

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

RODOLFO TRAVAINI

UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS BASEADOS EM  
OZÔNIO COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, E  
HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM COMBINADO ENZIMÁTICO DOS  
FUNGOS *Penicillium viridicatum* RFC3 E *Trichoderma reesei* QM9414

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP  
2011

RODOLFO TRAVAINI

UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS BASEADOS EM OZÔNIO COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, E HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO COM COMBINADO ENZIMÁTICO DOS FUNGOS *Penicillium viridicatum* RFC3 E *Trichoderma reesei* QM9414

Dissertação apresentada 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO DA SILVA

Travaini, Rodolfo.

Utilização de processos oxidativos avançados baseados em ozônio como pré-tratamento para bagaço de cana-de-açúcar, e hidrólise do bagaço pré-tratado com combinado enzimático dos fungos *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414 / Rodolfo Travaini. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

62 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas de fungos. 3. Bagaço de cana – Processos oxidativos. 4. *Penicillium viridicatum*. 5. *Trichoderma reesei*. I. Da-Silva, Roberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15

RODOLFO TRAVAINI

UTILIZAÇÃO DE PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS  
BASEADOS EM OZÔNIO COMO PRÉ-TRATAMENTO PARA BAGAÇO  
DE CANA-DE-AÇÚCAR, E HIDRÓLISE DO BAGAÇO PRÉ-TRATADO  
COM COMBINADO ENZIMÁTICO DOS FUNGOS *Penicillium viridicatum*  
RFC3 E *Trichoderma reesei* QM9414

Dissertação apresentada 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 “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

**PROF. DR. ROBERTO DA SILVA**

Professor Titular do Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

**PROF. DR. PAULO SELEGHIM JÚNIOR**

Professor Titular do Departamento de Engenharia Mecânica, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - USP.

**PROFA. DRA. ELENI GOMES**

Livre docente nível III do Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

São José do Rio Preto, 14 de setembro de 2011

*Dedico este trabalho aos meus  
pais, por toda dedicação e  
esforços para que mais esse  
passo fosse dado.*

## AGRADECIMENTOS

À Grande Força Organizadora do Universo, a qual é chamada de muitos nomes em muitos lugares, que me ilumina e aclara o espírito a cada dia.

Aos meus pais, Denize e Manoel, pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs, Ana Beatriz e Isabela, por todo carinho.

Ao Prof. Dr. Roberto da Silva, pela orientação, confiança e apoio para o desenvolvimento deste projeto e de tantos outros ao longo destes 7 anos.

A la Profa. Dra. Silvia Bolado Rodrigues, por la recepción, amabilidad y orientación durante los 3 meses del desarrollo del proyecto en conjunto con la Universidad de Valladolid.

A la Profa. Dra. Mónica Coca, a los técnicos Jesús Rodrigues y Verónica Miguel Pacheco, por las enseñanzas y ayudas durante el desarrollo del proyecto en la Universidad de Valladolid.

À Prof. Dra. Eleni Gomes, pelas sugestões e esclarecimentos de dúvidas.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo, por todos ensinamentos e idéias mirabolantes.

A mi gran amiga colombiana Marian Morales Otero, por todos los momentos increíbles y preciosísimos que pasamos en España, además del trabajo que desarrollamos.

A minha amiga e co-orientada Ariane Priscila Movio, por todos os bons momentos, por sua amabilidade e atenção, e imensa ajuda dispensada na parte final do desenvolvimento desse projeto.

Às minhas grande amigas Fernanda, Alessandra e Andressa, e todos os amigos maravilhosos que a vida me deu, que posso dizer com muita felicidade que são muitos.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bioquímica dos Processos e Microbiologia Aplicada, do Grupo de Pesquisa em Bioenergia, e agregados pelos inúmeros momentos agradáveis, descontraídos e por todas as trocas profissionais.

*"Escrever é procurar entender,  
é procurar reproduzir o irreproduzível,  
é sentir até o último fim o sentimento que permaneceria apenas vago e sufocador."  
(Clarice Lispector)*

## RESUMO

Neste trabalho foi estudada a utilização do ozônio como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para posterior hidrólise enzimática. O bagaço *in natura* foi caracterizado quimicamente, e após cada ensaio de pré-tratamento foram quantificados no bagaço pré-tratado: celulose, xilana, lignina ácida insolúvel (LAI), lignina ácida sóluvel (LAS) e lignina total (LT). Após os pré-tratamentos as amostras foram hidrolisadas enzimaticamente por mistura dos complexos NS50013 e NS50010 de enzimas comerciais fornecidas pela Novozymes. Foram realizados quatro ensaios de pré-tratamento, variando-se a umidade e a concentração de ozônio ( $\text{gO}_3/\text{h}$ ), e mantendo-se constante o fluxo 60 L/h e o tamanho de partícula em 3-5 mm. A melhor condição de ensaios encontrada foi com 40 % de umidade e 3,85  $\text{gO}_3/\text{h}$ , onde houve diminuição na quantidade de LAI de  $19,54 \pm 0,03$  para  $6,49 \pm 0,03$  %, aumento na LAS de  $3,13 \pm 0,04$  para  $7,21 \pm 0,09$  % e diminuição da LT de  $22,67 \pm 0,07$  para  $13,70 \pm 0,12$  %, comparando-se com o bagaço *in natura*. No mesmo ensaio houve uma conversão de hidrólise enzimática da celulose de  $39,27 \pm 0,32$  % no bagaço pré-tratado e  $50,62 \pm 1,59$  % no pré-tratado e lavado, da xilana de  $55,90 \pm 0,14$  % no pré-tratado e  $28,14 \pm 0,75$  % no pré-tratado lavado, de açúcares de  $44,61 \pm 0,17$  % no pré-tratado e  $43,41 \pm 0,84$  % no pré-tratado lavado. Houve pouco ataque do ozônio aos carboidratos em todos os ensaios, sendo o maior ataque no ensaio de melhores rendimentos supracitado, com perda de menos de 5 pontos percentuais na quantidade de celulose e pouco mais de 1 ponto percentual na quantidade de xilana. A análise de inibidores revelou baixas concentrações destes, sendo o de maior concentração o ácido acético, com  $1,40040 \pm 0,07359 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  no hidrolisado. A análise das amostras pré-tratadas por micrografia eletrônica de varredura demonstrou que o pré-tratamento com ozônio é capaz de modificar microscopicamente o bagaço, expondo as fibras e aumentando a quantidade e o tamanho dos poros.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento, ozônio, hidrólise enzimática.



## ABSTRACT

In this work was studied the utilization of the ozone as a pretreatment of the sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis. The *in natura* bagasse was chemically characterized, and after each pretreatment test was quantified in the pretreated bagasse: cellulose, xylan, acid insoluble lignin (AIL), acid soluble lignin (ASL) and total lignin (TL). After the pretreatments the samples was enzymatic hydrolyzed by a mixture of NS50013 and NS50010 complexes, of commercial enzymes provided by Novozymes. Was realize four tests of pretreatment, changing the moisture and ozone concentration ( $\text{gO}_3/\text{h}$ ), fixing the flux in 60 L/h and the particle size at 3-5 mm. The best condition of test was find at 40 % of moisture and 3,85  $\text{gO}_3/\text{h}$ , where was a diminution in the AIL from  $19,54 \pm 0,03$  to  $6,49 \pm 0,03$ , a increase in the ASL from  $3,13 \pm 0,04$  to  $7,21 \pm 0,09$  %, and diminution of LT from  $22,67 \pm 0,07$  to  $13,70 \pm 0,12$  %, comparing to the *in natura* bagasse. In the same test was a conversion of enzymatic hydrolysis of the cellulose of  $39,27 \pm 0,32$  % in the pretreated bagasse and  $50,62 \pm 1,59$  % in the pretreated and washed, of xilan  $55,90 \pm 0,14$  % in the pretreated bagasse and  $28,14 \pm 0,75$  % in the pretreated and washed, of sugar  $44,61 \pm 0,17$  % in the pretreated bagasse and  $43,41 \pm 0,84$  % in the pretreated and washed. Was a little attack to the carbohydrates in all the tests, being the major attack in the test of the best yields aforementioned, with loss of less than 5 percentage points in the cellulose and little more than 1 percentage point in the amount of xylan. The inhibitors analysis showed slow concentrations of they, being the major concentration of acetic acid, with  $1,40040 \pm 0,07359 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the hydrolyzed. The electron micrograph analysis of the pretreated samples showed that the ozone pretreatment is able to modify microscopically the bagasse, exposing the fibers and increasing the amount and size of the pores.

Keywords: sugarcane bagasse, pretreatment, ozone, enzymatic hydrolysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> .....	17
<b>Figura 2:</b> .....	29
<b>Figura 3:</b> .....	31
<b>Figura 4:</b> .....	32
<b>Figura 5:</b> .....	34
<b>Figura 6:</b> .....	48
<b>Figura 7:</b> .....	59
<b>Figura 8:</b> .....	60
<b>Figura 9:</b> .....	61
<b>Figura 10:</b> .....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> .....	27
<b>Tabela 2:</b> .....	27
<b>Tabela 3:</b> .....	33
<b>Tabela 4:</b> .....	40
<b>Tabela 5:</b> .....	46
<b>Tabela 6:</b> .....	44
<b>Tabela 7:</b> .....	49
<b>Tabela 8:</b> .....	50

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	17
2.1 <i>Materiais lignocelulósicos e o bagaço de cana-de-açúcar</i>	17
2.2 <i>Pré-tratamentos</i>	18
2.2.1 Métodos de pré-tratamento do bagaço de cana	19
2.2.2 POA e pré-tratamentos com ozônio	19
2.3 <i>Hidrólise enzimática</i>	21
<b>CAPÍTULO 1</b>	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	24
3.1 <i>Preparo do bagaço de cana-de-açúcar</i>	24
3.2 <i>Pré-tratamentos</i>	24
3.3 <i>Caracterização do bagaço in natura e pré-tratado</i>	25
3.4 <i>Atividade sobre papel de filtro (FPase)</i>	25
3.5 <i>Hidrólise Enzimática</i>	25
3.6 <i>Análise de açúcares e inibidores de fermentação</i>	26
<b>4 RESULTADOS</b>	27
4.1 <i>Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar</i>	27
4.2 <i>Pré-tratamentos</i>	27
4.2.1 <i>Modificações na lignina após pré-tratamentos</i>	28
4.2.2 <i>Ataque do ozônio aos carboidratos</i>	31
4.3 <i>Inibidores de fermentação</i>	32
4.4 <i>Atividade sobre papel de filtro</i>	33
4.5 <i>Hidrólise enzimática</i>	34
4.6 <i>Micrografias Eletrônicas</i>	36
<b>5 CONCLUSÕES – CAPÍTULO 1</b>	38
<b>CAPÍTULO 2</b>	39
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	40
6.1 <i>Preparo do bagaço de cana-de-açúcar</i>	40
6.2 <i>Pré-tratamentos</i>	40
6.3 <i>Caracterização do bagaço in natura e pré-tratado</i>	41
6.4 <i>Fermentação para produção das enzimas</i>	41
6.4.1 <i>Inóculo</i>	41

6.4.2 Solução Salina .....	41
6.4.3 Fermentadores.....	42
6.4.4 Contagem de esporos e inoculação.....	42
6.4.5 Fermentação em estado sólido (FES) .....	43
6.5 <i>Atividades enzimáticas</i> .....	43
6.5.1 Atividade de $\beta$ -glicosidase .....	43
6.5.3 Atividade sobre papel de filtro (FPase).....	43
6.6 <i>Hidrólise Enzimática</i> .....	44
6.7 <i>Análise de açúcares</i> .....	44
<b>7 RESULTADOS</b> .....	46
7.1 <i>Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar</i> .....	46
7.2 <i>Pré-tratamentos</i> .....	46
7.2.1 Modificações na lignina após pré-tratamentos.....	47
7.3 <i>Atividades enzimáticas</i> .....	49
7.4 <i>Hidrólise enzimática</i> .....	49
<b>8 CONCLUSÕES – CAPÍTULO 2</b> .....	52
<b>9 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	53
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	54
<b>ANEXO 1</b> .....	59
<b>ANEXO 2</b> .....	60
<b>ANEXO 3</b> .....	61
<b>ANEXO 4</b> .....	62

## 1 INTRODUÇÃO

No cenário internacional dos últimos anos, e particularmente no Brasil, a produção de etanol e/ou combustíveis provenientes de fontes renováveis tem se tornado cada vez mais um tema recorrente na pesquisa, nos planos de governo e na economia; como resultado do diagnóstico de vários problemas relacionados à dependência energética mundial do petróleo. Segundo dados de 2010 da *International Energy Agency*, de toda a energia consumida, 67 % são provenientes de combustíveis fósseis, ou seja, somente 8,7 % menos que aquela utilizada em 1973.

O primeiro choque do petróleo em 1973, motivado por especulação econômica, foi o fator desencadeador para a busca de novas fontes energéticas; em 1980 o segundo choque ocasionado pela diminuição na produção de petróleo pelo Irã que passava por uma revolução, demonstrou claramente que a dependência ocidental de combustíveis fósseis deveria ser contornada o quanto antes.

Entre 2003 e 2007, o mundo viveu um novo momento de tensão em torno do petróleo, que culminou em valorização excessiva no seu preço, e que foi considerado como sendo o terceiro choque por alguns especialistas, e desta vez não mais por especulação ou baixa na produção, e sim pelo aumento crescente na demanda com produção praticamente constante, ou seja, pela simples lei da oferta e da procura.

Juntando-se a esses fatores, vários outros de caráter ambiental têm sido identificados ao uso do petróleo como fonte energética, tais como: o aumento da emissão de gases causadores do efeito estufa, provenientes de fontes não renováveis; a produção de diversos tipos de poluentes nocivos à saúde, o aumento

crescente da poluição em grandes centros urbanos, os diversos conflitos políticos e sociais, resultantes da concentração das áreas de exploração em partes específicas do globo; suas implicações econômicas, já discutidas (ESCOBAR *et al.*, 2009).

Dentro deste contexto, várias alternativas tem sido propostas para a substituição dos combustíveis fósseis, sendo a mais promissora a produção de combustíveis à partir de fontes renováveis.

As rotas de produção destes combustíveis são divididas por geração: os combustíveis produzidos por rotas de primeira geração são o biodiesel e o etanol gerados por processos convencionais; os de segunda geração os produzidos por pirólise, gaseificação, etanol celulósico, etc.; e os de terceira geração os processos de produção de hidrogênio (ESCOBAR *et al.*, 2009).

A produção de combustíveis de segunda geração à partir da biomassa vegetal apresenta grandes possibilidades por sua abundância, baixo custo de matérias primas e principalmente por ser proveniente de fonte renovável.

No Brasil, país onde o maior programa de exploração comercial de biomassa, o Proálcool, foi implantado para substituição gradativa do uso de combustíveis fósseis por etanol proveniente da cana-de-açúcar, o foco tem sido principalmente sobre a utilização dos resíduos desta indústria. No ano de 2008/2009 o Brasil teve uma safra de cana-de-açúcar de mais de 560 milhões de toneladas processadas, gerando mais de 31 milhões de toneladas de açúcar e 27 milhões de metros cúbicos de álcool, entre anidro e hidratado (BRASIL, 2009).

Estima-se que aproximadamente 140 milhões de toneladas de bagaço de cana sejam gerados atualmente no país (informação jornalística)<sup>1</sup>, número esse que

---

<sup>1</sup>Onório Kitayama, especialista em bioeletricidade da União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), em entrevista ao O Estado de São Paulo. Bagaço de cana, 'resíduo' cada vez mais lucrativo. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 3 set. 2008. Suplementos, Agrícola.

deve aumentar significativamente nos próximos anos devido ao aumento no consumo de álcool combustível. A utilização destes resíduos na produção de etanol celulósico possui capacidade para aumentar em três vezes a produção brasileira de álcool (informação jornalística)<sup>1</sup>, sem com isso aumentar a área plantada, evitando problemas relacionados à monocultura e o uso da terra para fins não alimentares.

A utilização do bagaço de cana, e da biomassa vegetal em geral, como fonte energética para produção de etanol de segunda geração envolve pelo menos três etapas principais: (1) chamada de pré-tratamento, envolve a desestruturação da biomassa para liberação dos homo- e heteropolímeros de interesse de suas ligações com a lignina; (2) quebra dos polímeros em suas respectivas unidades monoméricas de açúcares redutores fermentescíveis e (3) fermentação do hidrolisado a etanol (TENGERDY; SZAKACS, 2003).

A primeira etapa, de pré-tratamento da biomassa, busca a desestruturação da trama lignina-hemicelulose-celulose, e também a desestabilização das regiões cristalinas da celulose para facilitar a etapa seguinte de hidrólise. Outros fatores nessa etapa também são de suma importância para o desenvolvimento de um processo econômico e ambientalmente viável: evitar a degradação dos polímeros de interesse; evitar a formação de inibidores que possam impedir a posterior fermentação para produção de etanol; apresentar alto grau de simplicidade e reagentes de fácil aquisição e baixo custo (MOSIER *et al.*, 2005; SUN; CHENG, 2002).

A segunda etapa, de despolimerização dos carboidratos a açúcares fermentescíveis pode ocorrer por duas vias: hidrólise enzimática ou ácida. A hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens sobre a ácida, dentre as quais se deve destacar: menor gasto energético, alta especificidade pelo substrato evitando a

---

<sup>1</sup>Carlos Eduardo Vaz Rossel, pesquisador do Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético (NIPE), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Audiência Pública sobre o uso da biomassa de cana-de-açúcar da Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Audiência Pública - Biomassa pode triplicar produção de etanol, afirmam debatedores, **Jornal da Câmara**, Brasília, ano 8, nº 1929, 19 out. 2008.



produção de compostos indesejáveis, menor corrosão dos equipamentos em contato com o processo de hidrólise, etc. Contudo, este processo também apresenta certas desvantagens, como a sua baixa eficiência em degradar as regiões cristalinas da celulose e a dificuldade das enzimas em atingirem porções mais internas da biomassa, o que estimula novos estudos com pré-tratamentos para suprir tais necessidades (TRAVAINI, 2008).

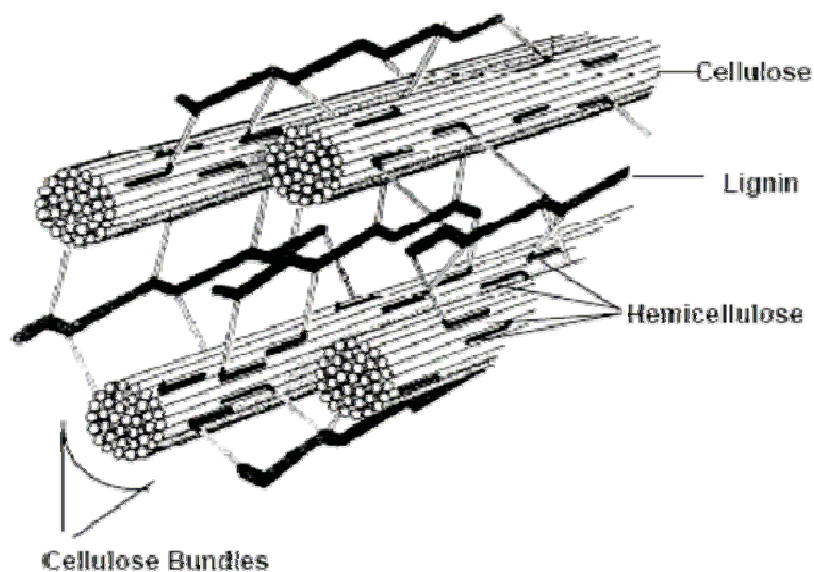
Apesar dos intensos esforços para se desenvolver um processo viável de produção de etanol celulósico, até agora nenhuma das tecnologias desenvolvidas possui as características técnicas e/ou econômicas necessárias para se inserir e enraizar no mercado de combustíveis. Baseado nesses fatores, o presente trabalho é parte de um estudo exploratório para se avaliar a utilização do ozônio como um novo pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para posterior hidrólise enzimática.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Materiais lignocelulósicos e o bagaço de cana-de-açúcar

A principal barreira para o processamento e utilização de materiais lignocelulósicos, seja para a produção de bioetanol ou outros produtos de biorrefinaria, é superar a trama existente entre lignina, hemicelulose e celulose, para se atingir o polímero de interesse.

Observando-se de dentro pra fora, a trama lignina-hemicelulose-celulose (Figura 1), a celulose é um polímero linear de  $\beta$ -D-glicose da parte mais interna da trama, possui regiões amorfas e cristalinas, formando extensas fibrilas que são envoltas por hemicelulose (DA-SILVA *et al.*, 1997; NELSON; COX, 2004). A hemicelulose por sua vez é composta de cadeias poliméricas de pentoses, lineares e ramificadas, com carboidratos mediadores ligados covalentemente a grupos da lignina, sendo esta um extenso complexo de polifenóis (KATAPODIS *et al.*, 2006).



**Figura 1:** Disposição da celulose, hemicelulose e lignina na parede celular vegetal (ÅKERHOLM; SALMÉN, 2003).

No processo tradicional de produção de álcool etílico brasileiro e na indústria açucareira, à partir da cana-de-açúcar, a cana passa por processo de moagem ou extrusão para a remoção do caldo que é então levado à indústria açucareira ou às dornas de fermentação, em processos de batelada alimentada ou contínuo.

O bagaço obtido após a extração do caldo é um material fibroso, responsável por aproximadamente 28 % da massa da cana e com 50 % da umidade desta (CERQUEIRA; RODRIGUES; MEIRELES, 2007). É composto em média por 40-45 % de celulose, 30-35 % de hemicelulose e 20-30 % de lignina (PENG *et al.*, 2009); possui baixa composição de cinzas quando comparado a outros resíduos agro-industriais, em torno de 2,4 %, enquanto a palha de arroz e o farelo de trigo possuem 17,5 e 11,0 % respectivamente (PANDEY *et al.*, 2000).

## 2.2 Pré-tratamentos

O principal intuito da etapa de pré-tratamento é a remoção da lignina e da hemicelulose que formam uma matriz amorfa envolvendo os polímeros de celulose impedindo a etapa subsequente de quebra da celulose às suas unidades monoméricas. Nesta etapa inicial devem ocorrer processos que transformem a biomassa tanto em nível macroscópico, microscópico e sub-microscópico atingindo a estrutura física da biomassa, pela remoção de compostos e abertura de poros, assim como a composição e a estrutura das moléculas, permitindo um processo de hidrólise rápido e eficiente. Almejando atingir tais requisitos, vários métodos de pré-tratamentos têm surgido na literatura específica atual, envolvendo processos físicos, químicos, biológicos e algumas vezes a junção de mais de um deles.

### 2.2.1 Métodos de pré-tratamento do bagaço de cana

Diversos trabalhos são encontrados na literatura relatando os mais variados pré-tratamentos do bagaço de cana para posterior hidrólise enzimática. Hidrólise ácida com diferentes ácidos (CHANDEL *et al.*, 2007; ROCHA *et al.*, 2011), explosão a vapor (MARTÍN *et al.*, 2002), tratamento alcalino (HERNÁNDEZ-SALAS *et al.*, 2009), tratamentos biológicos (LI; KONDO; SAKAI, 2002), oxidação úmida (MARTÍN *et al.*, 2007), organosolv (TU *et al.*, 2008).

Os melhores rendimentos de pré-tratamentos são encontrados nos ensaios realizados com hidrólise ácida, nos quais pequenas quantidades diluídas de ácidos (1-10 % p/p) são utilizados em temperaturas moderadas (100-150 °C). No entanto tal pré-tratamento apresenta diversas desvantagens, como a necessidade de concentração do sobrenadante do tratado para utilização dos açúcares liberados, e a formação de inibidores de fermentação em grande quantidade, tornando o processo técnica e economicamente inviável.

### 2.2.2 POA e pré-tratamentos com ozônio

Os processos oxidativos avançados (POA) surgiram inicialmente para tratar efluentes ricos em compostos biológicos recalcitrantes, como pesticidas, tóxicos, inibidores microbiológicos, etc., que não podiam ser tratados por métodos biológicos convencionais de tratamento. Eles são caracterizados pela formação de radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ) em meio líquido em quantidade suficiente para oxidar compostos orgânicos. São processos simples, que utilizam na maioria das vezes a combinação de reagentes comuns, e de baixo custo, como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{O}_2$  e

algumas vezes ultra-som, feixe de elétrons e radiação UV (MEDEIROS, 2008).

Os POAs apresentam características bastante interessantes como pré-tratamento de biomassa, pois a produção de grandes quantidades de oxidantes fortes, majoritariamente radicais hidroxila, juntamente com os oxidantes reagentes do processo permite mineralizar e desestruturar compostos altamente recalcitrantes, como a lignina que faz parte do sistema de proteção mecânica e estrutural da parede celular da biomassa em geral. As diferenças nas características eletrônicas entre lignina e carboidratos permitem que esse processo de oxidação seja seletivo. A grande quantidade de ligações duplas e centros doadores de elétrons tornam a lignina mais reativa que os carboidratos, os radicais hidroxila reagem de 5 a 6 vezes mais rápido com compostos modelo de lignina do que com carboidratos, e com o ozônio essa chega a reagir  $10^6$  vezes mais rápido do que com carboidratos (MAIA; COLODETTE, 2003).

Além da seletividade, outras particularidades dos processos envolvendo ozônio devem ser destacadas: sua fácil geração, a ausência ou baixíssima concentração da formação de compostos tóxicos entre lignina e o oxidante, sua rápida decomposição evitando inibição de posteriores processos microbiológicos, pode ser realizado em temperatura e pressão ambientes, etc., baseando-se nestas características, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos e apontam resultados bastante interessantes no uso de ozônio na degradação de compostos recalcitrantes, corantes têxteis, compostos altamente tóxicos, no aumento da biodegradabilidade de efluentes industriais e finalmente no branqueamento de polpa celulósica, onde o objetivo é muito próximo daquele dos pré-tratamentos, ou seja, a remoção ou solubilização da lignina com ataque mínimo aos carboidratos.

Vidal e Molinier (1988), relatam um aumento de 0% para 57% na capacidade

de hidrólise enzimática da serragem de choupo após ozonólise, no qual houve um decréscimo de 29% para 8% na fração de lignina. Purí (1983), através da ozonólise de diversos materiais lignocelulósicos, entre eles bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, conseguiu aumentos na hidrólise enzimática que passaram de 1 a 30% para 80 a 90%. García-Cubero *et al.* (2009), conseguiram aumentos de 29% e 16% para 88,6% e 57% na hidrólise enzimática pós ozonólise, para farelo de trigo e centeio, respectivamente.

### 2.3 Hidrólise enzimática

A hidrólise da celulose ocorre através da ação de enzimas conhecidas como celulases, envolvendo pelo menos três delas: endoglucanase ou endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou exo- $\beta$ -1,4-glucanase (EC 3.2.1.91) e a  $\beta$ -1,4-glicosidase ou celobiase (EC 3.2.1.21).

As endoglucanases hidrolisam as cadeias ao acaso, atacando os polímeros de celulose internamente, resultando em uma rápida redução no grau de polimerização; as exoglucanases atuam sobre a celulose, removendo unidades de celobiose à partir das extremidades não redutoras da molécula, e por fim as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam celobioses, oligossacarídeos de glicose e outras celodextrinas a glicose. Tanto endoglucanase, como exoglucanase sofrem repressão catabólica pelo produto final de suas reações, portanto, por remover celobiose do meio reacional, a  $\beta$ -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando um papel regulador na degradação enzimática da celulose (LEITE *et al.*, 2007).

É imprescindível a utilização eficiente da xilana, componente majoritário da

hemicelulose, se se deseja utilizar a biomassa lignocelulósica para processos de bioconversão visando-se a produzir substratos para fermentação alcoólica, ou mesmo para a indústria de alimentos (DA-SILVA, 1992).

As endo-1,4- $\beta$ -xilanases, ou somente xilanases como são comumente conhecidas, atuam clivando ligações glicosídicas na cadeia principal de xilana, onde os produtos iniciais de sua ação são  $\beta$ -D-xilanopirosil oligômeros, e em estágios mais avançados da hidrólise, onde já houve a remoção de grupos laterais por outras enzimas, são liberados diretamente mono, di e trissacarídeos.

Já as  $\beta$ -xilosidases usualmente não hidrolisam a xilana propriamente, mais sim a xilobiose e xilooligossacarídeos, que são os subprodutos da degradação da xilana. A grande importância da  $\beta$ -xilosidase se dá por conta da sua capacidade de hidrolisar os  $\beta$ -D-xilanopirosil oligômeros produzidos durante a hidrólise da xilana, que são inibidores da endoxilanase (POLIZELI *et al.*, 2005).

## **CAPÍTULO 1**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS INDUSTRIALES  
UNIVERSIDAD DE VALLADOLID  
ESPAÑA**

**SUPERVISORA: PROFA. DRA. SILVIA BOLADO RODRÍGUEZ**



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 *Preparo do bagaço de cana-de-açúcar*

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos ensaios foi cedido pela Usina Vale, localizada na Estância Vale do Rio Turvo, s/n na zona rural do município de Onda Verde – SP no mês de agosto de 2010. A usina utiliza o método de moagem para extração do caldo de cana para produção de açúcar e álcool.

O bagaço recebido foi exaustivamente lavado com água para remoção de material particulado e açúcares remanescentes do processo de moagem, sendo estes últimos dosados na água de lavagem pelo método de DNS (MILLER, 1959) até não ser possível sua detecção. O bagaço lavado foi seco em camadas finas em estufa com circulação de ar quente, a 50 °C. Após resfriamento o bagaço seco foi triturado em Triturador de Forragens Trapp modelo TRF-400, com peneira de abertura de 3-5 mm original do equipamento.

#### 3.2 *Pré-tratamentos*

Os pré-tratamentos foram realizados em reator de leito fixo (coluna de vidro, 2,7 cm x 50 cm, com difusor cerâmico de bolhas) acoplado a gerador de ozônio Sander 301, alimentado por cilindro de ar líquido. Antes de cada ensaio a umidade da matéria-prima foi ajustada até o valor desejado. A concentração de ozônio no fluxo foi medida por método iodométrico (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 1995). A matéria pré-tratada foi mantida congelada a -18 °C até sua utilização.

### 3.3 Caracterização do bagaço *in natura* e pré-tratado

Bagaço *in natura* e pré-tratado foram caracterizados quimicamente, dosando-se: lignina total, dividida em lignina acida solúvel e lignina acida insolúvel, e polímeros de carboidratos, celulose como quantidade total de glicose e xilana como quantidade total de xilose, extrativos e cinzas (SLUITER *et al*, 2008).

### 3.4 Atividade sobre papel de filtro (FPase)

A atividade sobre papel de filtro, FPase, foi realizada de acordo com o método descrito por Eveleigh *et al.* (2009).

### 3.5 Hidrólise Enzimática

As hidrólises enzimáticas da matéria-prima *in natura* e tratada foram realizadas em erlenmeyers com 6 % de bagaço *in natura* ou pré-tratado em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0, 0,132 mL de complexo enzimático celulolítico NS50013 (Novozymes, Denmark) e 0,062 mL de  $\beta$ -glicosidase NS50010 (Novozymes, Denmark), por grama de celulose presente no material a ser hidrolisado de acordo com caracterização realizada como descrito em 3.3 *Caracterização do bagaço in natura e pré-tratado*.

Os erlenmeyers foram então hermeticamente fechados com rolhas de látex e incubados em shaker orbital a 300 rpm e 50 °C durante 24 horas, em seguida foram filtradas com filtro de 0,22  $\mu$ m e congeladas a -18 °C para análise de açúcares e/ou

inibidores (3.4 *Análise de açúcares e inibidores de fermentação*).

### 3.6 *Análise de açúcares e inibidores de fermentação*

As análises foram realizadas através de cromatografia em HPLC (Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump) com detector espectrofotométrico UV/VIS (Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS Detector) e refratômetro (Shodex RI-72), acoplados nesta mesma ordem, utilizando-se como eluente água ultra pura em fluxo de 0,9 mL/min, pressão entre 38 e 42 kg/cm<sup>2</sup>, através de coluna de carboidratos (BioRAD HPLC Carbohydrate Analysis Column Aminex® HPX-87C 300 mm x 7,8 mm) em forno (Dionex STH 585 Column Oven) a 80 °C constante.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

A caracterização bioquímica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado nos ensaios revelou composição como detalhada na Tabela 1:

**Tabela 1:** Caracterização bioquímica do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos ensaios.

Componente	% (p/p)
Umidade	2,15±0,09
Celulose (como glicose)	46,21±0,10
Xilana (como xilose)	20,86±0,05
Lignina Ácida Insolúvel	19,54±0,03
Lignina Ácida Solúvel	3,13±0,04
Extrativos (ceras, gorduras, carboidratos não estruturais, resinas, taninos e substâncias cromóforas)	1,54±0,08
Cinzas	1,19±0,10

### 4.2 Pré-tratamentos

Como este se trata de um estudo exploratório, para avaliar o emprego do ozônio como pré-tratamento do bagaço de cana, foram escolhidos para avaliação os parâmetros umidade da matéria a ser tratada e concentração de ozônio.

**Tabela 2:** Ensaio de pré-tratamento.

Ensaio	Umidade	[O <sub>3</sub> ] g/h
A <sup>1</sup>	--	--
B	40 %	3,44
C	40 %	3,85
D	80 %	1,53
E	80 %	3,85

<sup>1</sup>Controle: bagaço *in natura*.

Foram determinados aleatoriamente dois valores de umidade e três valores de concentração de ozônio, mantendo-se constante o fluxo da mistura ar/ozônio a

60 L/h. Foram realizados quatro ensaios como ilustrados na Tabela 2.

Em diferentes umidades a matéria seca adicionada ao reator varia em massa, volume e porosidade, de maneira que esses fatores fazem variar o tempo de ozonólise do bagaço, ou seja o tempo decorrido entre o início do pré-tratamento até o momento em que o ozônio começa a sair da coluna sem haver reagido com a matéria-prima.

A cada pré-tratamento se obteve um diferente tempo de ozonólise, e buscando-se a padronização dos ensaios, os ensaios de pré-tratamento eram finalizados 15 minutos após notar-se o início da coloração da solução de KI, que se tingiu de amarelo-avermelhado quando ozonizado, do lavador de gás de saída do reator.

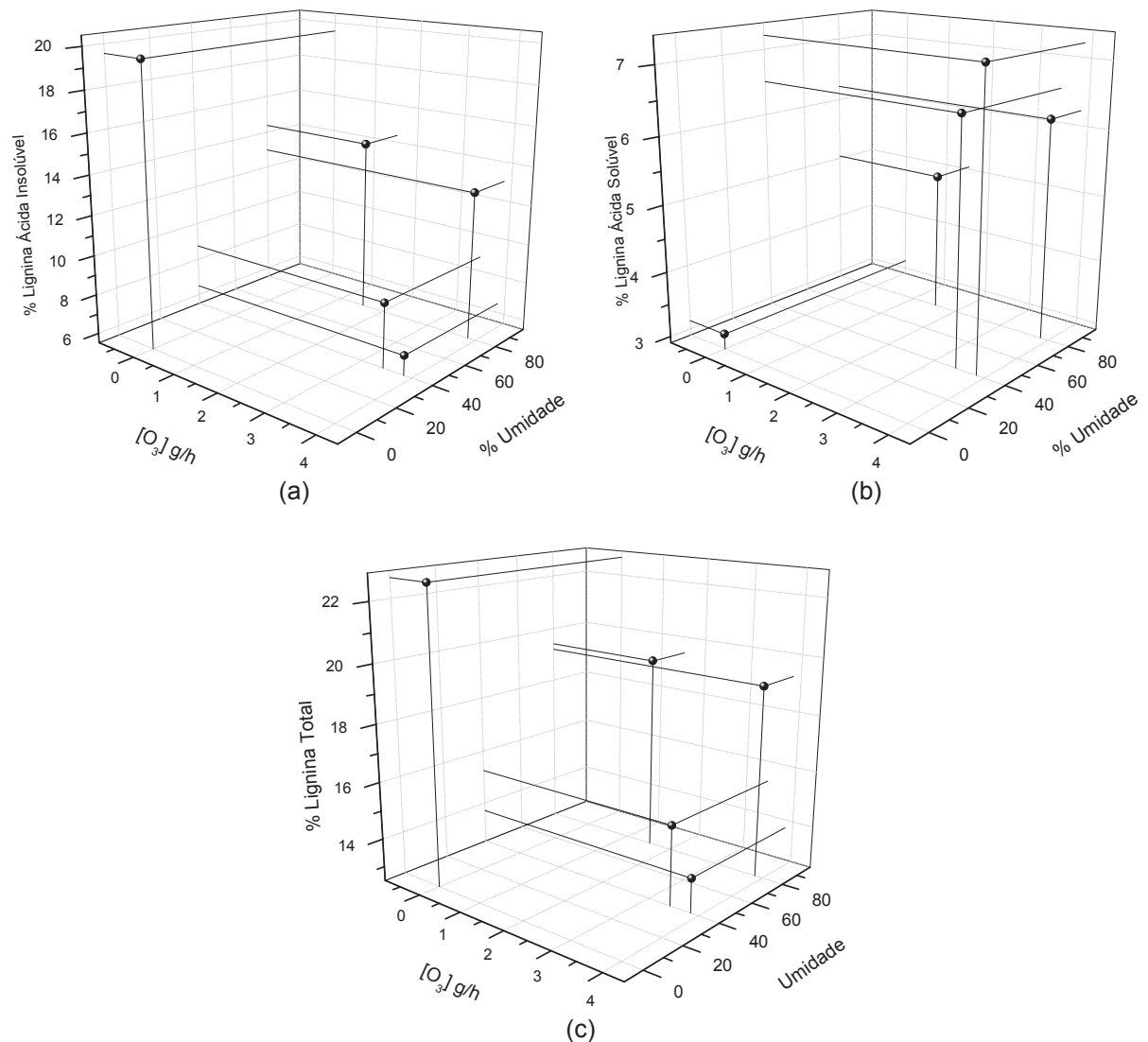
#### 4.2.1 Modificações na lignina após pré-tratamentos

Os parâmetros testados, umidade e concentração de ozônio, revelaram estar relacionados à quantidade e ao tipo de lignina resultante após cada pré-tratamento, assim como à capacidade de oxidação da lignina pelo ozônio.

A fim de facilitar a visualização dos efeitos dos pré-tratamentos, nos três gráficos da Figura 2, foram plotados os valores de lignina presente no bagaço *in natura* no ponto onde se lê concentração de ozônio 0 g/h e umidade 0 % em cada gráfico.

No gráfico (a) é possível observar que há uma diminuição significativa na quantidade de lignina ácida insolúvel (LAI) em todos os pré-tratamentos quando os comparamos àquela presente no bagaço *in natura*,  $19,54 \pm 0,03$  %. A umidade possui papel de grande importância na ação do ozônio sobre a lignina do bagaço. Nos ensaios realizados com 80 % de umidade o aumento na concentração de ozônio de

1,53 para 3,85 g/h ocasionou uma diminuição da quantidade de LAI, de  $14,37 \pm 0,17$  para  $12,99 \pm 0,02$  %, enquanto nos ensaios a 40 % de umidade, um aumento na concentração de ozônio de apenas 3,44 para 3,85 g/h, ocasionou diminuição na quantidade de LAI  $8,75 \pm 0,51$  para  $6,49 \pm 0,03$  %.



**Figura 2:** Modificações na lignina ácida insolúvel (a), lignina ácida solúvel (b) e lignina total (c) após pré-tratamentos.

Diferente do observado no gráfico (a), no gráfico (b), o aumento da quantidade de lignina ácida solúvel (LAS),  $3,13 \pm$  no bagaço *in natura*, não sofre o mesmo tipo de influencia pela umidade, passando de  $5,04 \pm 0,00$  para  $6,22 \pm 0,07$  %

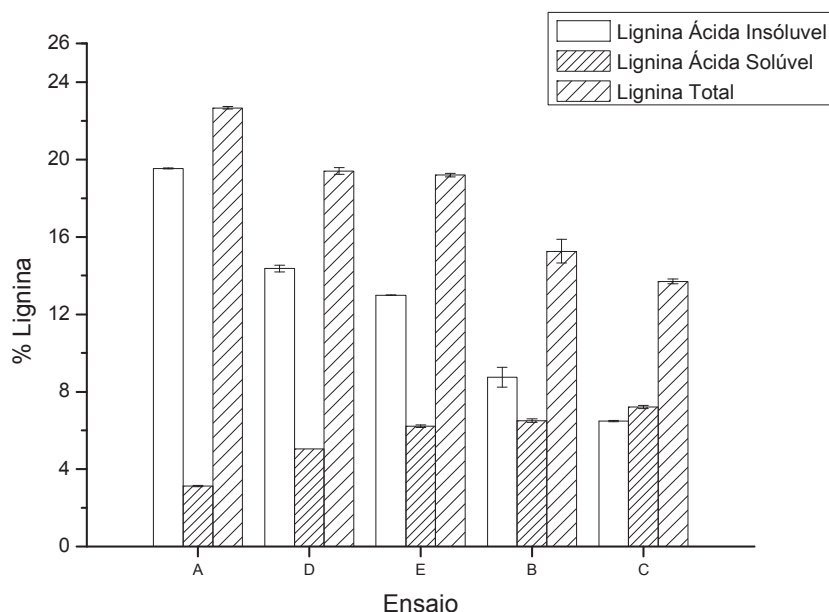
nos ensaios com 80 % de umidade e concentração de ozônio 1,53 e 3,85 g/h, respectivamente; e de  $6,51 \pm 0,10$  para  $7,21 \pm 0,09$  % nos ensaios com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 e 3,85 g/h, respectivamente. É evidenciado o fato de que a quantidade de água no meio possui papel significativo na solubilização da LAI a LAS.

No gráfico (c) é observado o mesmo comportamento de (a), no entanto com diferenças mais acentuadas,  $22,67 \pm 0,07$  % no bagaço *in natura*, nos quais nos ensaios a 80 % de umidade a quantidade de lignina total (LT) praticamente não varia com a variação da concentração de ozônio, de  $19,41 \pm 0,17$  para  $19,20 \pm 0,09$  %, e nos ensaios a 40 % a quantidade de LT diminui de  $15,26 \pm 0,61$  para  $13,70 \pm 0,12$  %, com um pequeno aumento na concentração de ozônio.

Isso demonstra que ainda que a umidade seja necessária e permita a transferência do ozônio da fase gasosa para a fase líquida e o conseqüente ataque à lignina e solubilização, conversão da LAI em LAS, o aumento da umidade impede a oxidação da lignina a outros compostos de menor peso molecular, evidenciado pelo gráfico (c) onde nos ensaios a 80 % de umidade a diminuição da LT é bastante inferior àquela dos ensaios a 40 % de umidade.

Na Figura 3 é possível observar a mudança do perfil de proporção de LAS, LAI e LT após os ensaios de pré-tratamento.

Os ensaios foram alocados graficamente em ordem crescente de ataque à lignina, é possível observar que enquanto a quantidade de LAI diminui a quantidade de LAS aumenta e a quantidade de LT diminui, evidenciando que as oxidações e reações do ozônio com a lignina contribuem para a solubilização assim como para sua transformação em outros compostos químicos de menor peso molecular.



**Figura 3:** Modificações no perfil da lignina ácida insolúvel, lignina ácida solúvel e lignina total do bagaço após pré-tratamentos (A – Bagaço *in natura*; B – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,44 g/h; C – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h; D – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 1,53 g/h; E – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h).

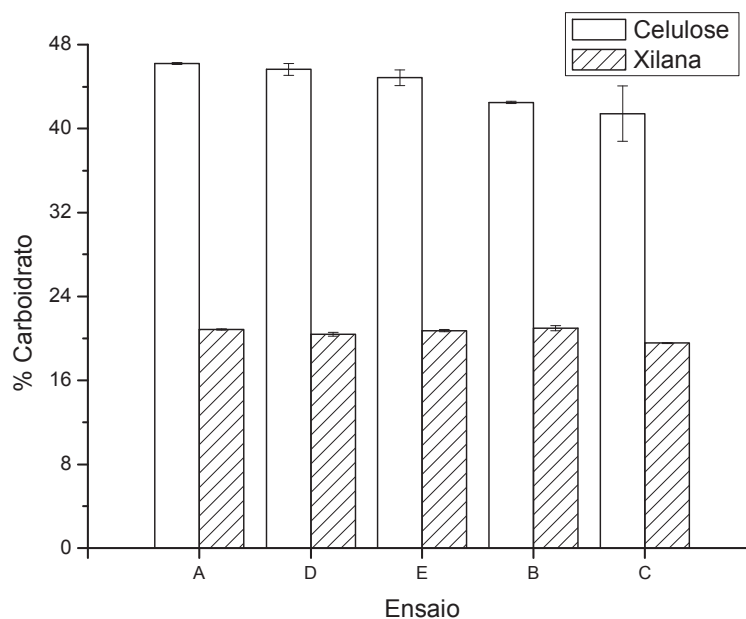
Tanto solubilização, como a transformação da lignina em outras espécies, contribuem para a melhor acessibilidade das enzimas aos carboidratos, pois permitem a desestruturação da trama entre lignina-carboidrato, solubilizando-os ou simplesmente os tornando mais acessíveis (NEELY, 1984).

#### 4.2.2 Ataque do ozônio aos carboidratos

Um dos pontos positivos em relação ao pré-tratamento com ozônio refere-se ao fato de que os carboidratos são pouco atacados por esse (BINDER *et al.*, 1980; GHEDALIA; MIRON, 1981), Figura 4.

O ataque à celulose segue a mesma tendência que àquele apresentado em relação à lignina, diminuindo de acordo com a mesma seqüência de condições de tratamento encontrado para lignina, apresentando uma diminuição máxima de  $46,21 \pm 0,10$  % no bagaço *in natura* para  $41,43 \pm 2,65$  % no pré-tratamento a 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h.





**Figura 4:** Ataque dos pré-tratamentos aos carboidratos do bagaço (A – Bagaço *in natura*; B – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,44 g/h; C – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h; D – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 1,53 g/h; E – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h).

O ataque à xilana não apresenta características semelhantes ao da celulose, mantendo valores próximos ao encontrado no bagaço *in natura*,  $20,86 \pm 0,05$  %, somente apresentando ligeira diminuição no mesmo tratamento que apresentou maior ataque à celulose, para  $19,57 \pm 0,04$  %.

#### 4.3 Inibidores de fermentação

Um dos fatores que por vezes inviabilizam os métodos de pré-tratamentos é a presença de inibidores de fermentação, pois ainda que esses não interfiram na etapa de hidrólise enzimática, podem ser os responsáveis pela falta de sucesso na etapa final de fermentação do hidrolisado a etanol e na produção de outros produtos de biorrefinaria que envolvam etapas fermentativas (ALVIRA *et al.*, 2010).

Na Tabela 3 estão expostos os valores encontrados de quarto conhecidos

inibidores de fermentação: ácido propiônico, ácido fórmico, ácido acético e furfuraldeído. Também foi analisada a presença de ácido butírico, não sendo detectado dentro dos limites de detecção do método empregado. As análises foram realizadas com o bagaço resultante do primeiro ensaio de pré-tratamento realizado, umidade a 40 % e concentração de ozônio 3,44 g/h, dosando-se os inibidores nas enzimas comerciais utilizadas, no sobrenadante do hidrolisado e na água de lavagem.

**Tabela 3:** Análise de inibidores de fermentação.

<b>Amostra</b>	<b>Ácido Propiônico</b>	<b>Ácido Fórmico</b>	<b>Ácido Acético</b>	<b>Furfuraldeído</b>
Controle <sup>1</sup>	0,00432±0,00003	0,02389±0,00010	0,01563±0,00020	ND
Hidrolisado <sup>2</sup>	0,00782±0,00087	0,40810±0,02093	1,40040±0,07359	0,01582±0,00058
Água de lavagem <sup>3</sup>	0,00497±0,00007	0,18300±0,00731	0,10675±0,00037	0,01079±0,00247

<sup>1</sup>inibidores presentes nas enzimas comerciais; <sup>2</sup>inibidores presentes no sobrenadante do hidrolisado; <sup>3</sup>inibidores presentes no sobrenadante após lavagem do bagaço pré-tratado; ND: não detectado dentro dos limites de detecção do método empregado para análise. Dados em g/L.

O termo água de lavagem é proveniente de um ensaio realizado na tentativa de se remover todo, ou parte, dos inibidores. Foi realizada pela adição de 6 % de bagaço em erlenmeyers com água destilada sob agitação de 300 rpm a 25 °C durante 1 hora, analisado-se o sobrenadante destes ensaios. Apesar da simplicidade do ensaio proposto, é possível observar sua eficiência na remoção de inibidores.

Baseado nestes resultados, os ensaios seguintes de hidrólise foram realizados com bagaço pré-tratado e bagaço pré-tratado lavado, comparando-se os resultados.

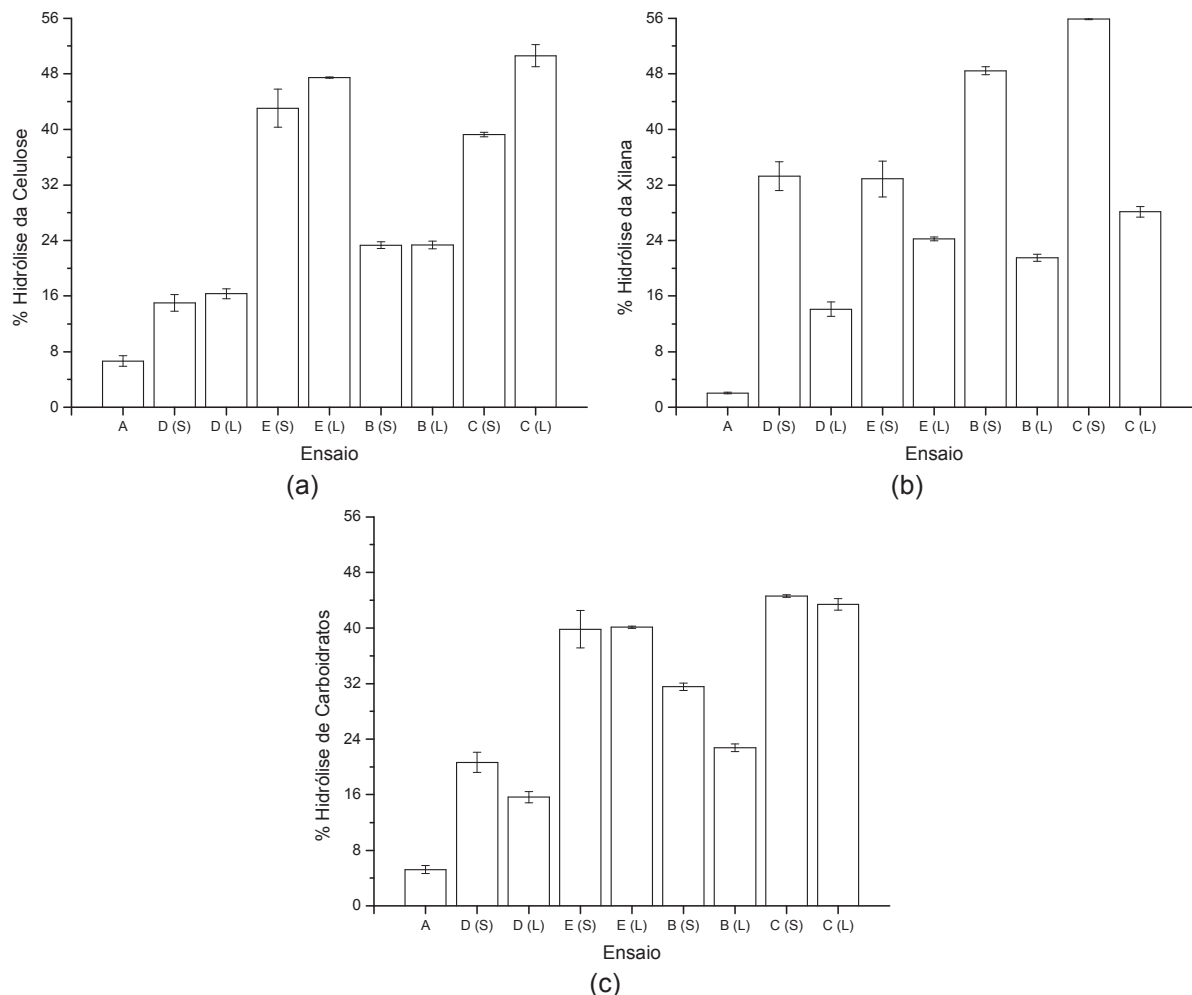
#### 4.4 Atividade sobre papel de filtro

A atividade da mistura das enzimas Novozymes NS50013 e NS50010, na

proporção de 66:31 (v/v), encontrada foi de  $39,07 \pm 0,89$  FPU·mL<sup>-1</sup>.

#### 4.5 Hidrólise enzimática

Na Figura 5 estão representados em termos de porcentagem de conversão por hidrólise enzimática: (a) celulose, (b) xilana e (c) carboidratos, para bagaço *in natura*, pré-tratado e pré-tratado lavado.



**Figura 5:** Rendimento das hidrólises enzimáticas em %: (a) celulose, (b) xilose e (c) celulose e xilose, do bagaço pré-tratado (S) e pré-tratado lavado (L). Ensaios: A – Bagaço *in natura*; B – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,44 g/h; C – pré-tratado 40 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h; D – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 1,53 g/h; E – pré-tratado 80 % de umidade e [O<sub>3</sub>] 3,85 g/h.

A ordem dos pré-tratamentos expressos nos gráficos (a), (b) e (c) da Figura 5 estão de acordo com o ataque à lignina, partindo do ataque mais brando com 80 %

de umidade e concentração de ozônio 1,53 g/h até o mais severo com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h, e é interessante notar que a eficiência de hidrólise não segue a mesma ordem ainda que isso fosse esperado de acordo com a teoria, pela solubilização e oxidação da lignina. O pré-tratamento com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 g/h é inferior àquele com 80 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 g/h no que concerne à conversão de celulose e de carboidratos totais, ainda que o ataque à lignina demonstre o contrário, como expresso na Figura 3.

Isso demonstra que o ataque à lignina não pode ser relacionado diretamente e como fator absoluto potencializador da hidrólise enzimática, pois embora ocorra um maior ataque a essa, o modo como isso ocorre alterando a trama submicroscópica assim como a estrutura molecular são os responsáveis pela maior acessibilidade aos carboidratos (GARCÍA-CUBERO *et al*, 2009).

Quando comparados, os pré-tratamentos comuns e os pré-tratamentos lavados é possível notar que o processo de lavagem possui diferentes conseqüências sobre a hidrólise. Enquanto a lavagem potencializa a eficiência de hidrólise da celulose, diminui a da xilana, isso provavelmente devido à solubilização deste último na água de lavagem (SUN; CHENG, 2002). Esta perda de xilana não representa necessariamente um fator negativo, pois quando pensamos em fermentações alcoólicas para produção de etanol, é conhecida a dificuldade que os microrganismos empregados neste tipo de fermentação enfrentam para fermentar pentoses (OLOFSSON; RUDOLF; LIDÉN, 2008). Já quando se analisa do ponto de vista dos recentes estudos com microrganismos diauxicos as alterações na eficiência de hidrólise dos dois carboidratos em conjunto (c) não representa perdas consideráveis.

O melhor pré-tratamento considerando-se a eficiência de hidrólise enzimática alcançada foi com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h, (a) aumentando a hidrólise da celulose de  $6,64 \pm 0,77$  % para  $39,27 \pm 0,32$  % no pré-tratado e para  $50,62 \pm 1,59$  % no pré-tratado lavado, (b) hidrólise da xilana de  $2,05 \pm 0,13$  % para  $55,90 \pm 0,14$  % no pré-tratado e diminuindo para  $28,14 \pm 0,75$  % no pré-tratado lavado, e finalmente (c) aumentado de  $5,21 \pm 0,27$  % de hidrólise de carboidratos para  $44,61 \pm 0,17$  % no pré-tratado e  $43,41 \pm 0,84$  % no pré-tratado lavado.

#### 4.6 Micrografias Eletrônicas

Buscando elucidar-se um pouco do que ocorre com o bagaço após os pré-tratamentos, e também o resultado da lavagem, foram realizadas micrografias eletrônicas de varredura do bagaço *in natura*, do bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 g/h sem lavar, do bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 g/h lavado, do bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h sem lavar e do bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h lavado; em aumentos de 50, 500, 1000 e 4000X. As imagens obtidas encontram-se nos Anexos 1, 2, 3 e 4 com os aumentos de 50, 500, 1000 e 4000X respectivamente.

Como pode ser observado nas imagens, ainda que as análises de quantificação de lignina demonstrem que o ensaio com 40 % de umidade e concentração de ozônio 3,44 g/h apresentou maior ataque que o ensaio a 80 % de umidade e concentração de ozônio 3,85 g/h, esse último apresenta um bagaço com maior destruição das estruturas fibrosas e também com maior porosidade, o que

pode justificar os melhores resultados de hidrólise.

Comparando-se as micrografias do pré-tratado lavado com as do pré-tratado, é possível observar que o processo de lavagem expõe as fibras de celulose do bagaço e aumenta a quantidade de poros observáveis, devido provavelmente à solubilização de material oxidado que se encontrava depositado sobre as fibras.

## 5 CONCLUSÕES – CAPÍTULO 1

Na melhor condição de trabalho encontrada, 40 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h, a conversão da lignina ácida insolúvel em lignina ácida solúvel apresentou um aumento de mais de 4 pontos percentuais, e diminuição de quase 10 pontos percentuais na concentração final de lignina total no bagaço pré-tratado.

Os pré-tratamentos aumentaram significativamente a eficiência de conversão dos polímeros de carboidratos a monossacarídeos pelo complexo enzimático utilizado, aumentando quase 10 vezes mais a conversão de celulose e mais de 15 vezes a conversão da xilana.

Houve pouco ataque aos carboidratos do bagaço tratado, praticamente não havendo ataque à xilana. Quando o bagaço não foi lavado antes da hidrólise enzimática não há perda de xilose por solubilização, que é considerado como ponto negativo de diversos pré-tratamentos que trabalham em meio líquido.

O processo de lavagem se mostrou eficiente para diminuir pela metade ou mais a concentração dos inibidores quantificados, exceto o ácido acético, que praticamente não foi solubilizado durante a lavagem. No entanto, a concentração desse ácido no hidrolisado, assim como dos outros inibidores está bastante abaixo daquelas indicadas como prejudiciais aos microrganismos mais utilizados nos processos de fermentação alcoólica (OLIVA *et al.*, 2006; PALMQVIST *et al.*, 1999; TAHERZADEH; NIKLASSON; LIDÉN, 1997). O processo de lavagem também teve papel importante no aumento da eficiência de conversão da celulose, ainda que com perda de xilose por solubilização, a eficiência global da conversão dos dois açúcares manteve-se praticamente constante, com glicose compensando a perda de xilose.

## **CAPÍTULO 2**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
BRASIL**

**ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO DA SILVA**



## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Preparo do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço utilizado foi preparado de maneira idêntica à descrita no tópico 3.1 *Preparo do bagaço de cana-de-açúcar*, proveniente da mesma usina e cedido no mês de junho de 2011.

### 6.2 Pré-tratamentos

Os pré-tratamentos foram realizados em reator de leito fixo (coluna de vidro, 3,0 cm x 40 cm, com difusor cerâmico de bolhas) acoplado a gerador de ozônio Radast 10C (Ozoxi), alimentado por compressor de ar. A matéria prima foi ajustada para 40 % de umidade com diferentes soluções aquosas, e sem e com irradiação UV 1,7 W em 253,7 nm a 2 cm da coluna, como descrito na tabela 4 abaixo:

**Tabela 4:** Condições dos ensaios.

Ensaio	Solução	Condição de Ensaio
F <sup>1</sup>	--	--
G	água destilada	normal
H	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	normal
I	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	irradiado com UV
J	água destilada	irradiado com UV
K	TiO <sub>2</sub> 2 g·L <sup>-1</sup>	irradiado com UV
L <sup>2</sup>	NaOH 0,294 M	normal
M <sup>3</sup>	HCl 0,171 M	normal

<sup>1</sup>Controle: matéria prima sem pré-tratamento; <sup>2</sup>pH final do bagaço igual a 11,0; <sup>3</sup>pH final do bagaço igual a 3,0.

A concentração de ozônio no fluxo foi medida por método iodométrico (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND

WASTEWATER, 1995) e fixada em 3,85 g/h. A matéria pré-tratada foi mantida congelada a -18 °C até sua utilização.

### 6.3 *Caracterização do bagaço in natura e pré-tratado*

Bagaço *in natura* e pré-tratado foram caracterizados de maneira idêntica à descrita em 3.3 *Caracterização do bagaço in natura e pré-tratado*.

### 6.4 *Fermentação para produção das enzimas*

#### 6.4.1 Inóculo

A partir da cultura de manutenção dos fungos mesofílicos *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414 que encontravam-se estocados na coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto, em tubos de ensaio com PDA (*Potato Dextrose Agar*) inclinado, submerso em óleo mineral, em câmara fria a 5 °C, foram inoculados 2 erlenmeyers com 50 mL de PDA inclinado para cada fungo. As culturas foram incubadas a 27 °C durante 9 dias.

#### 6.4.2 Solução Salina

Foi utilizada como solução salina durante a fermentação a solução proposta por Toyama e Ogawa (1978): 0,35% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05% de  $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 0,05% de  $\text{CaCl}_2$ , previamente esterilizada em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos.

### 6.4.3 Fermentadores

Foram utilizados como fermentadores sacos de polipropileno de 15 cm x 30 cm, acoplados com bocal de PVC de 3,5 cm de comprimento e 1,5” de diâmetro, fechados com tampão de algodão envolto por gaze, para garantir a troca de gases e assegurar que não houvesse contaminação por outros microrganismos.

Bagaço de cana-de-açúcar (3.1 *Preparo do bagaço de cana-de-açúcar*) e farelo de trigo comercial foram lavados com água e secos em estufa com circulação de ar quente a 50 °C; o bagaço de cana foi separado em peneira de café para remoção da parte mais grosseira e em seguida passado por peneira granulométrica, descartada a fração menor que 2 mm.

Foram utilizados 5,0 g de substrato por fermentador, dos quais 2,5 g de bagaço de cana-de-açúcar e 2,5 g de farelo de trigo, adicionados de 5 mL da solução salina (6.4.2 Solução Salina) esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 30 minutos.

### 6.4.4 Contagem de esporos e inoculação

Após 9 dias de incubação do inóculo os esporos de cada erlenmeyer foram suspensos, por cuidadosa raspagem com alça de platina, em 50 mL da solução salina. A quantidade de esporos foi determinada por câmara de Neubauer, seguida de contagem em microscópio ótico. Os fermentadores contendo os substratos esterilizados foram inoculados com volumes de suspensão padronizados com  $5,0 \times 10^7$  esporos, e completados com solução salina (6.4.2 Solução Salina) para um volume final de 20,0 mL resultando em 80% de umidade, suficientes para umedecer o meio de fermentação sem a presença de água livre.

#### 6.4.5 Fermentação em estado sólido (FES)

Os fermentadores contendo o substrato inoculado foram incubados a 27 °C durante 5 dias. As enzimas foram extraídas pela adição de 100 mL de água destilada e homogeneizadas para desaglomeração das estruturas miceliares. A suspensão foi então transferida para erlenmeyers de 250 mL onde permanecia em agitador orbital a 150 rpm por 1 hora. Após agitação as amostras foram centrifugadas a 20000 xg durante 20 minutos a 5 °C, para remoção de células e outras partículas sólidas em suspensão.

### 6.5 *Atividades enzimáticas*

#### 6.5.1 Atividade de $\beta$ -glicosidase

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada utilizando 50  $\mu$ L do extrato enzimático bruto devidamente diluído, 250  $\mu$ L de tampão 0,1 M em pH adequado e 250  $\mu$ L de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo (PNPG, Sigma Co.) 4 mM, por 10 minutos em banho termostático na temperatura ótima de cada enzima. A reação foi então interrompida pela adição de 2 mL de NaCO<sub>3</sub> 2 M e o nitrofenol liberado quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol.

#### 6.5.3 Atividade sobre papel de filtro (FPase)

A atividade de papel de filtro, FPase, foi realizada de acordo com o método descrito por Eveleigh *et al.* (2009).

## 6.6 Hidrólise Enzimática

As hidrólises enzimáticas da matéria-prima *in natura* e tratada foram realizadas em erlenmeyers com 6 % de bagaço *in natura* ou pré-tratado em tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0, 2,49 FPU/g<sub>CELULOSE</sub> do extrato obtido da FES com *T. reesei* QM9414 ou do complexo comercial NS22086 (Novozymes) e 23,68 U/g<sub>CELULOSE</sub> de  $\beta$ -glicosidase produzida por FES pelo fungo *P. viridicatum* RFC3 ou proveniente do complexo comercial NS22118 (Novozymes).

Os erlenmeyers foram então hermeticamente fechados e incubados em shaker orbital a 300 rpm e 45 °C durante 24 horas, sendo em seguida filtradas com filtro de 0,22  $\mu$ m e congeladas a -18 °C para análise de açúcares.

## 6.7 Análise de açúcares

A quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise enzimática foi realizada através de método colorimétrico com DNS (MILLER, 1959) e os melhores resultados por cromatografia de troca aniônica de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada, HPAEC-PAD (ICS 3000, Dionex Corporation, EUA) equipado com amostrador automático AS40. Com volume de injeção de 20  $\mu$ L, coluna de troca aniônica CarboPac PA-1 (250x4 mm) em combinação com uma guarda-coluna CarboPac PA-1 (50x4 mm). A forma de onda empregada na detecção foi a “standard quadruple” com os seguintes potenciais de pulso e durações:  $E_1 = 0,10$  V ( $t_1 = 0,40$  s);  $E_2 = -2,00$  V ( $t_2 = 0,02$  s);  $E_3 = 0,60$  V ( $t_3 = 0,01$  s);  $E_4 = -0,10$  V ( $t_4 = 0,06$  s). A eluição utilizada foi isocrática com 10 mM de NaOH, fluxo de 1,0

mL/min a 35°C. O eluente foi preparado com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificado com N<sub>2</sub>. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation, EUA).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

A caracterização bioquímica do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* utilizado nos ensaios revelou composição como detalhada na Tabela 5:

**Tabela 5:** Caracterização bioquímica do bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos ensaios.

<b>Componente</b>	<b>% (p/p)</b>
Umidade	5,09±0,02
Celulose (como glicose)	48,72±0,68
Xilana (como xilose)	23,97±0,20
Lignina Ácida Insolúvel	21,21±1,00
Lignina Ácida Solúvel	4,56±0,06

### 7.2 Pré-tratamentos

Cada uma das diferentes condições de ensaio ocasionou alterações no tempo de saída do ozônio, diferença entre a observação do começo da saída de ozônio sem reagir e o tempo zero de entrada de ozônio no reator; na quantidade de ozônio necessária para tratar um grama de peso seco de bagaço; e no rendimento, ou seja, na quantidade de ozônio que ainda reagia com a matéria-prima, nos 15 minutos após observar-se a saída de ozônio não reagido.

Como exposto na Tabela 6, esses parâmetros estão intrinsecamente relacionados, uma vez que um tempo de saída mais curto, indica uma menor quantidade de ozônio necessária para tratar a matéria-prima contida no reator, que por sua vez passa a sair do reator sem reagir em maior quantidade nos 15 minutos finais do processo de ozonólise.

**Tabela 6:** Condições e rendimentos dos ensaios de pré-tratamento.

Ensaio	Tempo de saída de ozônio não reagido (min)	mgO <sub>3</sub> /g <sub>BAGAÇO</sub>	Rendimento dos 15 min finais (%)
F	--	--	--
G	34	117,5±0,7	82,1±0,1
H	27	112,8±0,8	73,2±0,5
I	30	117,0±0,1	84,8±0,2
J	36	119,2±0,1	84,9±0,4
K	27	110,7±0,1	70,8±0,2
L	36	118,6±0,0	89,2±0,1
M	26	112,4±0,1	72,4±0,2

F – bagaço *in natura*; G – 40 % de umidade, H – 40 % de umidade e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; I – 40 % de umidade e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; J – 40 % de umidade e UV; K – 40 % de umidade e TiO<sub>2</sub>/UV; L – 40 % de umidade e pH 11,0; M – 40 % de umidade e pH 3,0.

Como pode ser observado comparando-se os ensaios que foram realizados com e sem irradiação UV, G/J e H/I, a utilização da radiação UV ocasionou aumento na quantidade de ozônio necessário para tratar o bagaço, e aumentou o rendimento nos 15 minutos finais. Isso pode ter ocorrido principalmente devido à destruição do ozônio pela absorção da radiação UV, resultando na necessidade de maior quantidade deste.

A menor quantidade de ozônio foi utilizada no ensaio realizado dióxido de titânio. O dióxido de titânio sob radiação UV é capaz de produzir radicais hidroxila em grande quantidade, o que pode ter auxiliado na utilização de menor quantidade de ozônio (PENGYI *et al.*, 2003).

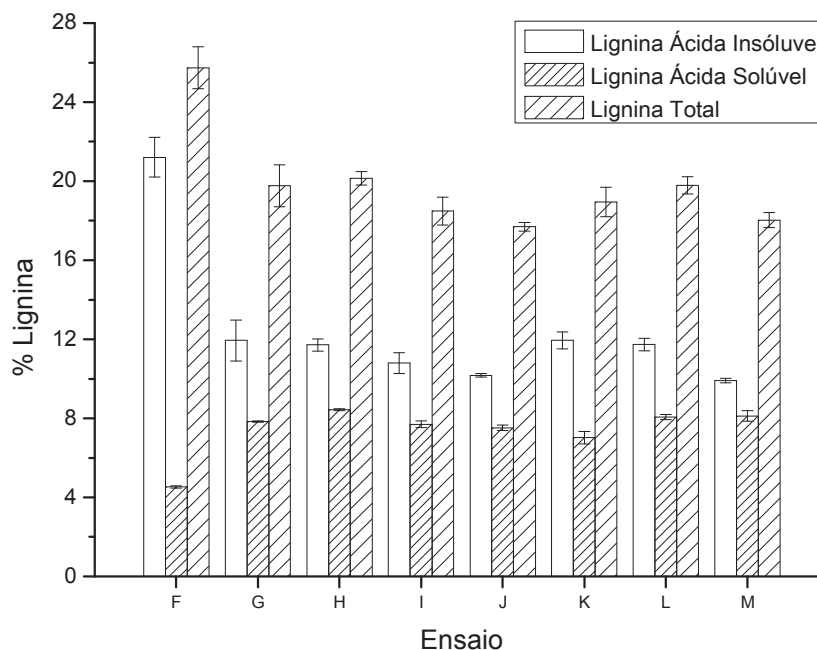
Quando observado os ensaios em meio ácido e básico, fica claro que o meio ácido é melhor para a utilização do ozônio, uma vez que em meio básico esse é decomposto (LJUNGGREN; JOHANSSON, 1990).

### 7.2.1 Modificações na lignina após pré-tratamentos

A adição de outros compostos químicos à ozonólise do bagaço de cana ocasionou pequenas variações nas quantidades de LAI, LAS e LT em relação ao



ensaio controle com 40 % de umidade (Figura 6, ensaio F).



**Figura 6:** Modificações no perfil da lignina ácida insolúvel, lignina ácida solúvel e lignina total do bagaço após pré-tratamentos. Ensaios: F – bagaço *in natura*; G – 40 % de umidade, H – 40 % de umidade e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; I – 40 % de umidade e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV; J – 40 % de umidade e UV; K – 40 % de umidade e TiO<sub>2</sub>/UV; L – 40 % de umidade e pH 11,0; M – 40 % de umidade e pH 3,0.

Apesar das variações e diferenças envolvidas nos ensaios realizados na Espanha e no Brasil, como lote de bagaço, dimensões do reator, pressão atmosférica, tempo de ozonólise, etc, a diminuição das quantidades de lignina no ensaio com 40 % de umidade em relação ao bagaço *in natura*, seguiu a mesma tendência, baixando a quantidade de LAI de 21,21±1,00 para 11,94±1,03 %, aumentando a de LAS de 4,53±0,06 para 7,83±0,04 %, e diminuindo a LT de 25,74±1,06 para 19,77±1,06 %.

A menor quantidade de LAI foi encontrada no ensaio realizado em pH 3,0, com 9,91±0,12 %, a maior quantidade de LAS no ensaio com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com 8,44±0,05 %, e menor quantidade de LT no ensaio em pH 3,0, com 18,03±0,38 %.

### 7.3 Atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas dos complexos comerciais e das enzimas produzidas foram medidas, e encontram-se ilustradas na Tabela 7:

**Tabela 7:** Atividades Enzimáticas.

Enzima	FPase (FPU·mL <sup>-1</sup> )	B-glicosidase (U·mL <sup>-1</sup> )
Complexo Comercial NS22086 Novozymes	489,62±9,12	ND
Complexo Comercial NS22118 Novozymes	ND	773,17±12,41
Extrato produzido por <i>T. reesei</i> QM9414	0,39±0,02	0,18±0,01
Extrato produzido por <i>P. viridicatum</i> RFC3	ND	3,70±0,27

ND: não detectado dentro dos limites do método empregado.

### 7.4 Hidrólise enzimática

Buscando-se padronizar os ensaios realizados no Brasil, com os ensaios realizados na Espanha, a quantidade total de FPU por grama de celulose foi padronizada tanto nos ensaios com enzimas comerciais, quanto nos ensaios com as enzimas produzidas por *T. reesei* QM9414 para 2,49 FPU/g<sub>CELULOSE</sub>, mesmo valor utilizado com o NS50013 no Capítulo 1.

Já a quantidade de U de β-glicosidase por grama de celulose, foi baseada no estudo realizado por Travaini, 2008, mantendo-se a proporção ótima descrita no trabalho de 1:1 (v/v) dos extratos enzimáticos produzidos por *T. reesei* QM9414 e *P. viridicatum* RFC3, resultando em 23,68 U/g<sub>CELULOSE</sub> a mesma quantidade de enzima comercial foi utilizada nos ensaios com estas.

Os ensaios de hidrólise foram realizados com mistura das enzimas comerciais NS22086 e NS22118 e com a mistura dos extratos enzimáticos produzidos pelos fungos *T. reesei* QM9414 e *P. viridicatum* RFC3, com bagaço lavado, como descrito em . 4.3 *Inibidores de fermentação*, proveniente de todos os ensaios de ozonólise

realizados.

Os resultados de porcentagem de sacarificação e concentração de açúcares redutores liberados em  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  encontram-se ilustrados na Tabela 8. Em todos os ensaios foi observada uma melhor conversão enzimática quando foi utilizada a mistura dos extratos enzimáticos produzidos por FES, ao invés do da mistura das enzimas comerciais. As enzimas produzidas obtiveram uma melhor eficiência em relação às enzimas comerciais que variou entre 3 e 25 %.

**Tabela 8:** Porcentagem de sacarificação e concentração de Açúcares Redutores Liberados ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Ensaio	Tipo de Enzima	% Sacarificação	ARL ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
F	Produzida	9,19±0,06	4,01±0,05
	Comercial	6,86±0,04	2,99±0,04
G	Produzida	34,94±0,12	13,87±0,73
	Comercial	33,78±0,01	13,41±0,05
H	Produzida	39,03±0,04	15,50±0,37
	Comercial	34,81±0,01	13,82±0,08
I	Produzida	36,16±0,11	14,36±0,49
	Comercial	30,75±0,06	12,21±0,27
J	Produzida	36,60±0,10	14,53±0,53
	Comercial	33,96±0,04	13,48±0,21
K	Produzida	33,98±0,12	13,49±0,43
	Comercial	31,90±0,06	12,67±0,22
L	Produzida	36,86±0,01	14,64±0,07
	Comercial	32,90±0,04	13,06±0,37
M	Produzida	36,98±0,17	14,68±1,38
	Comercial	33,39±0,02	13,26±0,61

F – bagaço *in natura*; G– 40 % de umidade, H – 40 % de umidade e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; I – 40 % de umidade e  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ; J – 40 % de umidade e UV; K – 40 % de umidade e  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ ; L – 40 % de umidade e pH 11,0; M – 40 % de umidade e pH 3,0.

O melhor rendimento foi encontrado no pré-tratamento realizado com ozônio e peróxido de hidrogênio, utilizando as enzimas produzidas, com 39,03±0,04 % de sacarificação e 15,50±0,37  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Açúcares Redutores Liberados (ARL). Neste ensaio foram quantificadas a quantidade de glicose e xilose liberadas por cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica, obtendo-se 9,16±0,08  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose e 5,47±0,01  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de xilose.

Os melhores rendimentos hoje encontrados na literatura para bagaço de cana referem-se aos pré-tratamentos com hidrólise ácida, que apesar de seu rendimento, são economicamente impraticáveis. Pattra *et al.*, 2008 em ensaios com bagaço de cana tratado com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5 %, 121 °C durante 60 minutos, relata rendimentos de 24,5 g·L<sup>-1</sup> de açúcares totais, dos quais 11 g·L<sup>-1</sup> de glicose e 11,29 g·L<sup>-1</sup> de xilose. Hernández-Salas *et al.*, 2009 utilizando ácido clorídrico 1,2 % a 121 °C durante 4 horas como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, seguido de hidrólise enzimática, alcança uma conversão de 30 % em açúcares totais em peso.

Martín; Klinke; Thomsen, 2007, utilizando como pré-tratamento do bagaço de cana a oxidação úmida a 185 °C, em pH ácido durante 5 minutos, seguido de hidrólise enzimática, relatam 16,1 % de conversão em açúcares redutores.

## 8 CONCLUSÕES – CAPÍTULO 2

Com a utilização de aditivos químicos e utilização da irradiação UV, as quantidades de ligninas pouco variaram, em relação ao tratamento. No entanto observou-se uma utilização de menor quantidade de ozônio por grama de bagaço, indicando que a utilização de aditivos e/ou UV pode auxiliar nos processos de oxidação e conversão da lignina.

Houve aumento em torno de 3,5 a 5 vezes na hidrólise enzimática em todos os ensaios realizados com bagaço pré-tratado em relação ao bagaço *in natura*, o melhor pré-tratamento foi encontrado pela adição de peróxido de hidrogênio à ozonólise, sem irradiação UV.

Surpreendentemente, as enzimas produzidas em laboratório apresentaram melhores rendimentos quando comparadas com as enzimas comerciais, ponto bastante favorável visto que foram produzidas em substratos de baixo valor comercial, indicando uma possível produção menos dispendiosa economicamente em relação às enzimas comerciais.

As concentrações de açúcares liberados durante a hidrólise do bagaço pré-tratado com ozônio e peróxido de hidrogênio, estão bastante próximas, quando não superiores, às aquelas encontradas na literatura para pré-tratamentos com a finalidade de sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

## 9 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização do ozônio como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para posterior hidrólise enzimática apresentou características bastante interessantes e dentro dos padrões esperados para novos pré-tratamentos, evidenciado pelas análises das quantidades de ligninas e rendimentos das hidrólises enzimáticas.

O baixo ataque aos carboidratos durante o processo de pré-tratamento é ponto bastante positivo, visto que vários processos de pré-tratamento atacam significativamente esses, diminuindo os rendimentos de hidrólise finais.

Os inibidores fermentativos se mostraram sempre abaixo daqueles encontrados na literatura como nocivos à fermentação alcoólica.

A utilização de aditivos químicos e UV demonstrou diminuição na quantidade de ozônio utilizado para tratar cada grama de bagaço (peso seco), indicando que podem auxiliar no processo de pré-tratamento diminuindo o tempo e por consequência o custo deste.

A comparação de rendimentos no Capítulo 2, entre enzimas comerciais e produzidas em laboratório, resultando em melhores resultados com essas últimas é bastante promissor, visto a possibilidade de menor custo na produção das enzimas.

Esses estudos exploratórios preliminares incitam a continuação do trabalho, e aprofundamento nos pontos chave do processo de pré-tratamento com ozônio para se entender melhor os processos envolvidos e possivelmente melhorar os rendimentos obtidos.

## 10 REFERÊNCIAS

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.

ÅKERHOLM, M.; SALMÉN, L. The mechanical role of lignin in the cell wall of spruce tracheids. **Holzforschung**, v. 57, n. 5, p. 459-465, 2003.

BINDER, A.; PELLONI, L.; FIECHTER, A. Delignification of straw with ozone to enhance biodegradability. **Europe Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 1-5, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Energia. Secretaria de Produção e Agroenergia. In: **Anuário Estatístico da Agroenergia, 2009**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos\\_portal/anuario\\_cana.pdf](http://www.agricultura.gov.br/images/MAPA/arquivos_portal/anuario_cana.pdf)>. Acesso em: 18 jul. 2009.

CERQUEIRA, D. A.; RODRIGUES, G. MEIRELES, C. D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 579-582, 2007.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947-1950, 2007.

DA-SILVA, R. Produção, purificação e caracterização de enzimas celulolíticas termoestáveis de *Humicola* sp. 179-5 e aplicação destas enzimas. **Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos)**. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

DA-SILVA, R.; GOMES, E.; FRANCO, C.M.L. Pectinases, hemicelulases e celulases: substrato, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 249-250, 1997.

ESCOBAR, J. C.; LORA, E. S.; VENTURINI, O. J.; YÁÑEZ, E. E.; CASTILLO, E. F.; ALMAZAN, O. Biofuels: environment, technology and food security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1275-1287, 2009.

EVELEIGH, D. E.; MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 21-29, 2009.

GARCÍA-CUBERO, M. 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, p. 1608-1613, 2009.

GHEDALIA, D. B.; MIRON, J. The effect of combined chemical and enzyme treatments on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 23, 823-831, 1981.

HERNÁNDEZ-SALAS, J. M.; VILLA-RAMÍREZ, M. S.; VELOZ-RENDÓN, J. S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K. N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R. A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M. A.; TREJO-ESTRADA, S. R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Organisation for Economic Co-operation and Development. In: **Key world energy statistics, 2010**. Disponível em: <[http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2010/key\\_stats\\_2010.pdf](http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2010/key_stats_2010.pdf)>. Acesso: 25 nov. 2010.

LJUNGGREN, S.; JOHANSSON E. The Kinetics of Lignin Reactions during oxygen bleaching. **Nordic Pulp and Paper Research Journal**, v. 5, n. 3, p. 148-154, 1990.

KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOU V.; CHRISTAKOPOULOU P. Optimization of xylanase production by *Thermomyces lanuginosus* in tomato seed meal using response surface methodology. **World Journal of Microbiology; Biotechnology**, v. 22, p. 501-506, 2006.

LEITE, R. S. R.; GOMES, E.; SILVA, R. Characterization and comparison of thermostability of purified  $\beta$ -glucosidases from a mesophilic *Aureobasidium pullulans* and a thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 7, p. 1101-1106, 2007.

LI, X.; KONDO, R.; SAKAI, K. Biodegradation of sugarcane bagasse with marine fungus *Phlebia sp.* MG-60. **Journal of Wood Science**, v. 48, p. 159-162, 2002.

MAIA, E. P.; COLODETTE, J. L. Efeito do conteúdo e da natureza da lignina residual na eficiência e na seletividade do branqueamento com ozônio. **Revista Árvore**, v.



27, n. 2, p. 217-232, 2003.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98–100, p. 699–716, 2002.

MARTÍN, C.; KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 40, p. 426–432, 2007.

MEDEIROS, D. R. **Tratamento de efluentes do branqueamento da polpa celulósica por processos oxidativos avançados baseados em ozônio**. São Carlos, 2008. Originalmente apresentado como tese para obtenção do título de doutor em engenharia. Universidade de São Paulo, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-434, 1959.

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.

NEELY, W. C. Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 26, p. 59-65, 1984.

NELSON, D.L.; COX M. Carbohydrates and Glycobiology. **In: Lehninger Principles of Biochemistry**, 4<sup>a</sup> ed., Palgrave Macmillan, cap. 7, p. 249, 2004.

OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1223-1228, 2006.

OLOFSSON, K.; RUDOLF, A.; LIDÉN, G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improve xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 112-120, 2008.

PALMQVIST, E.; GRAGE, H.; MEINANDER, N. Q.; HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and

ethanol productivity of yeasts. **Biotechnology and Bioenergy**, v. 63, p. 46–55, 1999.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T; VANDENBERGUE, L.P.S.; MOHAN, R. Biotechnological potencial of agro-industrial residues II: cassava bagasse. **Bioresource Tecnology**, v. 74, p. 81-87, 2000.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 5256-5265, 2008.

PENG, F.; REN, J. L.; XU, F.; BIAN, J.; PENG, P.; SUN, R.C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6305-6317, 2009.

PENGYI, Z.; FUYAN, L.; GANG, Y.; QING, C.; WANPENG, Z. A comparative study on decomposition of gaseous toluene by O<sub>3</sub>/UV, TiO<sub>2</sub>/UV and O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub>/UV. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 156, p. 189-194, 2003.

POLIZELI, M.L.T.M.; RIZZATI A.C.S.; MONTI R.; TERENCE H.F.; JORGE J.A.; AMORIM, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 577-591, 2005.

PURÍ, V. P. Ozone pretreatment to increase digestibility of lignocellulose. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 11, p. 773-776, 1983.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; MAIOR, A. M. S.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Diluted mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, v. 1, p. 663-670, 2011.

SLUITER, A.; HAMES, R.; RUIZ, C.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **Technical Report NREL/TP-510-42618**. Disponível em: < <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42618.pdf>>. Acesso em: 01 set. 2011

STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER. **APHA, AWWA, WEF**, 19<sup>a</sup> edição, Washington DC., 1995.

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

TAHERZADEH, M. J.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Acetic acid friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*? **Chemistry Engineer Science**, v. 52, p. 2653–2659, 1999.

TENGERDY, R. P.; SZAKACS, G. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 169-179, 2003.

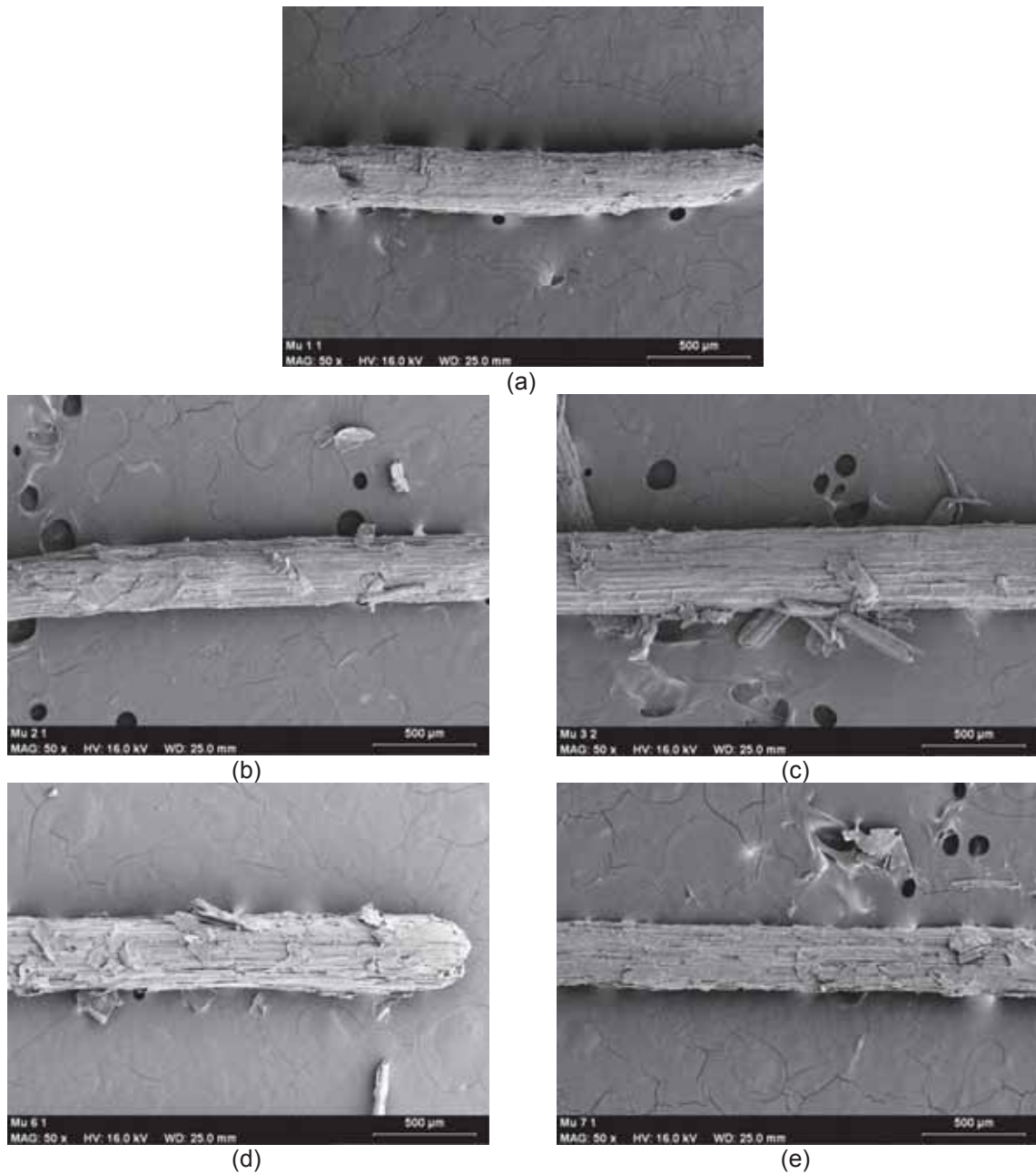
TOYAMA, N.; OGAWA, K. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture methods. In: **Ghose, T.K. (Ed.), Bioconversions of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial protein. Symp. Proc. 1977**, Indian Institute of Technology, New Delhi, p. 305-327, 1978.

TRAVAINI, R. **Estudos sobre a produção e caracterização de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas produzidas por *Penicillium viridicatum* RFC3 e *Trichoderma reesei* QM9414 e aplicação dos extratos enzimáticos na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar**. São José do Rio Preto, 2008. Originalmente apresentado como monografia de conclusão de curso, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, 2008.

TU, Q.; FU, S.; ZHAN, H.; CHAI, X.; LUCIA, L.A. Kinetic modeling of formic acid pulping of bagasse. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v. 56, p. 3097–3101, 2008.

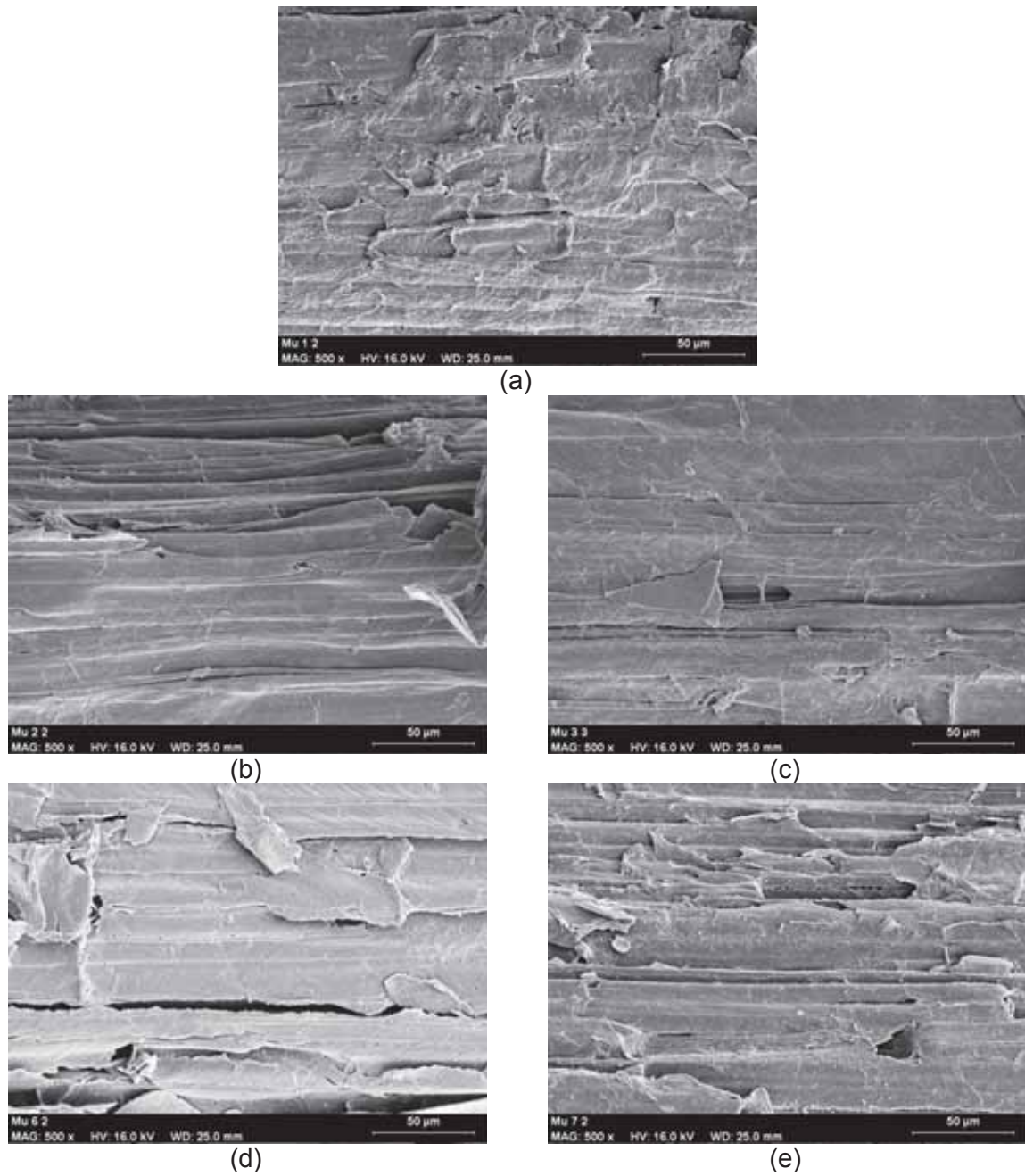
VIDAL, P. F.; MOLINIER, J. Ozonolysis of lignin – improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. **Biomass**, v. 16, p. 1-17, 1988.

## ANEXO 1



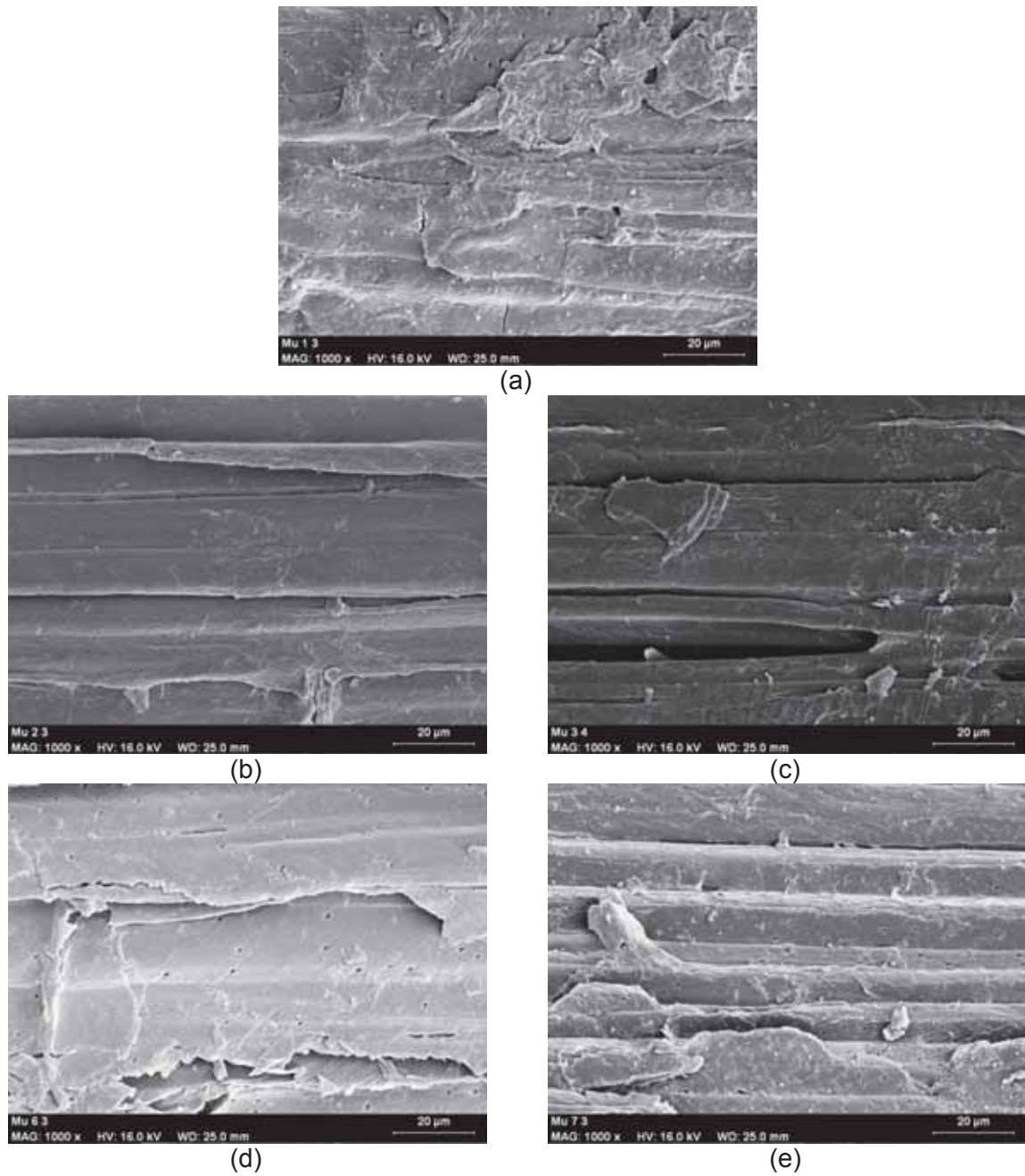
**Figura 7:** Micrografias eletrônicas, com aumento de 50X, (a) bagaço *in natura*, (b) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h sem lavar, (c) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h lavado, (d) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h sem lavar e (e) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h lavado.

## ANEXO 2



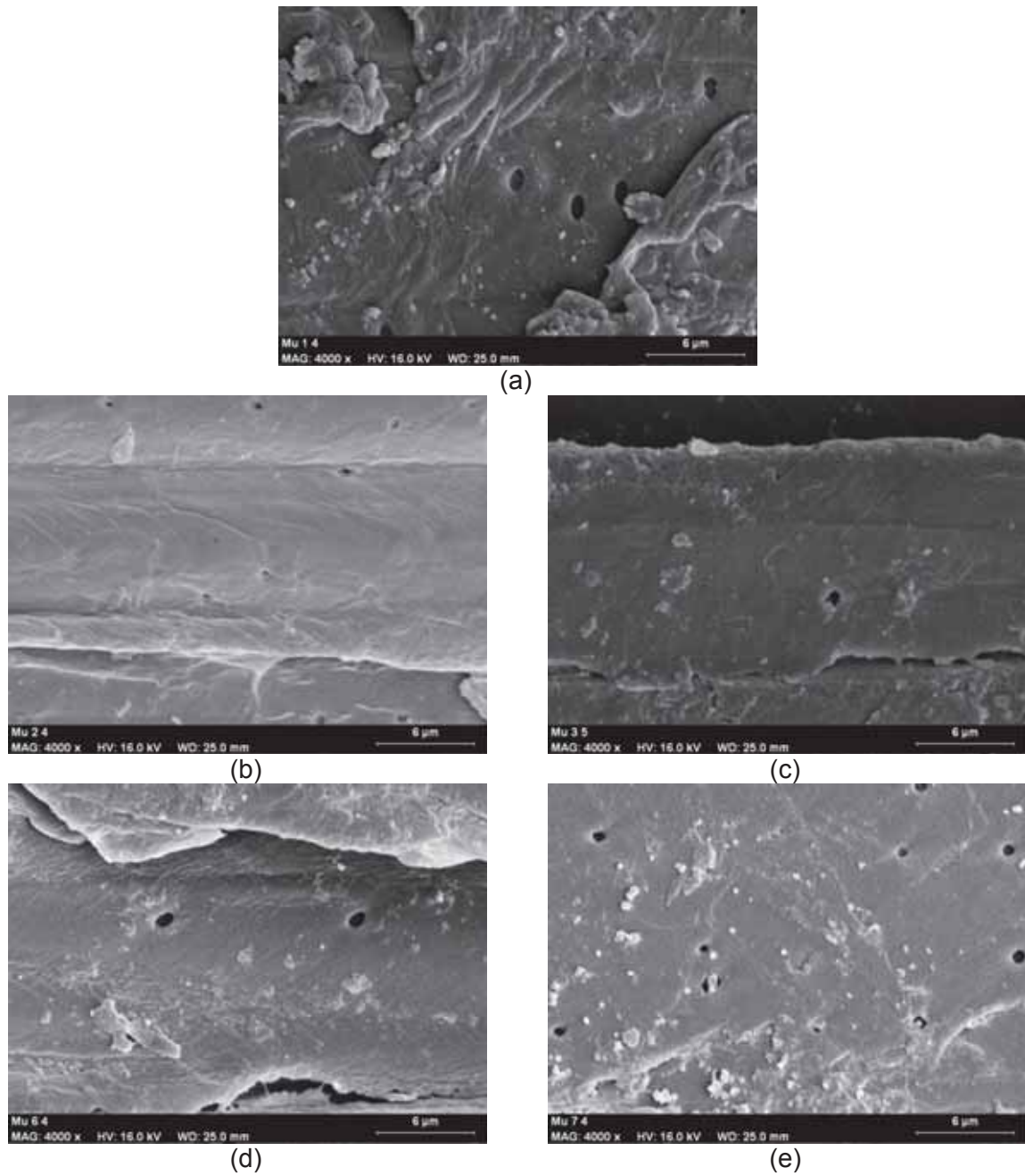
**Figura 8:** Micrografias eletrônicas, com aumento de 500X, (a) bagaço *in natura*, (b) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h sem lavar, (c) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h lavado, (d) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h sem lavar e (e) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h lavado.

## ANEXO 3



**Figura 9:** Micrografias eletrônicas, com aumento de 1000X, (a) bagaço *in natura*, (b) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h sem lavar, (c) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h lavado, (d) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h sem lavar e (e) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h lavado.

## ANEXO 4



**Figura 10:** Micrografias eletrônicas, com aumento de 4000X, (a) bagaço *in natura*, (b) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h sem lavar, (c) bagaço pré-tratado com 40 % de umidade e 3,44 gO<sub>3</sub>/h lavado, (d) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h sem lavar e (e) bagaço pré-tratado com 80 % de umidade e 3,85 gO<sub>3</sub>/h lavado.