enquanto o menor rendimento foi observado na Amostra 12. As principais diferenças entre os espectros dessas amostras são: as bandas de absorção pela estrutura da lignina 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} , 1440 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} e 833 cm^{-1} que não são visualizados no espectro da Amostra 7, e a banda em 1728 cm^{-1} que não é visualizado no espectro da Amostra 12. (Figura 27). Entender o que ocorre nessas regiões é importante para o desenvolvimento de um tratamento efetivo. Todas as três amostras tratadas em meio alcalino e sem o tratamento por ozônio possuem espectros similares (Figura 27, C).

5.6. ANÁLISE TÉRMICA POR TGA

Nas análises por TGA foram extraídas as seguintes informações: T_{onset} – temperatura de início da degradação; T_{endset} – temperatura do final da degradação; ΔT – variação entre T_{endset} e T_{onset} ($T_{\text{endset}} - T_{\text{onset}}$) e $T_{\text{máx}}$, temperatura onde ocorreu a maior perda de massa. Durante a decomposição térmica a água é liberada na temperatura de aproximadamente 100°C, nessa temperatura todos os termogramas apresentaram um primeiro evento de perda de massa de aproximadamente 7% atribuído à umidade do material (Figura 28 e Figura 29) na temperatura de aproximadamente 240°C algumas ligações químicas começam a se desfazer e ocorre o início da desestruturação térmica do material.

Figura 28. TGA e DTG do bagaço sem tratamento lignina e padrão de celulose.



Fonte: elaborada pelo autor.

A lignina e a hemicelulose degradam em temperaturas mais baixas do que a celulose, entretanto quando é iniciada a degradação de um dos componentes do material, todos os outros são degradados, sobrepondo-se os eventos. A lignina tem uma faixa ampla de degradação começando em aproximadamente 237°C e terminando em aproximadamente 510°C (Tabela 6, Figura 28), já a hemicelulose geralmente degrada na faixa de 280°C a 400°C e é representada como um ombro na DTG do bagaço sem tratamento (POLETTI et al., 2012;), por fim a celulose tem faixa curta de degradação entre 374°C e 425°C (Tabela 6, Figura 28).

Tabela 6. Tabela de valores obtidos por TGA e DTG do bagaço sem tratamento (in natura) e de padrões de lignina e celulose.

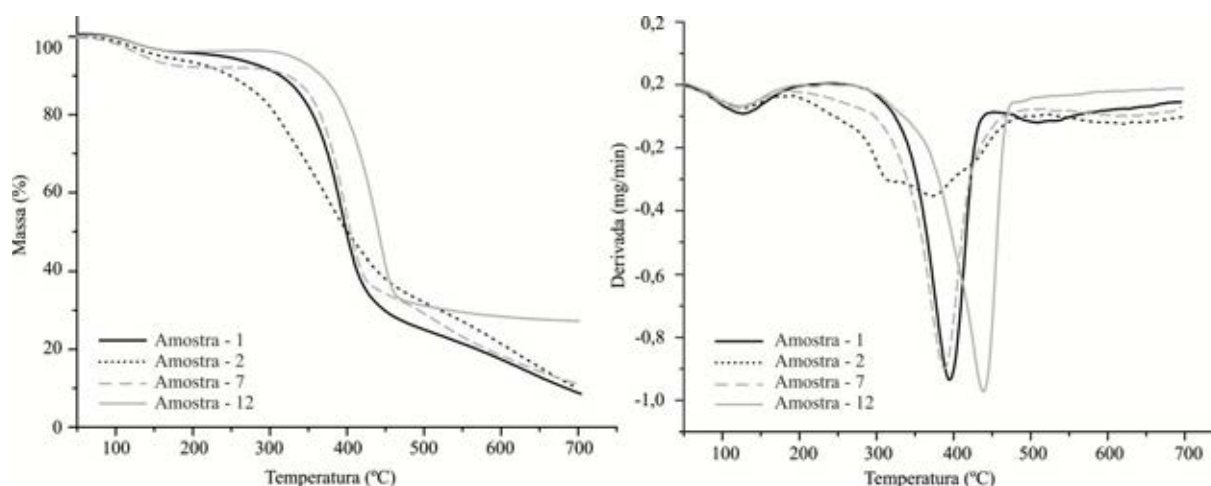
Amostras	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔT(°C)	T _{máx} (°C)
Lignina	237	510	273	324
Celulose	374	425	51	405
<i>In natura</i>	312	440	128	434

Fonte: elaborada pelo autor.

A partir do observado com dados experimentais é possível estabelecer que as bandas mais largas nos termogramas são atribuídas à maior quantidade de lignina, enquanto a presença de um ombro em aproximadamente 350°C indica relativa abundância de hemicelulose e, por fim, a intensidade do pico da DTG está atribuída à estabilidade térmica da celulose.

Análise térmica das Amostras – 1, 2, 7, 12. É possível apontar que a amostra com maior T_{onset} é mais estável termicamente e possui maior quantidade de celulose. A Amostra - 7 (Figura 29) possui valores de: T_{onset}; T_{endset} e T_{máx} muito parecidos com os do termograma do padrão de celulose (Figura 29), confirmando o elevado grau de celulose observado através da caracterização química (Tabela 3, pág. 35). Já a Amostra - 1 (Figura 29) possui baixo valor de T_{onset} e elevado valor de T_{endset}, duas características térmicas do padrão de lignina, indicando elevado teor deste componente nessa amostra após o tratamento, observação que está de acordo com a caracterização química (Tabela 3, pág. 35) e também com o observado por espectroscopia no infravermelho (Figura 24, D, pág. 41).

Figura 29. Termogramas de TGA e DTG das amostras 1, 2, 7 e 12.



Fonte: elaborada pelo autor,

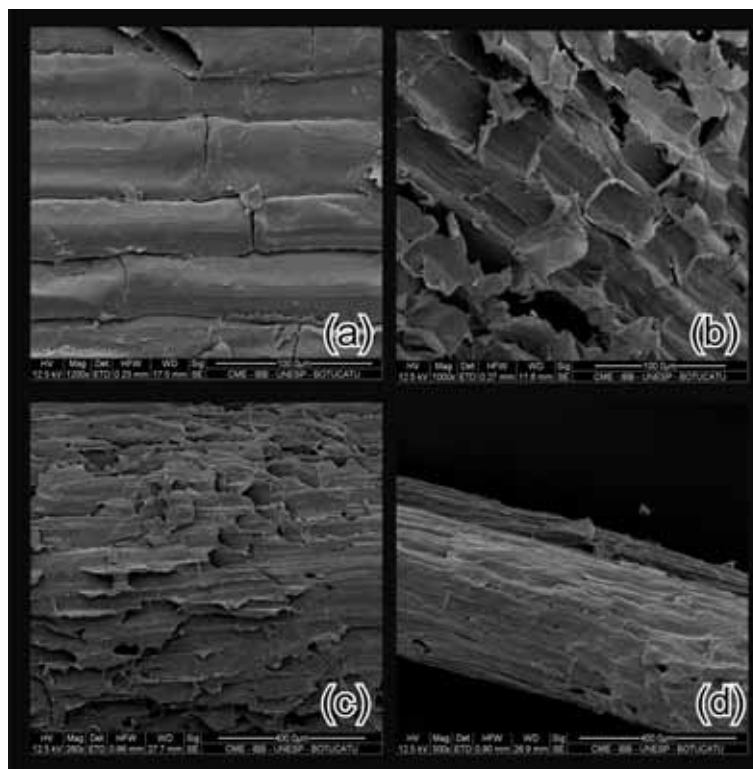
Os termogramas das Amostras 1 e 12 estão de acordo com a quantidade de celulose disponível (Tabela 3, pág. 35), porém os rendimentos enzimáticos destas amostras foram abaixo do esperado. A relação com o rendimento da hidrólise enzimática não pode ser feita a partir de análises térmicas, uma vez que outros fatores influenciam no rendimento enzimático, como por exemplo, os inibidores enzimáticos (XIMENES et al., 2010a, 2010b), e não somente a disponibilidade de celulose.

5.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar na superfície do material, as alterações estruturais causadas pelo tratamento com ozônio nos diferentes meios (ácido ou alcalino). Para tais análises foram selecionados as seguintes amostras: 1) fibra sem tratamento; 2) fibra tratada apenas com ozônio; 3) fibra tratada com ozônio e posterior repouso em meio ácido (Amostra 1) e 4) fibra tratada com ozônio e posterior repouso em meio alcalino (Amostra 3).

O bagaço sem tratamento não apresenta sinal de dano aparente, as células estão compactas e lisas (Figura 30), após a aplicação do ozônio e também ozônio e posterior repouso em H_2SO_4 observa-se modificação na superfície do material como aparente eriçamento, rompimento e perda de material (ou: placas rompidas e destacadas), podendo indicar degradação parcial do material.

Figura 30. Microscopia eletrônica de varredura das amostras: a) *In natura*: fibra sem tratamento; b) Somente O₃: fibra tratada apenas com ozônio; c) O₃ + H₂SO₄: fibra tratada com ozônio e posterior repouso em meio ácido (Amostra 1); d) O₃ + NaOH: fibra tratada com ozônio e posterior repouso em meio alcalino (Amostra 3).



Nas imagens da amostra tratada em ozônio e repouso em meio alcalino (O₃ + NaOH) o material apresenta uma superfície mais lisa, isto se deve ao fato do hidróxido de sódio ter atuado na remoção da hemicelulose (KAUR et al., 2012).

5.8. UTILIZAÇÃO DA AMOSTRA 7 PARA ESTUDOS NA VARIAÇÃO NO TEMPO DE OZONÓLISE

A utilização de ozônio e posterior lavagem com hidróxido de sódio assistido por ultrassom demonstrou ser um ótimo conjunto para o tratamento do bagaço de cana de açúcar visando à produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática. O ozônio é um poderoso oxidante que age nas ligações duplas da estrutura da lignina, em condições alcalinas a ação do ozônio é mais severa, pois é degradado levando a formação de radicais hidroxilas, nessas condições o ozônio torna-se inespecífico podendo degradar os carboidratos presentes na fibra. Com base nisso, busco-se variar o tempo de ozonólise no melhor tratamento obtido neste projeto (Amostra – 7 (O₃ + NaOH + UT)), a fim de conhecer a melhor relação quantidade de ozônio / quantidade de bagaço.

Para cada tempo de exposição da fibra à ozonólise, é produzida uma quantidade de ozônio que pôde ser calcular a partir do método *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 1998), foram realizado 9 tratamentos variando-se o tempo de exposição e conseqüentemente a quantidade de ozônio produzida por grama de bagaço. O gerador de ozônio foi regulado com potencia de 50% e a quantidade de ozônio gerado nessas condições foram de 32 mg min⁻¹, para cada coluna de tratamento foram adicionados 20 g de bagaço. Na coluna com tratamento de 60 minutos, por exemplo, foram produzidos 1920 mg de ozônio (32 mg min⁻¹ . 60 min), correspondente a 96 mg de ozônio para cada grama de bagaço (1920 mg de ozônio produzido em 60 minutos / 20 g de bagaço adicionados na coluna).

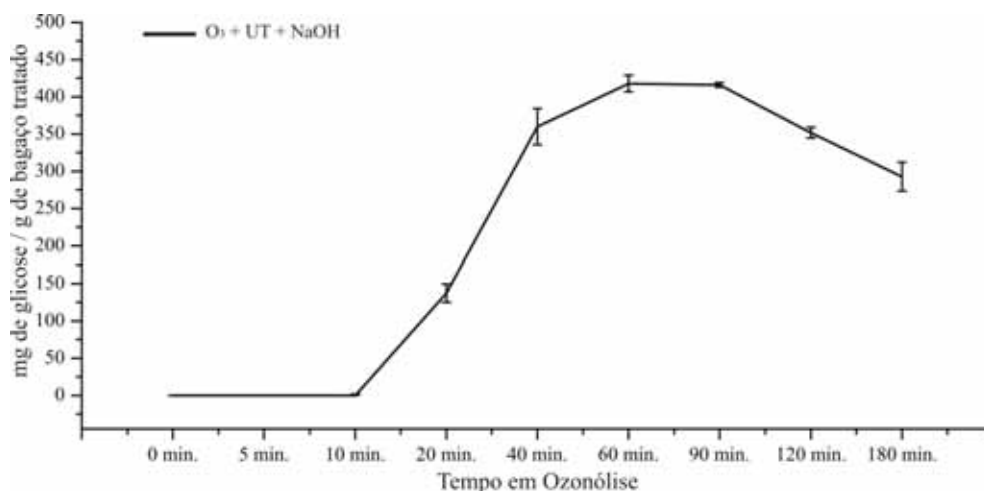
No tempo de exposição 0 (zero) foi utilizado apenas lavagem com hidróxido de sódio assistido por ultrassom, os demais tratamentos seguiram da seguinte maneira: exposição ao ozônio no tempo determinado (5, 10, 20, 40, 60, 90, 120 e 180 minutos), homogeneização da fibra após a ozonólise, repouso em solução de NaOH (0,1 mol L⁻¹) com 5 minutos iniciais assistidos por ultrassom, filtragem da porção líquida e por fim, utilização da fração sólida na hidrólise enzimática, avaliação térmica por TGA, análise da cristalinidade por difração de raios-X, caracterização química, e avaliação estrutural por espectroscopia no infravermelho.

5.8.1. Hidrólise enzimática de tratamentos em diferentes tempos de ozonólise

Os bagaços tratados em diferentes tempos de ozonólise foram submetidos à hidrólise enzimática com enzima comercial para conhecer os efeitos do tratamento por ozônio no rendimento enzimático.

A hidrólise seguiu-se da seguinte maneira, 0,25 mg de bagaço tratado foram pesados e colocados em tubos, logo em seguida foi adicionado 10 mL de enzima comercial Prozyn® correspondente a 0,1 mg mL⁻¹ de proteínas. Os tubos foram então submetidos a banho com temperatura a 60°C e agitação orbital de 150 rpm por 24 horas. Depois de decorrido o tempo, as amostras foram filtradas e o sobrenadante foi utilizado para quantificação de glicose por HPLC. Os valores obtidos são encontrados na Figura 31. O experimento foi realizado em triplicata.

Figura 31. Glicose obtida após hidrólise enzimática de tratamentos em diferentes tempos de ozonólise com enzima comercial Prozyn®, em tratamentos completos (O₃ + NaOH + Ultrassom (UT)).



Fonte: elaborada pelo autor.

Observa-se a partir da Figura 31 que para o tratamento completo (NaOH + Ultrassom + O₃) ocorre um aumento no rendimento enzimático até o tempo de 40 minutos em ozônio, a partir deste ponto ocorre uma estabilização até 90 minutos de ozônio, por fim o rendimento começa a diminuir em 120 e continua diminuindo em 180 minutos. O baixo rendimento da enzima em tempos menores ou iguais a 10 minutos pode estar relacionado com a baixa remoção de lignina e/ou a quebra parcial da lignina. A partir dos 10 minutos os resultados são mais aparentes. Transcorridos de 40 a 90 minutos possivelmente a maior parte da lignina


presente foi degradada pela ação do ozônio. Ao aumentar o tempo de ozonólise para 120 e 180 a lignina possivelmente é totalmente desestruturada e nesta etapa o ozônio começa a agir na degradação dos carboidratos, diminuindo a quantidade de carboidratos disponíveis para a hidrólise.

5.8.2. Análise por TGA

Na Tabela 7 estão representados os dados obtidos por TGA e DTG das amostras submetidas a diferentes tempos de ozonólise, nesta Tabela foi determinado que a tendência para a coloração preta indicasse que os valores são característicos do padrão de celulose, já a tendência para a coloração branca indica que os valores são característicos do padrão de lignina. Em resumo, a coloração preta indica tendência à maior quantidade de celulose, termogramas mais próximos aos do padrão de celulose e amostras mais estáveis termicamente.

Tabela 7. Tabela com dados obtidos por TGA e DTG para amostras com tempos variados de ozonólise.

Amostras	T _{onset} (°C)	T _{endset} (°C)	ΔT (°C)	T _{máx} (°C)	Glicose mg g
Sem O ₃	319	409	90	375	*
O ₃ -5 min.	325	407	82	375	*
O ₃ -10 min.	324	407	83	378	*
O ₃ -20 min.	331	417	86	392	137±12
O ₃ -40 min.	327	412	85	383	359±24
O ₃ -60 min.	332	418	86	393	417±11
O ₃ -90 min.	353	424	71	401	416±3
O ₃ -120 min.	325	402	77	377	351±7
O ₃ -180 min.	330	413	83	388	293±20

Lignina  Celulose

*Não detectado pelo método empregado.

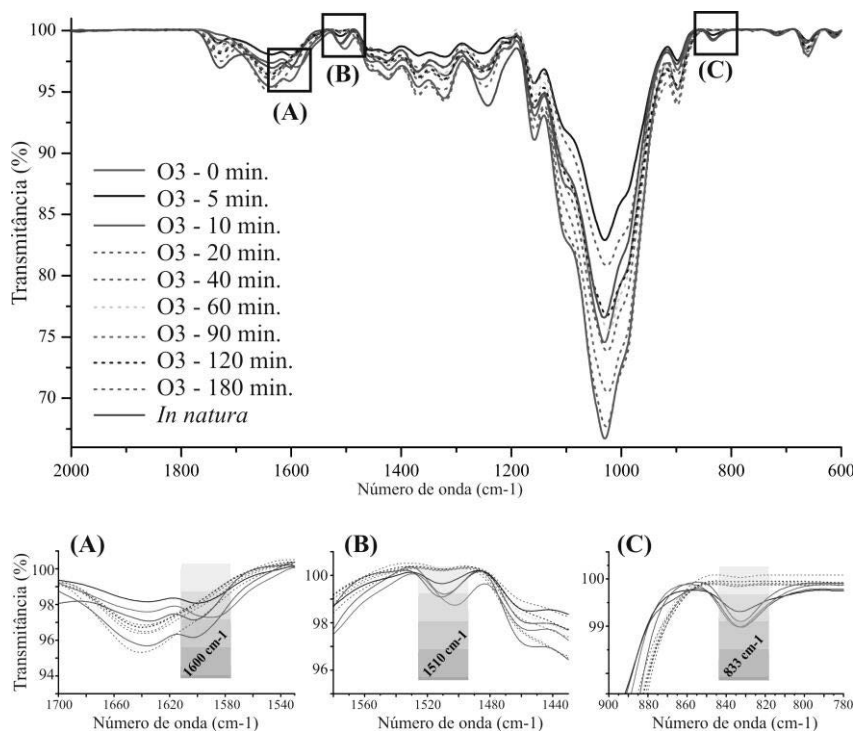
A partir da análise dos dados obtidos pelos termogramas é possível observar que as amostras com termogramas mais parecidos com o da celulose foram às amostras tratadas entre 20 e 90 minutos de ozônio, sendo que nas amostras de 40 a 90 minutos foram obtidos os melhores rendimentos após a hidrólise enzimática, indicando que bagaços tratados nessas condições possuem maior porcentagem de celulose e conseqüentemente menor teor de lignina.

A maior estabilidade térmica do material esta relacionada ao teor de celulose presente, sendo mais estável quanto maior for a quantidade da porção cristalina desta celulose (SUN et al., 2004b).

5.8.3. Análise estrutural por FTIR-ATR para amostras com diferentes tempos de ozonólise

A análise estrutural por infravermelho de amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise teve como foco as bandas onde foram encontradas as maiores modificações em relação ao bagaço sem tratamento (*in natura*), neste caso, as bandas localizadas em 1600 cm^{-1} (Figura 32, A), 1510 cm^{-1} (Figura 32, B) e 833 cm^{-1} (Figura 32, C), todas atribuídas a absorção pela estrutura da lignina.

Figura 32. Bandas seleccionadas no espectro de infravermelho para amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise. (A) banda localizada em 1600 cm^{-1} ; (B) banda localizada em 1510 cm^{-1} ; (C) banda localizada em 833 cm^{-1} .



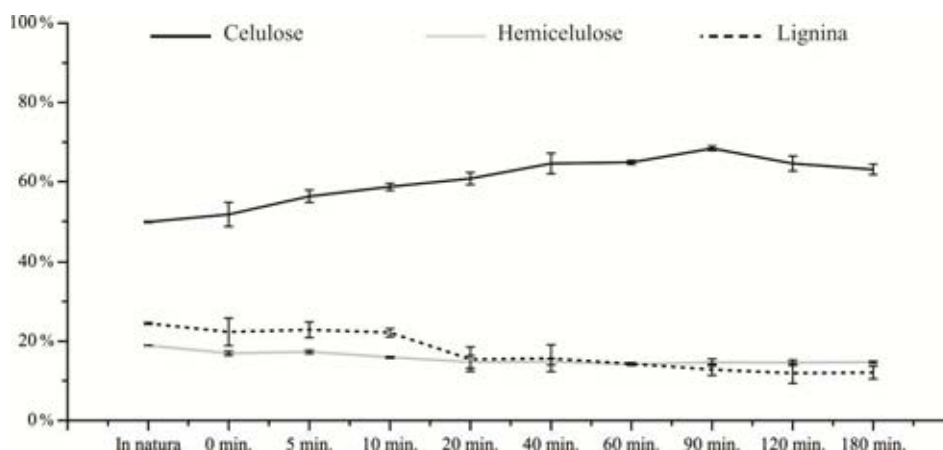
Observa-se que tempos de ozonólise maior ou igual a 20 minutos (linhas tracejadas) o espectro de infravermelho das amostras não apresentam mais a banda na região de 1600 cm^{-1} , 1510 cm^{-1} e 833 cm^{-1} enquanto em tempos superiores apresentam (Figura 32, A, B e C).

Esses dados, obtidos a partir de análise por infravermelho, indicam a ausência ou elevada redução da lignina presente nesses tratamentos e estão de acordo com o observado por análises térmicas e pela análise do rendimento enzimático. Amostras com tempos menores de 20 minutos (linhas contínuas) não tiveram a lignina afetada pelo tratamento (Figura 32, A, B e C).

5.8.4. Caracterização química da fibra em diferentes tempos de ozonólise

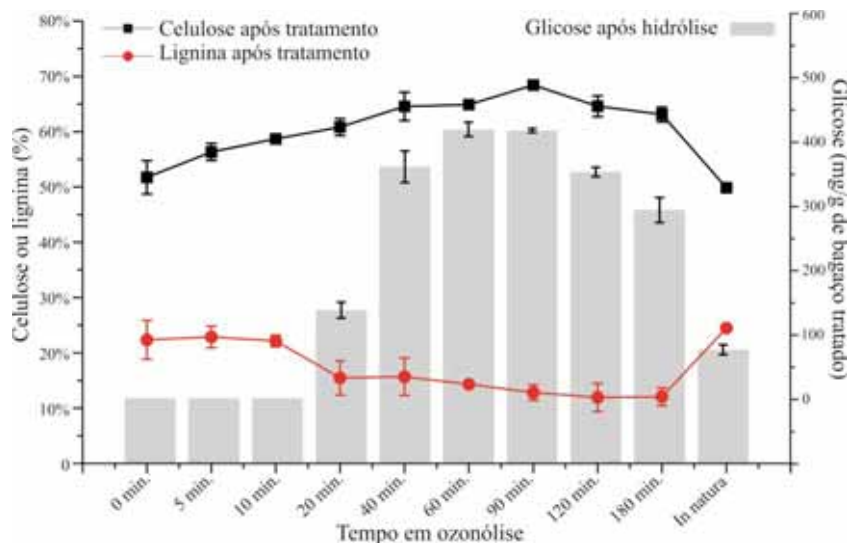
Em concordância com as análises por espectroscopia no infravermelho e análise térmica, a quantidade de lignina diminui nas amostras tratadas entre 20 e 90 minutos e em reposta ocorre o aumento da celulose nesses períodos (Figura 33).

Figura 33. Caracterização química dos tratamentos de bagaço de cana de açúcar em diferentes tempos de ozonólise.



A partir da caracterização observa-se que ocorre aumento na porcentagem de celulose presente na amostra até 90 minutos de exposição em ozônio, a partir de 90 minutos ocorre a diminuição da quantidade de celulose o que é explicado pela degradação dos carboidratos (celulose) devido a excessiva exposição em ozônio. A lignina tem um pico de degradação entre 10 e 20 minutos confirmando o analisado a partir de infravermelho. Após 180 minutos em ozonólise ocorre pelo menos a degradação de metade da lignina presente na fibra (Figura 33).

Figura 34. Comparação entre teor de glicose obtido após hidrólise com teor de celulose e lignina obtido pela caracterização química do bagaço tratado em diferentes tempos de ozonólise.

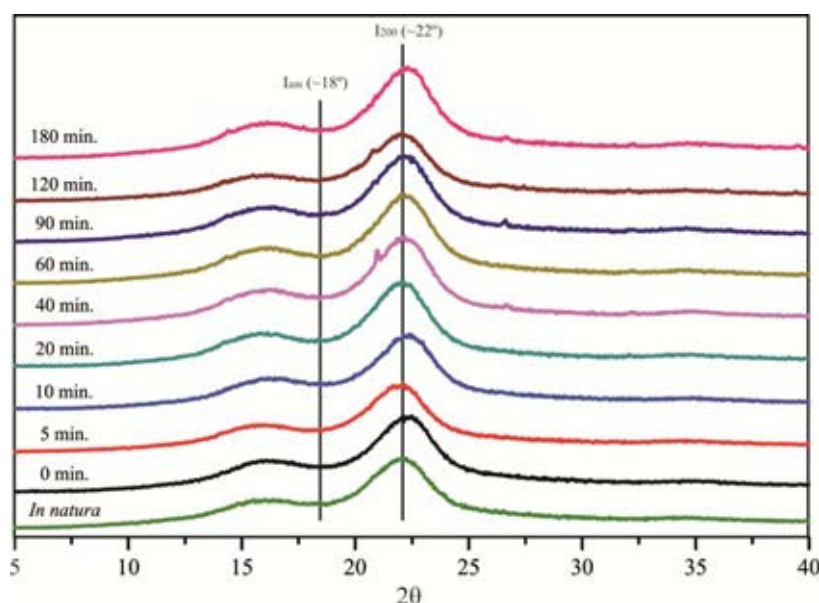


Ao comparar o rendimento enzimático com a composição dessas fibras (Figura 34) é possível observar que o baixo teor de lignina frente à elevada disponibilidade de celulose são os fatores determinantes para as amostras tratadas entre 40 a 90 minutos em ozônio terem o melhor rendimento enzimático.

5.8.5. Difração por Raios - X

Com esta técnica buscou-se calcular o índice de cristalinidade de cada amostra. O aumento da cristalinidade do material lignocelulósico está amplamente relacionado com o grau de cristalinidade da celulose, após os tratamentos com a remoção da lignina e da hemicelulose a disponibilidade de celulose é aumentada, portanto espera-se que o teor de celulose cristalina e também o teor de celulose amorfa aumente, por outro lado se o tratamento afetar as ligações de hidrogênio, da porção cristalina da celulose, pode ocorrer uma diminuição no índice de cristalinidade. Tem sido observado que a utilização de meio alcalino no tratamento reduz o índice de cristalinidade do material (MARYANA et al., 2014; ZHU et al., 2012; PENG et al., 2014) Maryana et al, (2014) observou um decréscimo de 35 % no I_{Cr} , já Zhu et al (2012) observou um decréscimo de 39% para 20.81% após o tratamento com $NH_4OH-H_2O_2$ e líquido iônico, ambos os autores relacionaram o decréscimo com modificações causadas na morfologia da celulose.

Figura 35. Difratomogramas de Raio-X de amostras tratadas em diferentes tempos de ozonólise. I_{am} – intensidade do pico amorfo em aproximadamente 18° , I_{200} – Intensidade do pico cristalino em aproximadamente 22° .



Por outro lado a maioria dos trabalhos apresentaram aumento no índice de cristalinidade, tanto em tratamentos alcalinos (HE et al., 2008; VELMURUGAN; MUTHUKUMAR, 2012; VELMURUGAN; MUTHUKUMAR, 2011; BINOD et al., 2012) quanto em tratamentos em meio ácido (SINDHU et al., 2010; SINDHU et al., 2013).

Tabela 8. Índice de cristalinidade calculado pelo método da intensidade dos picos conforme proposto por Segal et al, (1959). I_{am} – intensidade do pico amorfo em aproximadamente 18° , I_{200} – Intensidade do pico cristalino em aproximadamente 22° .

Amostra	I_{am}	I_{200}	I_{Cr} (Segal)
O_3 – 0 min.	677	1909	65
O_3 – 5 min.	600	1677	64
O_3 – 10 min.	656	1871	65
O_3 – 20 min.	679	2110	68
O_3 – 40 min.	722	2209	67
O_3 – 60 min.	716	2211	68
O_3 – 90 min.	708	2140	67
O_3 – 120 min.	542	1664	67
O_3 – 180 min.	719	2267	68
<i>In natura</i>	533	1302	59

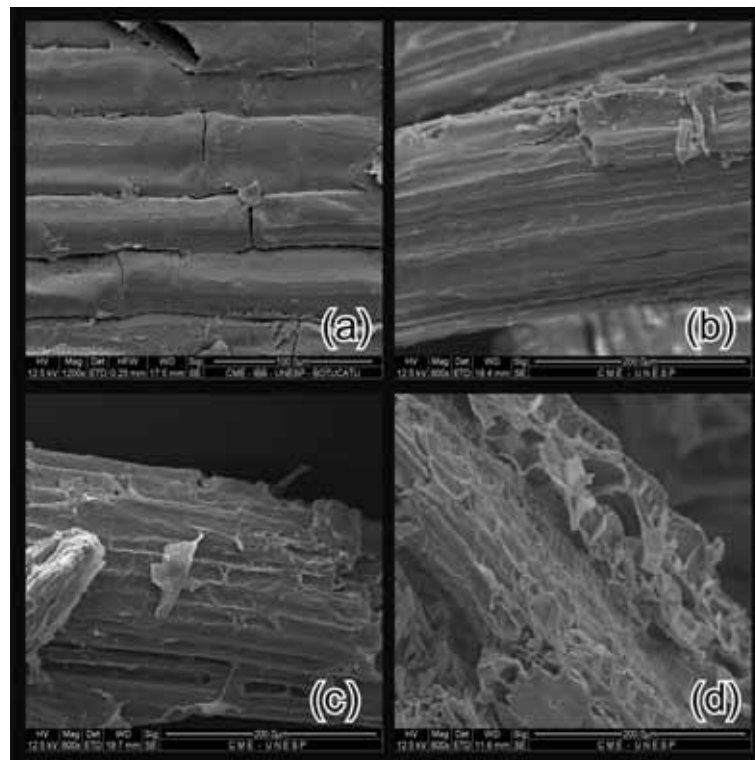
A partir do cálculo do índice de cristalinidade das amostras contidas na Figura 35, observa-se que o valor do I_{CR} é muito próximo para todas as amostras após 20 minutos de tratamento, variando entre 67 e 68%, ao observar a coluna do I_{200} (intensidade do cristalino) (Tabela 8) observa-se que na medida em que a intensidade do pico cristalino aumenta,

aumenta-se também a intensidade do pico amorfo, indicando que o aumento na cristalinidade do material deve-se ao aumento da disponibilidade de celulose, uma vez que após os tratamentos a lignina e hemicelulose são removidas, assim como observado a partir das análises por espectroscopia no infravermelho e caracterização química. Portanto o aumento no índice de cristalinidade de tais amostras deve-se principalmente ao aumento da disponibilidade de celulose, sendo que o tratamento proposto aparentemente não afeta a porção cristalina da celulose

5.8.6. Microscopia

Microscopia eletrônica de varredura. Para análise de microscopia foram selecionadas três amostras principais, em ordem crescente de tempo em ozonólise, sendo elas: 5, 60 e 180 minutos em ozonólise, além do bagaço *in natura*. Com esta técnica pretendeu-se avaliar a amplitude da desestruturação da fibra nos diferentes tempos de ozonólise e determinar se há uma relação entre a quantidade de ozônio utilizada e a desestruturação superficial do material.

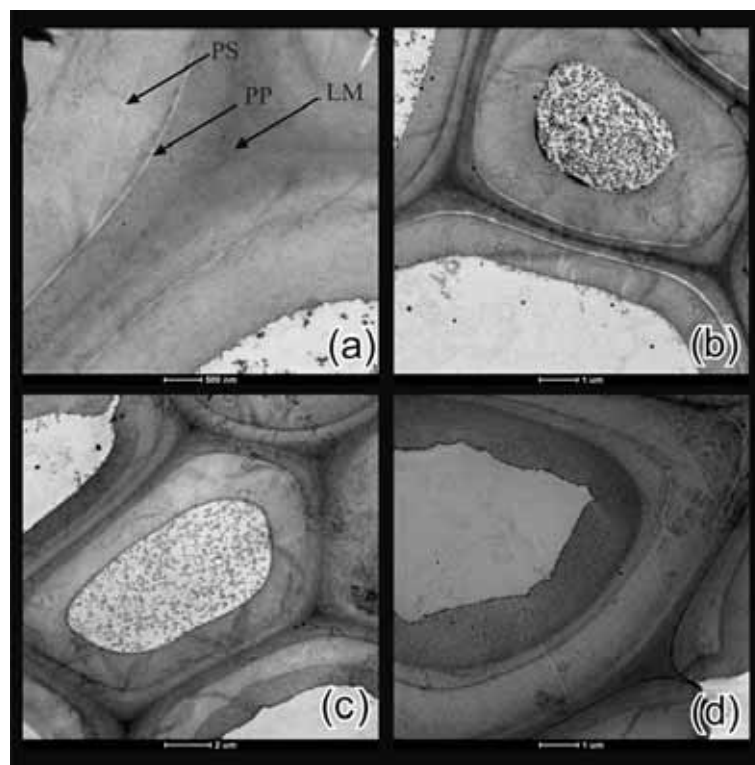
Figura 36. Eletromicrografia de varredura da fibra: a) *in natura* e tratada com: b) 5 min, c) 60 min, e d) 180 minutos em ozônio.



Observa-se uma mudança morfológica ultraestrutural da superfície do bagaço após todos os pré-tratamentos, quando comparados com o material controle. No bagaço controle pode-se observar uma superfície lisa e, portanto, uma nítida preservação da fibra do bagaço decana (Figura 36, a)). A medida que o tratamento com ozônio é mais severo o dano causado na fibra vai se intensificando e algumas placas são rompidas e destacadas do material na fibra vai se intensificando e algumas placas são rompidas e destacadas do material (Figura 36, c) e d)), isto indica que com o aumento da intensidade do tratamento ocorre o aumento da desestruturação do material, assim como observado em outros trabalhos (CHEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2014; CHANDEL et al., 2013; CHEN et al., 2012).

Microscopia eletrônica de transmissão. Para esta análise foram selecionadas três amostras principais em ordem crescente de tempo em ozonólise, sendo elas: 5, 60 e 180 minutos em ozonólise, além do bagaço *in natura*. Com esta técnica pretendeu-se avaliar qual estrutura da parede celular vegetal (lamela média, parede primária e parede secundária) foi a mais afetada pelo tratamento por ozônio.

Figura 37. Eletromicrografia de transmissão da fibra *in natura* e tratada com 5, 60 e 180 minutos em ozônio; LM – lamela média, PP- parede celular primária, PS – parede celular secundária.



Observa-se mudanças na morfologia ultra-estrutural das paredes celulares do bagaço após todos os pré-tratamentos, comparativamente ao controle (Figura 37). As análises estão baseadas na observação apenas das paredes celulares do bagaço (paredes primária, secundária e lamela média), já que a coleta do material após a extração do caldo de cana de açúcar restando apenas essas estruturas, portando todo o conteúdo protoplasmático (membrana plasmática, citoplasma e núcleo) foi removido durante o processo. A partir da eletromicrografia de transmissão (Figura 37) é possível observar as estruturas: parede primária, parede secundária e lamela média. No bagaço sem tratamento (Figura 37, a)), não observamos diferenças na eletrón-densidade, e as estruturas citadas acima, estão preservadas e não demonstram nenhum sinal de dano. A densidade eletrônica de cada fotografia pode ser utilizada para indicar a abundância de material celular em cada estrutura, quando observado os tratamentos com ozônio (Figura 37, c) e d)) as estruturas lamela média e parede celular primária são preservadas e não apresentam danos aparentes, já na parede celular secundária ocorre significativa diminuição na densidade eletrônica, o que indica redução deste componente celular. Visto que a maior quantidade de lignina do material lignocelulósico está contida na parede celular secundária, pode-se afirmar que a utilização da ozonólise no tratamento do material lignocelulósico atacou principalmente a parede celular secundária na qual está contida lignina. Estando esses dados de acordo com a redução da lignina observada a partir da caracterização química (Tabela 3, pág. 35).

6. CONCLUSÃO

Os tratamentos utilizando ozônio e posterior repouso em NaOH realizado nas Amostras – 3 ($O_3 + NaOH$), 7 ($O_3 + NaOH + UT$) e 11 ($O_3 + NaOH + MO$) foram os tratamentos onde obteve-se o maior rendimento de glicose durante a hidrólise enzimática, e isto se deve ao fato da redução da lignina, principalmente pela ação do ozônio e posterior remoção de hemicelulose pela ação do meio alcalino. Com a utilização do FTIR-ATR foi possível visualizar o efeito dos tratamentos nas diversas regiões da fibra e comprovar a redução da lignina para as amostras citadas. Por outro lado a ação das irradiações por micro-ondas e ultrassom durante os tratamentos somente demonstraram efeitos nas condições específicas de meio alcalino com tratamento anterior com ozônio ou em meio ácido sem o tratamento anterior com ozônio e seus efeitos foram imperceptíveis nos espectros de infravermelho. Utilizando os dados da caracterização pode-se afirmar ainda que o ultrassom

intensifica a remoção de hemicelulose e as micro-ondas por sua vez intensificam a remoção da lignina nessas condições.

A variação no tempo de ozonólise durante o tratamento demonstra a necessidade em utilizar uma quantidade controlada de ozônio para que ocorra a desestruturação desejada da lignina presente na fibra. A maior quantidade de celulose disponível foi obtida com o bagaço exposto entre 40 e 90 minutos em ozônio, correspondente a uma produção de aproximadamente 64 a 144 mg de ozônio / g de bagaço. Já com a análise térmica por TGA foi possível observar que a maior estabilidade térmica das amostras está amplamente relacionada ao grau de celulose presente na fibra após o tratamento. A análise por espectroscopia por infravermelho possibilitou uma resposta rápida frente à redução da lignina, com a análise por raios-X foi possível determinar que a celulose cristalina não é afetada durante o pré-tratamento, e por fim, a caracterização da fibra permitiu comprovar o observado a partir das técnicas anteriores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, U. P. Raman imaging to investigate ultrastructure and composition of plant cell walls: distribution of lignin and cellulose in black spruce wood (*Picea mariana*). *Planta*, v. 224, n. 5, p. 1141–53, 2006.
- ALIYU, M.; HEPHER, M. J. Effects of ultrasound energy on degradation of cellulose material. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 7, p. 265-268, 2000.
- AMEN-CHEN, C.; PAKDEL, H.; ROY, C. Production of monomeric phenols by thermochemical conversion of biomass. *Bioresource Technology*, review, v. 79, p. 277-299, 2001.
- APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. ed. 20, Washington, American Public Health Association, p. 2-42, 1998.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTILLA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology*, review, v. 29, p. 719-739, 2005.
- BARAKAT, A.; MONLAU, F.; SOLHY, A.; CARRERE, H. Mechanical dissociation and fragmentation of lignocellulosic biomass: Effect of initial moisture, biochemical and structural proprieties on energy requirement. *Applied Energy*, v. 142, p. 240–246, 2015.
- BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, v. 37, p. 109-116, 2012.

- BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Sugars and chemicals from cellulose, *Chemical Engineering*, review, p. 71-119, 1982. apud LI, C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H. V.; AUER, M.; VOGEL, K. P.; SIMMONS, B. A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4900-4906, 2010.
- CAO, Y.; TAN, H. Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment. *Journal of Molecular Structure*, v. 705, p. 189-193, 2004.
- CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A.; SILVA, M. B.; SILVA, S. S. DA. Unraveling the structure of sugarcane bagasse after soaking in concentrated aqueous ammonia (SCAA) and ethanol production by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Biotechnology for biofuels*, v. 6, p. 102, 2013.
- CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The Xylanolytic Enzyme System from the Genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.
- CHEN, W. H.; TU, Y. J.; SHEEN, H. K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*, v. 88, p. 2726-2734, 2011.
- CHEN, W.-H.; YE, S.-C.; SHEEN, H.-K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. *Applied Energy*, v. 93, p. 237-244, 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.
- EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties , 1 Naturally occurring xylans structures , isolation procedures and properties. , v. 556, n. 9, p. 542-556, 2000.
- EIA (Energy Information Administration). *Official Energy Statistics from the US Government*, 2011.
- FAIX, O. Classification of lignin from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. *Holzforchung Journal*, v. 45, p. 21-27, 1991.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood, chemistry ultrastructure, reactions*. New York: Walter de Gruyter, 1984. p.167-181.
- FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On Tyrosine And Tryptophane Determinations In Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 73, p. 627, 1927.
- GARCÍA-CUBERO, M. A T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource technology*, v. 100, n. 4, p. 1608-13, 2009.

- GIERER, J. Chemistry of delignification. *Wood Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 1–33, 1986.
- GLAZE, W.H.; KANG, J. W.; CHAPIN, D. H. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide, and ultraviolet radiation. *Ozone: Science & Engineering*, v. 9, p. 335-352, 1987. apud TEZCANLI-GÜYER, G.; INCE, N. H.; Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes. *Ultrasonics*, v. 42, p. 603-609, 2004.
- GÔMEZ, C. H. R. J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. 1985. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.
- GÜNZLER, H.; GREMLICH, U. *IR Spectroscopy – An introduction*. Weinheim. Wiley-VCH, 2002.
- GUPTA, S.; MADAN, R.N.; BANSAL, M.C. Chemical composition of *Pinus caribaea* hemicelluloses. *Tappi Journals*, 1987.
- HE, Y.; PANG, Y.; LIU, Y.; LI, X.; WANG, K. Physicochemical Characterization of Rice Straw Pretreated with Sodium Hydroxide in the Solid State for Enhancing Biogas Production. *Energy & Fuels*, v. 22, n. 4, p. 2775–2781, 2008.
- HOAREAU, W.; WANDERSON, G. T.; SIEGMUND, B.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability, *Polymer Degradation and Stability*, v. 86, p. 567-576, 2004.
- INCE, N. .; TEZCANLI, G.; BELEN, R. .; APIKYAN, İ. . Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 29, n. 3, p. 167–176, 2001.
- JU, Y.; HUYNH, L.; KASIM, N. S.; GUO, T.; WANG, J.; FAZARY, A. E. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Polymers*, v. 83, p. 591-599, 2011.
- KAUR, U.; OBEROI, H. S.; BHARGAV, V. K.; SHIVAPPA, R. S.; DHALIWAL, S. S. Ethanol production from alkali-and ozone-treated cotton stalks using thermotolerant *pichia kudriavzevii* HOP-1. *Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 219-226, 2012.
- LIU, C.; SUNA, R.; QIN, M.; ZHANG, A.; RENA, J.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Industrial Crops and Products*, v.26, p. 212–219, 2007.
- LIU, Q.; WANG, S.; ZHENG, Y.; LUO, Z.; CEN, K. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. v. 82, p. 170-177, 2007.
- MAPA (Ministério da Agricultura; Pecuária e Abastecimento), Secretaria de Produção e Agroenergia. *Statistical Yearbook of Agrienergy*, 2012.

- MARYANA, R.; MA'RIFATUN, D.; WHENI, A. I.; SATRIYO, K. W.; RIZAL, W. A. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. *Energy Procedia*, v. 47, p. 250–254, 2014.
- MASTEN, S. J., DAVIS, S. H. R. Advances in Water Treatment Technologies – The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. *Environmental Science Technology*, v. 28 (4), p. 180-185, 1994.
- MCMURRY, J. *Química Orgânica*. São Paulo. Editora Cengage Learning, p. 402, 2005.
- MCNEIL, M.; DARVILL, A. G.; FRY, S. C.; ALBERSHEIM, P. Structure and Function of the Primary Cell Walls of Plants. *Annual Review of Biochemistry*, 1984.
- MILLER, G. L; Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 11, p. 426-428, 1959.
- MOON, R. J.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. 2011.
- MORETTI, M. M. D. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; NUNES, C. D. C. C.; et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. *Applied Energy*, v. 122, p. 189–195, 2014.
- MOSES, O. A.; FROST, R. L. Infrared and ¹³C MAS nuclear magnetic resonance spectroscopic study of acetylation of cotton. *Spectrochimica Acta Part A*, v. 60, p. 449-453, 2004.
- 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, p. 673-686, 2005.
- NAM, S. N.; HAN, S. K.; KANG, J. W.; CHOI, H. Kinetics and mechanisms of the sonolytic destruction of non-volatile organic compounds: investigation of the sonochemical reaction zone using several OH monitoring techniques. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 10, p. 139-147, 2003.
- NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; PILÓ-VELOSO, D. Ozonólise das ligninas organossolve e Kraft eucalipto. Parte II: Cinética nos meios ácido e básico. *Química Nova*, v. 21, p. 578-583, 1998.
- OH, S.Y.; YOO, D.I.; SHIN, Y.; KIM, H.C.; KIM, H.Y.; CHUNG, Y.S.; et al. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 2376-2391, 2005.
- OLIVEIRA, L. R. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA, G. J. M. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. *Industrial Crops and Products*, v. 58, p. 1–7, 2014.

- OOSHIMA, H.; ASO, K.; HARANO, Y. Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis. *Biotechnology Letters*. v. 6(5), p. 289-294, 1984.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 25-33, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.
- PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, v. 54, n. 4, p. 559–68, 2008.
- PENG, H.; CHEN, H.; QU, Y.; LI, H.; XU, J. Bioconversion of different sizes of microcrystalline cellulose pretreated by microwave irradiation with/without NaOH. *Applied Energy*, v. 117, p. 142–148, 2014.
- POLETO, M.; ZATTERA, A. J.; SANTANA, R. M. C. Structural Differences Between Wood Species: Evidence from Chemical Composition , FTIR Spectroscopy , and Thermogravimetric Analysis. ,2012.
- POSTEK, M. T.; VLADÁR, A.; DAGATA, J.; et al. Development of the metrology and imaging of cellulose nanocrystals. *Measurement Science and Technology*, v. 22, n. 2, p. 024005, 2011.
- RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.
- RIEDEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.147, p.239-243, 1997.
- RIESZ, P.; KONDO, T.; KRISHNA, C. M. Sonochemistry of volatile and non-volatile solutes in aqueous solutions: e.p.r. and spin trapping studies. *Ultrasonics*, v. 28, p. 295, 1990.
- ROSATELLA, A. A.; SIMEONOV, S. P.; FRADE, R. F. M.; AFONSO, C. A. M. 5-hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications. *Green Chemistry*, v. 13, p. 754, 2011.
- SANSEVERINO, A. M. Microondas em Síntese Orgânica. *Química Nova*, v. 25, n.4, p. 660-667, 2002.
- SEGAL, L.; CREELY, J.J.; MARTIN, A.E. & CONRAD, C M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Textile Research Journal*, Princeton, 29(10):786-794, 1959.
- SINDHU, R.; BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; et al. Formic acid as a potential pretreatment agent for the conversion of sugarcane bagasse to bioethanol. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 162, n. 8, p. 2313–23, 2010.

- SINDHU, R.; KUTTIRAJA, M.; PREETI, V. E.; et al. A novel surfactant-assisted ultrasound pretreatment of sugarcane tops for improved enzymatic release of sugars. *Bioresource technology*, v. 135, p. 67–72, 2013.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D.; Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass (LAP). NREL, Golden, Co., USA, 2012.
- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. *Química orgânica*. Rio de Janeiro. Editora LTC, p. 474, 2001.
- STEWART, D. Application of Fourier-transform infrared and Raman spectroscopies to plant science. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998.
- SUN, J. X.; SUN, R.; SUN, X. F.; SU, Y. Fractional and physic-chemical characterization of hemicelluloses from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Carbohydrate Research*, v. 339, p.291-300, 2004a.
- SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, v. 84, p. 331-330, 2004b
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, v. 83, p. 1-11, 2002.
- SUSLICK, K. S.; HAMMERTON, D. A.; CLINE, R. E. The sonochemical Hot Spot. *Journal of the American Chemical Society*, v. 108, p. 2726-2734, 1986.
- TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 1655–1663, 2007.
- TERINTE, N.; IBBETT, R.; SCHUSTER, K. C. Overview on Native Cellulose and Microcrystalline Cellulose I Structure Studied By X-Ray Diffraction (Waxd): Comparison Between Measurement Techniques. *Lenzinger Berichte*, v. 89, p. 118–131, 2011.
- TEZCANLI-GÜYER, G.; INCE, N. H. Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes. *Ultrasonics*, v. 42, n. 1-9, p. 603–9, 2004.
- TRAVAINI, R.; OTERO, M. D. M.; COCA, M.; DA-SILVA. R.; BOLADO, S. Sugarcane bagasse ozonolysis pretreatment: Effect on enzymatic digestibility and inhibitory compound formation. *Bioresource Technology*, v. 133, p. 332-229, 2013.
- TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; IT, M. Biodegradation of lignin in a compost environment : a review. , v. 72, p. 169–183, 2000.
- VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Ultrasound-assisted alkaline pretreatment of sugarcane bagasse for fermentable sugar production: optimization through response surface methodology. *Bioresource technology*, v. 112, p. 293–9, 2012.

- VELMURUGAN, R.; MUTHUKUMAR, K. Utilization of sugarcane bagasse for bioethanol production: sono-assisted acid hydrolysis approach. *Bioresource technology*, v. 102, n. 14, p. 7119–23, 2011.
- WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiology and Molecular Biology*, review, v. 52, p. 305–317, 1988.
- WOOD, B.E.; ALDRICH, H. C.; INGRAM, L. O. Ultrasound Stimulates Ethanol Production during the Simultaneous Saccharification and Fermentation of Mixed Waste Office Paper. *Biotechnology Progress*, v. 13, p. 232–237, 1997.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Enzyme and Microbial Technology Inhibition of cellulases by phenols. , v. 46, p. 170–176, 2010a.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 3-4, p. 170–176, 2010b.
- XU, F.; SUN, R.C.; LU, Q. Characteristics of cellulose isolated by a totally chlorine-free method from *caragana korshinskii*. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 101, p. 3251–3263, 2006.
- YANG, H.; YAN, R.; CHEN, H.; LEE, D. H.; ZHENG, C. Characteristics of hemicelluloses, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, v. 86, p. 1781–1788, 2007.
- ZAPAROLLI, D. Duas usinas de etanol celulósico entrarão em operação ente ano no Brasil, NovaCana Notícias, 2014. Acessado em Abril de 2014: (<http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usinas-etanol-celulosico-operacao-brasil-280414/>).
- ZHANG, J.; MA, X.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse, *Bioresource Technology*, v.102, p. 4585–4589, 2011.
- ZHANG, Y.-H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 35, n. 5, p. 367–75, 2008.
- ZHU, S.; WU, Y.; YU, Z.; LIAO, J.; ZHANG, Y. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3082–3086, 2005.
- ZHU, Z.; ZHU, M.; WU, Z. Pretreatment of sugarcane bagasse with NH₄OH-H₂O₂ and ionic liquid for efficient hydrolysis and bioethanol production. *Bioresource technology*, v. 119, p. 199–207, 2012.