

Ticiane da Silva Magalhães

Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção  
de etanol celulósico por hidrólise enzimática.

São José do Rio Preto  
2011

Ticiane da Silva Magalhães

Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, 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. Mauricio Boscolo

São José do Rio Preto  
2011

Magalhães, Ticiane da Silva.

Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática / Ticiane da Silva Magalhães. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2011.

63 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Mauricio Boscolo

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

1. Biotecnologia. 2. Biocombustíveis. 3. Resíduos como combustível. 4. Bagaço de cana – Hidrólise enzimática. 5. Etanol. I. Boscolo, Mauricio. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 62-665.9

Ticiane da Silva Magalhães

Estudo de pré-tratamentos de bagaço de cana para produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração – Química Ambiental, 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. Mauricio Boscolo  
UNESP – São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha  
CTBE – USP

Bolsista: Fapesp (Processo N°2009/12443-9)

São José do Rio Preto  
21/outubro/2011

Dedico esta dissertação a Deus por permitir a minha eterna busca por conhecimento, a meus pais por terem me escolhido e me amado tanto e ao Marco Aurélio pela compreensão, paciência e amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades que Ele tem colocado em minha vida. Tenho muito a agradecer a meus pais, Otacílio e Adelaide, que mesmo à distância nunca estiveram longe e nunca deixaram de me apoiar e se orgulhar. Aos meus irmãos pelo orgulho, apoio e amor. Ao Marco Aurélio, que em todos os momentos colaborou para o desenvolvimento do meu projeto, sempre com seu carinho, dedicação e amor.

Agradeço a meus amigos de laboratório, Janaina, Thiago, Ana Lúcia, Pedro, Marcos e a todos os outros pela convivência diária. A Amanda, Melina, Viviane e Felipe um agradecimento especial por terem me ajudado a realizar este trabalho, mesmo quando foi necessário noites em claro.

Aos professores Roberto da Silva, Eleni Gomes e João Claudio Thoméo e a todos do laboratório de microbiologia pela colaboração. Ao professor Mauricio Boscolo por ter aceitado ser meu orientador e pelas oportunidades de crescimento.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de mestrado.

“Os homens fazem sua própria história.”

Karl Marx

## RESUMO

Utilizando o bagaço de cana como matéria prima para a produção do etanol brasileiro pode-se aumentar a produção em 50% deste combustível sem o aumento de área cultivada com a cana de açúcar. A hidrólise química deste material demonstrou ser ineficiente à medida que gera um grande número de substâncias inibidoras do processo fermentativo alcoólico, como aldeídos furânicos e fenóis. A hidrólise enzimática vem se destacando como a forma mais viável de sacarificação do bagaço, em função de não gerar tais inibidores, mas a recalcitrância da fibra vegetal impede tal processo. A ação das enzimas hidrolíticas é muito dificultada pela forma como se encontra naturalmente a fibra vegetal: regiões de alta cristalinidade e a presença de lignina revestindo as fibras. O preparo do bagaço para a ação enzimática, normalmente denominado de pré-tratamento, utiliza condições extremas de temperatura e pressão que podem formar produtos tóxicos para a fermentação alcoólica e apresentam sérios riscos operacionais. O objetivo deste trabalho é avaliar o grau de desestruturação do bagaço após pré-tratamentos em soluções ácidas e alcalinas em glicerol e irradiadas com micro-ondas (MO) em dois modos: estático e rotativo. A melhor condição para a ação hidrolítica do complexo enzimático empregado foi obtida em meio não tamponado (água destilada) durante 24 horas. As maiores liberações de açúcares redutores totais (ART) após a hidrólise enzimática foram alcançadas quando o bagaço foi pré-tratado com irradiação de MO por dois minutos em modo rotativo em meio ácido (0,07 mol/L  $H_2SO_4$ ) em 100% glicerol ( $617 \pm 24$  mg de ART/g de bagaço) e em meio alcalino (0,05 mol/L NaOH) em 100% glicerol ( $601 \pm 58$  mg de ART/g de bagaço). Por meio da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) pode-se avaliar o grau de desestruturação do bagaço comparando a variação de entalpia, que pode ser associada ao rompimento de ligações nos bagaços pré-tratados. Entre os bagaços pré-tratados, observa-se que o tratado com NaOH 0,05 mol/L com 5% de água em glicerol apresentou a menor  $\Delta H$ , sugerindo a maior desestruturação do carboidrato após o pré-tratamento.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratamento, glicerol, micro-ondas, hidrólise enzimática, etanol celulósico.



## ABSTRACT

*The production of the Brazilian bioethanol can be increased in 50% without expanding the area cultivated with sugarcane by using sugarcane bagasse as raw material. Its recalcitrance is an obstacle to enzymatic hydrolysis, which can be overcome by physical-chemical treatments. Common pre-treatments using extreme conditions of temperature and pressure are dangerous, promote the generation of toxic compounds (phenols and aldehydes) besides being potentially inhibitory for yeast. The aim of this work is to assess the degree of disruption of the bagasse after pre-treatment in acidic and alkaline glycerol, irradiated with microwaves both in the static and rotational modes. The enzyme complex showed the best results with the reactions promoted in a non-buffered (distilled water) at 24 hours. The best results for the pre-treatment were found after inserting a rotation system in the microwave oven inasmuch as the samples were subjected to irradiation in a more homogeneous way. The best pre-treatment was obtained after enzymatic hydrolysis in sulfuric acid (0.07 mol/L), in pure glycerol, with the rotation of the balloon inside the microwave oven ( $617 \pm 24$  mg of ART/g bagasse). In alkaline medium, the best result was found in the absence of water in the reaction medium (0.05 mol/L NaOH) with the rotation of the balloon inside the microwave oven ( $601 \pm 58$  mg of ART/g of bagasse). Differential Scanning Calorimetry (DSC) allows to evaluate the degree of disruption of bagasse comparing the enthalpy change, which can be associated with disruption of bounds in pre-treated bagasse. Among the pre-treated bagasse, it is observed that the bagasse treated with NaOH 0.05 mol/L and 5% of water in glycerol had the lowest  $\Delta H$ , suggesting greater breakdown of carbohydrates after pre-treatment.*

*Keywords: sugarcane bagasse, pretreatment, microwave, enzymatic hydrolysis, cellulosic ethanol.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem de MEV se refere a uma fibra de Eucalipto (SILVA, R., 2009)	4
Figura 2	Estrutura de uma cadeia de celulose (SANTOS, C. P. et al., 2001)	5
Figura 3	Precursores primários das ligninas: álcool p-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinálico (III) (PILÓ-VELOSO, NASCIMENTO, MORAIS, 1993)	8
Figura 4	Estrutura proposta para lignina de madeira do <i>Eucalipytus grandis</i> (PILÓ-VELOSO, NASCIMENTO, MORAIS, 1993)	9
Figura 5	Esquema ilustrando o rompimento do complexo lignocelulósico através do pré-tratamento. (KUMAR et al., 2009)	12
Figura 6	Sistema experimental para irradiação do bagaço com micro-ondas sob pressão atmosférica, adaptado estritamente de acordo com SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006.	21
Figura 7	Forno de micro-ondas adaptado de acordo com SILVA; FERREIRA; SOUZA , 2006.	24
Figura 8	Adaptação do micro-ondas doméstico com inserção de um sistema rotativo.	25
Figura 9	Açúcares redutores totais nos tempos de 1 e 2 minutos de pré-tratamentos de M.O.	35
Figura 10	Compostos fenólicos totais nos tempos de 1 e 2 minutos de pré-tratamentos de M.O.	35
Figura 11	Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas (sem rotação do balão) em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 100% glicerol.	36

Figura 12	Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas sem rotação, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M, glicerol e diferentes % de água como solução.	39
Figura 13	Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas sem rotação, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,01M, glicerol e diferentes % de água como solução.	39
Figura 14	Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas sem rotação, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.	40
Figura 15	Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas sem rotação, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.	40
Figura 16	Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas com rotação, NaOH 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.	45
Figura 17	Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas com rotação, NaOH 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.	45
Figura 18	Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas com rotação, glicerol e diferentes % de água como solução.	47
Figura 19	Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas com rotação, glicerol e diferentes % de água como solução.	47

Figura 20	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 100% glicerol após hidrólise enzimática, com o balão em modo estático no forno de micro-ondas	49
Figura 21	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 100% glicerol após hidrólise enzimática, com o balão em modo rotativo no forno de micro-ondas.	49
Figura 22	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,01 mol/L de $H_2SO_4$ em 100% glicerol após hidrólise enzimática, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.	50
Figura 23	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05 mol/L de $H_2SO_4$ em 100% glicerol após hidrólise enzimática, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.	50
Figura 24	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05mol/L de NaOH com 0% em água em glicerol, com rotação do balão no forno de micro-ondas.	51
Figura 25	Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05mol/L de NaOH com 5% de água em glicerol, com rotação do balão no forno de micro-ondas.	51
Figura 26	Termograma do bagaço não tratado.	53
Figura 27	Termograma do bagaço pré-tratado com 100% glicerol, com o balão em rotação no forno de micro-ondas.	53
Figura 28	Termograma do bagaço pré-tratado com NaOH 0,05M com 5% de água em glicerol, com o balão em rotação no forno de micro-ondas.	53
Figura 29	Termograma do bagaço pré-tratado com 0,05M de $H_2SO_4$ em 100% glicerol, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.	53
Figura 30	Termograma do bagaço pré-tratado com 0,01M de $H_2SO_4$ em 100% glicerol, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.	54

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1	Perfil das atividades enzimática do complexo Powercell® utilizado para hidrólise enzimática.	32
Tabela 2	Determinação do tempo ideal para hidrólise enzimática do bagaço in natura em diferentes meios reacionais.	33
Tabela 3	Influência dos solventes empregados nos pré-tratamentos de bagaço sobre a liberação de compostos fenólicos e ART.	34
Tabela 4	Açúcares redutores totais liberados após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com micro-ondas em diferentes concentrações de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> em 100% de glicerol*.	37
Tabela 5	Impacto do pré-tratamento com NaOH e irradiado por MO (modo estático) e hidrólise enzimática na liberação de compostos fenólicos totais e ART.	41
Tabela 6	Comparação entre pré-tratamentos com soluções de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , glicerol e água irradiados por micro-ondas nos modos estático e rotativo.	43
Tabela 7	Comparação entre pré-tratamentos com glicerol e água (0, 5 e 10%) e irradiados por micro-ondas nos modos estático e rotativo.	46
Tabela 8	Tempo de retenção dos padrões de carboidratos nos hidrolisados.	48
Tabela 9	Açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática de bagaço (µg/mL).	51
Tabela 10	Valores encontrados após a análise de DSC para bagaços pré-tratados.	52

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ART	<i>Açúcares redutores totais</i>
CFT	<i>Compostos fenólicos totais</i>
CMC	<i>Carboximetilcelulase</i>
DSC	<i>Calorimetria Exploratória Diferencial</i>
MO	<i>Micro-ondas</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>3</b>
2.1	Biomassa	3
2.2	Celulose	5
2.3	Hemicelulose	6
2.4	Lignina	7
2.5	Hidrólise Enzimática	10
2.6	Pré-tratamentos	11
<b>3</b>	<b>Diferentes tipos de pré-tratamentos</b>	<b>13</b>
3.1	Biológico	13
3.2	Processo de Moagem	13
3.3	Pirólise	13
3.4	Explosão a vapor	14
3.5	Químico	15
3.6	Oxidação úmida	15
3.7	Pré-tratamentos em meios ácidos e alcalinos	16
3.8	Organosolv	17
3.9	Micro-ondas	19
<b>4</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>22</b>
4.1	Objetivos específicos	22
<b>5</b>	<b>Materiais e métodos</b>	<b>23</b>
5.1	Materiais	23
5.2	Preparo e determinação granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar	23
5.3	Adaptação do forno de micro-ondas	24
5.4	Pré-tratamentos	25
5.5	Caracterização química	26
5.5.1	Determinação de compostos fenólicos totais - CFT	26
5.5.2	Açúcares redutores totais - ART	27

5.5.3	Análise cromatográfica da fração líquida do hidrolisado	27
5.5.4	Análise do bagaço pré-tratado por de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	28
5.6	Determinação das atividades enzimáticas	28
5.6.1	CMCase	28
5.6.2	Xilanase e Avicelase	29
5.6.3	$\beta$ - glicosidase e $\beta$ - xilosidase	29
5.7	Hidrólise Enzimática	29
5.7.1	Determinação da metodologia para hidrólise enzimática	29
5.7.2	Hidrólise das amostras	30
<b>6</b>	<b>Resultados e discussão dos resultados</b>	<b>31</b>
6.1	Preparo e determinação granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar	31
6.2	Determinação das atividades enzimáticas e adaptação da metodologia para hidrólise enzimática.	31
6.3	Pré-tratamentos	33
6.3.1	Utilização do glicerol associado à irradiação de MO como pré-tratamento do bagaço.	33
6.3.2	Influência do tempo de irradiação de micro-ondas no pré-tratamento do bagaço em soluções de ácido sulfúrico em glicerol.	34
6.3.3	Influência da variação na concentração de $H_2SO_4$ no pré-tratamento do bagaço.	35
6.3.4	Influência da água nas soluções de glicerol com $H_2SO_4$ no pré-tratamento do bagaço.	38
6.3.5	Avaliação dos pré-tratamentos do bagaço de cana em glicerol/água em meio alcalino.	40
6.3.6	Adaptação do forno de micro-ondas para irradiação em modo rotativo.	43
6.3.7	Pré-tratamento do bagaço utilizando água e glicerol associados à irradiação de micro-ondas em modo rotativo.	46



6.3.8	Determinação de açúcares por cromatografia líquida com detecção por amperometria pulsada.	47
6.3.9	Caracterização térmica do bagaço por DSC	52
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A economia energética mundial enfrenta atualmente uma dependência dos combustíveis fósseis como o carvão, gás e petróleo. Entretanto, o limitado número de reservas e a instabilidade dos preços causam crises econômicas e desenvolvem uma crescente busca por combustíveis alternativos. Além disso, existe uma crescente preocupação com os problemas ocasionados pela combustão dos combustíveis fósseis no meio ambiente. Na busca por independência energética, inovações tecnológicas e preservação do meio ambiente vem crescendo a utilização de matérias primas lignocelulósicas para o desenvolvimento de combustíveis alternativos, os biocombustíveis.

No cenário mundial, o Brasil se destaca como um grande produtor de cana de açúcar e com esta situação houve um aumento na área de cana plantada e uma redução nas áreas disponíveis para a produção de alimentos. Atualmente, apenas um terço da biomassa contida na cana é aproveitada para a produção de etanol e açúcar, o restante pode ser utilizado para a produção de energia elétrica através da combustão.

No entanto, o potencial energético desta biomassa está muito além da queima podendo ser aproveitada para a produção do etanol combustível. O uso destes resíduos como matéria-prima para produção de etanol celulósico, além de gerar o etanol celulósico, minimizaria a expansão dos canaviais sobre as culturas alimentícias e reduziria os resíduos existentes nas usinas.

A produção de etanol celulósico pode aumentar em 50% sem aumentar a área de cana plantada, no caso do desenvolvimento para hidrólise dos polissacarídeos presentes no bagaço for bem sucedido.

Assim, entre as tecnologias estudadas no país para a área energética, destaca-se a busca pela produção de etanol a partir da celulose existente no bagaço da cana-de-açúcar, o etanol de segunda geração ou etanol celulósico. O desenvolvimento desta tecnologia proporcionará ao país muitas vantagens como: diminuição da dependência energética, redução na emissão de gases poluentes na atmosfera, aproveitamento de resíduos industriais e o desenvolvimento econômico.

No desenvolvimento de novas tecnologias preza-se por processos mais limpos e eficientes, além do aproveitamento de resíduos e preservação do meio

ambiente. Com estes fins, as reações livres de solventes e as aceleradas sob radiação de micro-ondas (MO) mostram-se promissoras.

A hidrólise da biomassa vegetal para a produção do etanol celulósico pode ocorrer por meio de processos químicos com ácidos diluídos em condições extremas de temperatura e pressão, que produzem muitos produtos tóxicos inibidores do processo de fermentação alcoólica. Para prosseguir na geração de etanol celulósico, seria necessária a retirada destes inibidores, além dos equipamentos resistentes a corrosão, o que elevaria o custo e inviabilizaria a produção do etanol celulósico em grande escala.

O processo de hidrólise enzimática não produz muitos compostos tóxicos para as leveduras e apresenta menores riscos operacionais. Um dos principais obstáculos para a viabilização da hidrólise enzimática é a recalcitrância das biomassas lignocelulósicas, tal como o bagaço da cana, visto que esta biomassa lignocelulósica apresenta uma estrutura rígida com áreas densamente cristalinas que dificultam o acesso das enzimas. Para vencer este obstáculo, a produção de etanol celulósico deve seguir as seguintes etapas: pré-tratamento da biomassa, hidrólise e fermentação.

Com o uso de técnicas analíticas, pode-se determinar a composição química durante as etapas de produção do etanol celulósico, possibilitando respostas rápidas e inequívocas. Esta determinação antecipada dos componentes químicos pode proporcionar alternativas para otimizar as etapas e contornar as dificuldades encontradas no processo de produção de etanol celulósico.

A correlação das composições químicas (volátil e não volátil) com o rendimento da fermentação alcoólica ajudaria no entendimento e domínio dos parâmetros determinantes para um aumento do rendimento da produção do etanol celulósico. No entanto, existe ainda uma escassez de estudos sobre a caracterização química do pré-hidrolisado e do hidrolisado, deixando ainda espaço para o desenvolvimento de muitas tecnologias para tornar a hidrólise do bagaço comercialmente viável.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Biomassa

O Brasil, assim como outros países tropicais, utiliza a cana de açúcar como matéria prima básica para a produção de etanol. Contudo, os resíduos agroindustriais (bagaço e palha) atualmente são aproveitados somente em geração de eletricidade pela usina e ainda há um excedente não aproveitado que se acumula na planta industrial ocasionando ocupação de espaço e risco de incêndio (MARTÍN et al., 2002; SANTOS; SOUTO-MAIOR; GOUVEIA; ROCHA, 2010; CARRILO et al., 2005; OJEDA et al., 2011).

Assim, outro destino possível para estes resíduos é a produção de etanol celulósico, pois o bagaço apresenta alta concentração de carboidratos que podem ser hidrolisados a açúcares fermentescíveis e disponíveis dentro da planta industrial, o que reduz custos de transporte (GOUVEIA; NASCIMENTO; SOUTO-MAIOR; ROCHA, 2009; PANDEY et al. , 2000; SANTOS; GOUVEIA, 2009).

O termo lignocelulósico é utilizado para descrever a estrutura básica dos vegetais compostos de celulose, hemicelulose e lignina. O bagaço de cana-de-açúcar, um complexo lignocelulósico, contém uma composição variada que dependerá da variedade, das condições de crescimento, da parte da planta e da idade de colheita (BADHAN et al., 2007).

A estrutura do bagaço é formada por cadeias de celulose (unidas por ligações de hidrogênio) e cobertas por hemicelulose e lignina, que foi desenvolvida ao longo da evolução para proteger a planta de ataques externos (Figura 01) ( PANDEY et al. , 2000)

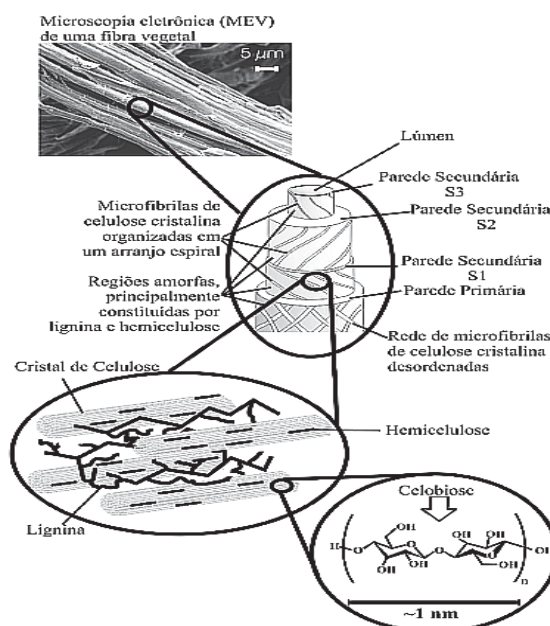


Figura 1: Estrutura de uma fibra vegetal. A imagem de MEV se refere a uma fibra de Eucalipto (SILVA, R., 2009)

A estrutura cristalina da celulose associada a barreira de proteção formada pela lignina dificultam a liberação dos açúcares fermentescíveis por enzimas hidrolíticas, tornando necessária para este processo etapas de preparação do bagaço para o desenvolvimento da hidrólise enzimática.

Com o pré-tratamento mecânico ou químico do bagaço, pode-se destruir a estrutura celular para reduzir a cristalinidade da celulose e promover a quebra da lignina para a posterior hidrólise enzimática (OJEDA et al., 2011). Contudo, a degradação da lignina pelo pré-tratamento pode formar subprodutos como fenóis e polifenóis, derivados furânicos e ácidos orgânicos fracos, que são inibidores da fermentação alcoólica.

Estes compostos devem ser quantificados para verificar o impacto dos diferentes tipos de pré-tratamentos na produção de etanol celulósico (MARTÍN et al., 2002) e a lignina liberada após o pré-tratamento pode ser retirada do meio e usada para a fabricação de espumas, resinas fenólicas, epóxidas, ou transformadas em fibras de carbono, possibilitando agregação de valor.

Os polissacarídeos após os pré-tratamentos podem ser hidrolisados a

açúcares fermentescíveis por hidrólise química ou enzimática. Entre os açúcares liberados estão a celobiose e glicose, gerados a partir da celulose, bem como a xilose a partir da hemicelulose (OGEDA; PETRI, 2010).

## 2.2 Celulose

A celulose é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza e é a base estrutural das plantas, podendo variar a porcentagem em que está presente de acordo com a espécie e origem. Sua cadeia polimérica é linear (Figura 2) e formada por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades D-glicopirranose, o que resulta num polímero de alto peso molecular com grau de polimerização variando de 5.000 a 7.500.

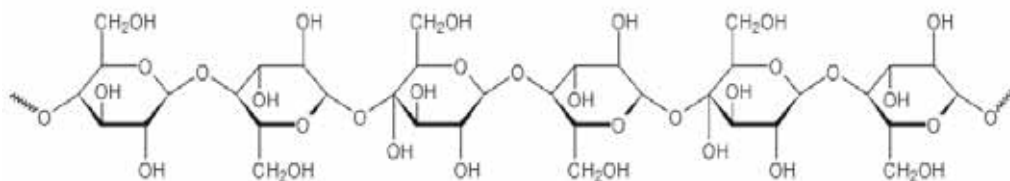


Figura 2: Estrutura de uma cadeia de celulose (SANTOS, C. P. et al., 2001).

As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina e a amorfa. A primeira, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, que resulta em uma forte interação entre as cadeias. A segunda, região amorfa, é menos ordenada e mais susceptível à hidrólise. Quanto maior a proporção da forma cristalina, maior a resistência à ação lítica atuantes sobre estes polissacarídeos (GÓMEZ, 1985; REYES; PERALTA-ZAMORA; DURÁN, 1997).

Várias formas cristalinas de celulose são encontradas e todas apresentam características físicas e químicas próprias. Em condições normais, a celulose é insolúvel em água, o que se faz necessário devido sua função de sustentação estrutural nas paredes celulares vegetais (OGEDA; PETRI, 2010).

A sacarificação enzimática da celulose cristalina por enzimas de fungos e

bactérias requer a ação de enzimas altamente específicas (GÓMEZ, 1985; RIEDEL; RITTER; BRONNENMEIER, 1997; CARVALHO et al., 2005 a,b), cujo produto final é, principalmente, a glicose. Existem três grupos principais de celulases:

- as endoglucanases ou endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, que quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose criando novos terminais e atacam ao acaso regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose no interior da molécula e suas atividades são determinadas usando carboximetil celulose (CMCase) como substrato;
- as exoglucanases (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases) ou celobio-hidrolases, que degradam a molécula resultante da ação da endoglucanase pela remoção de unidades de celobiose nos terminais atuando na parte cristalina da fibra e suas atividades são freqüentemente referidas como avicelase (avicel = celulose microcristalina com DP ~200) ou atividade papel de filtro, PFase (papel de filtro acima de 95 de cristalinidade). Esta última representa um sistema de celulases formado por avicelase I, que se caracteriza por ser uma enzima celulolítica rara que combina as atividades de exoglucanase e endoglucanase, e por uma avicelase II que representa um tipo de exoglucanase;
- as 1,4- $\beta$ -D-glicosidases, que hidrolisam a celobiose liberando glicose.

### 2.3 Hemicelulose

A hemicelulose está associada à celulose e à lignina nos tecidos vegetais (Figura 1) e é um heteropolissacarídeo formado por pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) e ácidos urônicos (4-O-ácido metilglucurônico e ácido galacturônico), tendo a xilose como principal constituinte fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (polímero de xilose) e xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose) (RAMOS, 2003).

Outros polímeros como glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e D-arabinose) são encontrados na hemicelulose.

Diferentes hemiceluloses são classificadas de acordo com o resíduo de açúcar principal no esqueleto da cadeia e várias subclasses com diferentes composições químicas podem ser encontradas dependendo da espécie da planta, do estágio de desenvolvimento e dos tipos de tecidos (OGEDA; PETRI, 2010).

As interações entre a hemicelulose e a celulose são geralmente mais fortes do que as interações entre a hemicelulose e a lignina, e a composição e ligação das cadeias secundárias determinam as suas propriedades físicas e químicas. Ao remover as cadeias secundárias eleva-se a taxa de degradação através das enzimas endoxilanases, pois os grupos laterais de xilanas podem ter um papel importante na ligação de ligninas com hemiceluloses.

A hidrólise da hemicelulose é realizada pelas enzimas do complexo xilanolítico, com destaque para as endoxilanases, que hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da molécula de xilana (principal polissacarídeo da fração de hemicelulose), resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato. Outras enzimas do complexo xilanolítico são a exo-1,4- $\beta$ -xilosidase,  $\beta$ -L-Arabinosidases e as acetil-esterases (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

## **2.4. Lignina**

A lignina é uma macromolécula fenólica complexa, amorfa e formada pela polimerização de radicais livres de unidades fenilpropânicas. Sua estrutura química baseia-se em três precursores monoméricos: álcool coniferil, álcool sinapil, álcool *p*-coumaril (Figura 3) (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).

A composição e estrutura deste material pode variar de acordo com a localização no vegetal e a espécie em estudo (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993; OGEDA; PETRI, 2010).



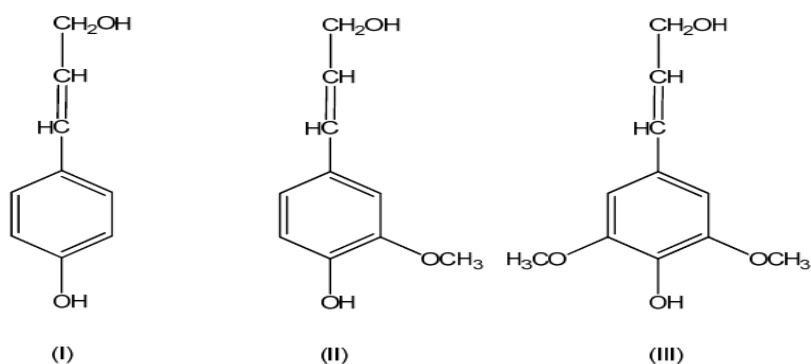


Figura 3: Precursores primários das ligninas: álcool *p*-cumarílico (I), álcool coniferílico (II) e álcool sinapílico (III). (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993)

Sabe-se que este material é o segundo mais abundante do reino vegetal, logo depois da celulose, só não estando presente em vegetais primitivos e líquens não lignificados. Suas principais funções nos vegetais são a proteção contra ação dos microorganismos, resistência mecânica, transporte de nutrientes, água e metabólitos (PILÓ-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).

A propriedade física mais importante desta macromolécula orgânica é sua rigidez, que não somente concede resistência aos tecidos das plantas, como também previne contra o colapso dos elementos condutores de água que são altamente resistentes à degradação (RAMOS, 2003).

A presença de diferentes unidades precursoras e o elevado número de combinações possíveis entre as unidades precursoras, faz com que a estrutura da macromolécula de lignina seja bem mais complexa que a apresentada pela celulose e pela hemicelulose (Figura 4) (RAMOS, 2003).

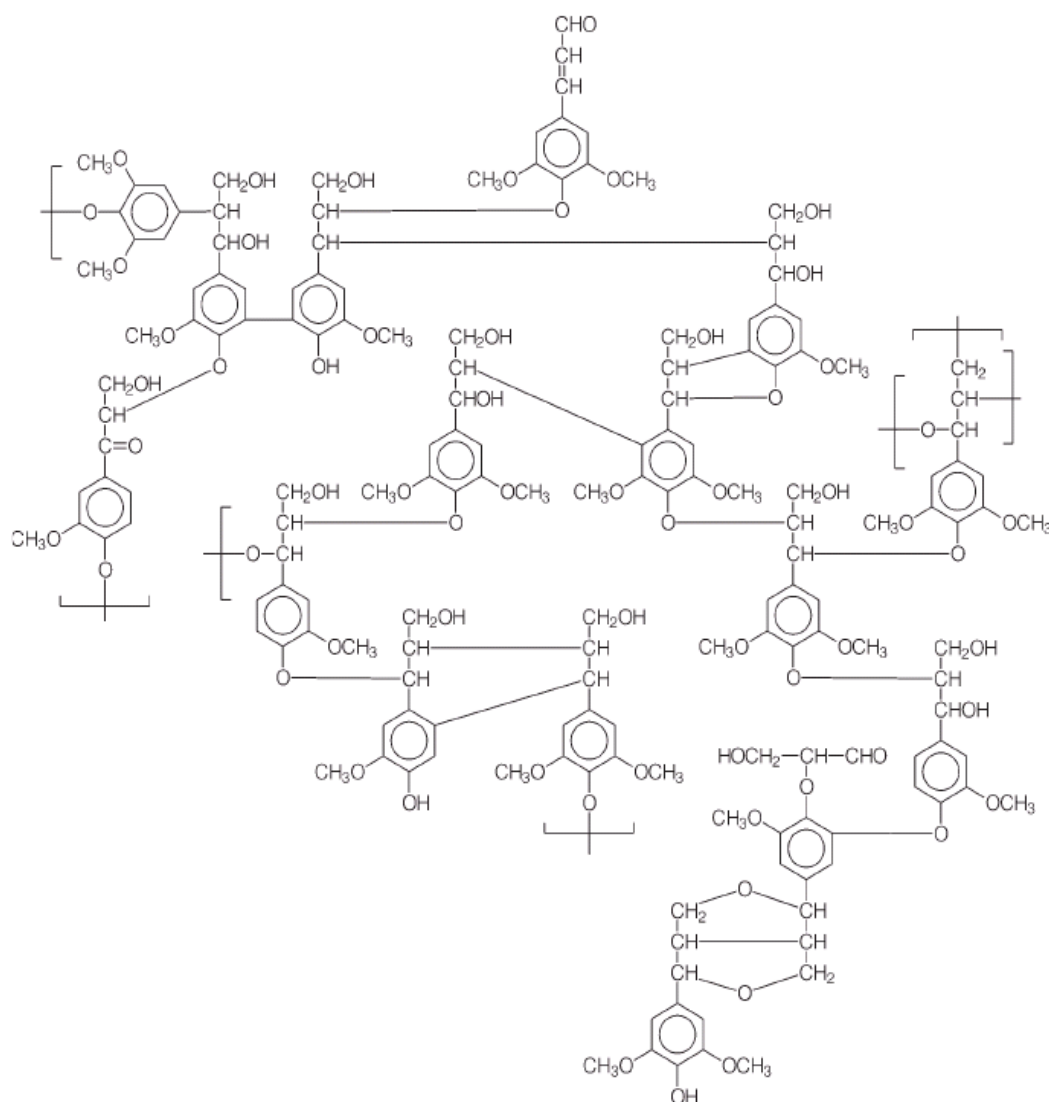


Figura 4: Estrutura proposta para lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis* (PILO-VELOSO; NASCIMENTO; MORAIS, 1993).

Novas aplicações para a lignina, removida pela indústria papeleira, vem sendo estudadas devido às suas propriedades dispersantes e adesivas, algumas das possibilidades são: dispersante para pigmentos, produtos cerâmicos, pesticidas, emulsificante de óleos e látex, aditivo em concreto e cimento, fabricação de espumas de poliuretanas, resinas fenólicas e epóxicas, fonte de fenol e etileno, e em fibras de carbono (OGEDA; PETRI, 2010).

Por conta da natureza e do tamanho da molécula de lignina, as enzimas que a degradam são inespecíficas e catalisam reações de oxirredução em diversos pontos da molécula. As principais são as lignina-peroxidases, que catalisam reações

na presença de peróxido de hidrogênio (DURAN; ESPOSITO, 2000); as manganês-peroxidases, que catalisam a oxidação de fenóis monoaromáticos e outros derivados aromáticos que dependem de peróxido de hidrogênio e de manganês divalente (KARAM; NICELL, 1997) e as fenol-oxidases, como a lacase, que catalisam as reações de oxidação dos componentes fenólicos ou não fenólicos quando em presença de um mediador (DURAN; ESPOSITO, 2000).

## **2.5 Hidrólise Enzimática**

A hidrólise enzimática do material lignocelulósico vem sendo constantemente comparada à hidrólise química (SUN; CHENG, 2002). Na hidrólise enzimática utiliza-se condições amenas (pH 5,0 e temperatura 45-50°C, aproximadamente), além de não existir o problema de corrosão dos equipamentos industriais.

Atualmente o custo das enzimas ainda pode ser um fator limitante de sua utilização no processo de obtenção do etanol celulósico, pois em média são gastos US\$ 5.40 por galão de etanol produzido (ZHANG; MICHAEL; JONATHAN, 2006). Estima-se que os custos de produção das enzimas ao utilizar resíduos de baixo custo, como a própria biomassa lignocelulósica, poderão ser reduzidos (ADSUL et al., 2005; SUN; CHENG, 2002).

Muitos fatores podem interferir na hidrólise enzimática da celulose, como: tipo do substrato, atividade da celulase e as condições de reação. Assim, visando aperfeiçoar este processo e aumentar a taxa de rendimento no processo de sacarificação, busca-se o desenvolvimento e aperfeiçoamento de enzimas celulolíticas bem como as suas condições ótimas de ação hidrolítica.

Neste contexto, tem sido sugerida para a hidrólise dos materiais lignocelulósicos a utilização de uma mistura contendo celulases de diferentes microrganismos, ou uma mistura de celulases com diferentes enzimas como xilanases, ligninases e pectinases, na hidrólise dos materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2002).

A baixa acessibilidade das enzimas à estrutura intacta da fibra do bagaço é uma barreira a ser vencida quando se busca a otimização do processo (SUN; CHENG, 2002). Em função disso, tem sido proposto o tratamento desses materiais de modo a promover uma “digestão parcial prévia”, através da quebra das ligações

entre celulose, hemicelulose e lignina, tornando o substrato lignocelulósico mais acessível às celulases (EL-NASSER; HELMY; EL-GAMMAL, 1997).

A hidrólise enzimática da celulose envolve ação sinérgica e simultânea das enzimas, ou seja, as endoglucanases hidrolisam as ligações  $\beta$ -(1-4) acessíveis no interior da molécula e geram novas terminações de cadeia, a partir das quais as exoglucanases atacam os terminais redutores da cadeia de celulose e liberam celobiose ou glicose. As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose em glicose e com isso impedem a inibição da ação das exoglucanases. As ações combinadas das endo- e exoglucanases modificam a superfície da fibra de celulose acelerando a velocidade de hidrólise e facilitam o acesso das enzimas aos seus substratos (OGEDA; PETRI, 2010; SANTOS; GOUVEIA, 2009).

A sacarificação enzimática do material lignocelulósico pode ainda ser associada a pré-tratamentos físicos como explosão de vapor (MARTÍN et al., 2006) ou com diferentes formas de energias de alta frequência como micro-ondas, ultrassom, radiação ionizante para se conseguir uma desestruturação do complexo celulose/lignina/hemicelulose da parede celular vegetal e, com isso, facilitar o acesso das enzimas às fibras.

Geralmente, utiliza-se uma hidrólise ácida com ácido sulfúrico quando se quer caracterizar quimicamente materiais lignocelulósicos, pois ocorre uma despolimerização dos polissacarídeos formando oligômeros e seus açúcares constituintes (GOUVEIA; NASCIMENTO; SOUTO-MAIOR; ROCHA, 2009).

## **2.6. Pré-tratamentos**

A produção do etanol celulósico inicia-se pelo pré-tratamento das fibras vegetais por processo físico, químico, biológico ou a combinação destes, seguidos pelo processo de sacarificação enzimática.

Os benefícios do pré-tratamentos em diferentes biomassas submetidas a diferentes tipos de pré-tratamentos são conhecidos e relatados na literatura (SUN; CHENG, 2002; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A finalidade deste procedimento é destruir a estrutura celular da planta pelo rompimento do complexo celulose-hemicelulose-lignina e remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade da fibra (Figura 5).

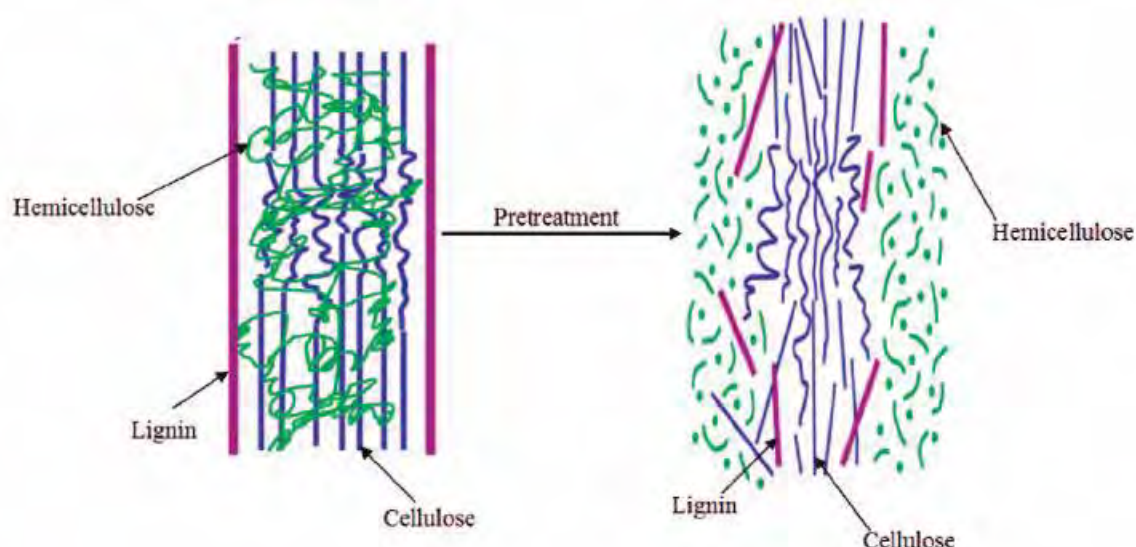


Figura 5: Esquema ilustrando o rompimento do complexo lignocelulósico através do pré-tratamento (KUMAR et al., 2009)

O pré-tratamento aplicado deve evitar a degradação de carboidratos e a formação de compostos inibidores do processo de hidrólise e fermentação alcoólica (ROSA; GARCIA, 2009; SUN; CHENG, 2002; KUMAR et al., 2009). Os inibidores podem ser classificados em três categorias: derivados furânicos (furfural e 5-hidroximetilfurfural), ácidos orgânicos fracos (como ácido acético e outros) e derivados fenólicos.

Os tipos de compostos tóxicos e suas concentrações irão depender tanto da matéria-prima quanto das condições operacionais empregadas no pré-tratamento (SANTOS e GOUVEIA, 2009; OGEDA; PETRI, 2010).

Segundo Carvalho e outros (2005 a), a retirada dos compostos fenólicos do hidrolisado hemicelulósico empregando um sistema combinado composto por carvão ativo e resinas de troca iônica resulta no favorecimento da fermentabilidade do hidrolisado e aumento no rendimento de D-xilose em xilitol usando *C. Guilliermondii*. No entanto, este procedimento proporciona perdas parciais de D-xilose reduzindo o rendimento final.

A busca por um pré-tratamento ideal tem como objetivo principal reduzir a recalcitrância do material lignocelulósico com a mínima formação de inibidores que possam comprometer os processos de hidrólise e fermentação alcoólica.

### **3. DIFERENTES TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTOS**

#### **3.1. BIOLÓGICO**

No pré-tratamento biológico, utiliza-se diferentes tipos de micro-organismos degradadores da lignina, de forma que ocorre o mínimo de perda de polissacarídeos e muitas cepas fúngicas são estudadas buscando uma que consiga esta finalidade.

Muitos estudos atraem interesse no uso de fungos como pré-tratamento, sacarificação e fermentação simultânea (ITOH et al., 2003; KUMAR et al, 2009). Contudo, os pré-tratamentos biológicos por si só resultam em rendimentos não muito expressivos e por isto são freqüentemente associados a outros tipos de pré-tratamentos físicos ou químicos (KUMAR et al, 2009).

#### **3.2. PROCESSO DE MOAGEM**

As operações físicas de pré-tratamento são baseadas na redução do tamanho da partícula aumentando a área superficial do ataque da enzima. Em alguns casos, pode ocorrer ainda a redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose.

No processo de quebra, as partículas são reduzidas a 10-30 mm, enquanto no processo de tritura e moagem 0,2-2 mm. No entanto, essa redução no tamanho das partículas requer um emprego energético que irá depender do tamanho final requerido e do tipo de biomassa a ser particulada. Sabe-se que a moagem vibratória com bolas apresenta melhores resultados na quebra da celulose cristalina, quando comparada a moagem simples (SUN; CHENG, 2002; KUMAR et al., 2009).

#### **3.3. PIRÓLISE**

O processo de pirólise também pode ser utilizado como pré-tratamento do material lignocelulósico. A celulose se degrada rapidamente em produtos gasosos e é carbonizada no procedimento quando é submetida a temperaturas acima de 300°C (SUN; CHENG, 2002).

A decomposição do processo de pirólise é lenta e menos produtos voláteis são formados em temperaturas mais baixas. Fan, Gharpuray, Lee, (1987) relatam que ao tratar a biomassa com pirólise e hidrólise ácida branda obtiveram 80-85% de

conversão da celulose em açúcares redutores, com aproximadamente 50% de glicose (SUN; CHENG, 2002; FAN; GHARPURAY; LEE,1987). De acordo com Kumar e outros (2009), o processo de pirólise pode melhorar na presença de oxigênio, enquanto que Sun e Cheng (2002) relatam que quando cloreto de zinco ou carbonato de sódio são adicionados como catalisadores, a decomposição de celulose pura ocorre em temperaturas inferiores.

### **3.4. EXPLOSÃO A VAPOR**

O pré-tratamento utilizando vapor tem sido um dos mais empregados em diferentes tipos de biomassa (SANTOS; SOUTO-MAIOR; GOUVEIA; ROCHA, 2010). Neste tipo de pré-tratamento, as condições utilizadas são altas temperaturas (160-290°C), pressão elevada (0,69-4,83 Mpa) e a reação ocorre em tempo curto (de um a dez minutos), seguida de uma rápida descompressão (OGEDA; PETRI, 2010).

Este pré-tratamento apresenta um rendimento de 45-65% de xilose (ROSA; GRACIA, 2009), mas estas condições podem ser desfavoráveis para a indústria pelo risco de graves acidentes, e por levarem a uma degradação parcial da celulose, que será perdida e reduzirá o rendimento no final do processo (SUN; CHENG, 2002). Este pré-tratamento é influenciado diretamente pelo tempo de exposição, pela temperatura, tamanho da partícula e os diferentes tipos de catalisadores adicionados.

As vantagens deste processo incluem baixo custo de energia, quando comparado a tratamentos mecânicos, e o uso de materiais que podem ser reutilizados. Suas limitações incluem a degradação de parte da fração de xilose, destruição parcial dos carboidratos, geração de compostos inibidores aos processos de fermentação, hidrólise parcial da hemicelulose e a lignina não é extensivamente removida. Por isso, o material pré-tratado necessita ser lavado ocasionando um acréscimo no custo do etanol celulósico.

A explosão a vapor é comumente associada a hidrólise química, podendo ter a presença de catalisadores ácidos ou alcalinos (KUMAR et al., 2009; OGEDA; PETRI, 2010). Geralmente adiciona-se como catalisador  $H_2SO_4$  que promove uma redução na temperatura necessária para ocorrer o rompimento da fibra, a maior remoção da hemicelulose e a hidrólise da celulose (KUMAR et al., 2009).



Para o bagaço de cana, Sun e Cheng (2002) relatam que as melhores condições encontradas foram a 220°C por 30 segundos de exposição na proporção de água-sólidos 2:1 e 1% de ácido sulfúrico. Nestas condições os autores obtiveram uma produção de 65g de açúcar/ 100g de bagaço inicial.

### **3.5. QUÍMICO**

Nos pré-tratamentos químicos (ácidos, alcalinos e/ou oxidativos), ocorrem modificações estruturais e químicas na parede celular melhorando o acesso das enzimas. Nos tratamentos ácidos, a hemicelulose pode ser hidrolisada, enquanto nos tratamentos com álcalis ocorre a remoção e a desestruturação da lignina (OGEDA; PETRI, 2010).

### **3.6. OXIDAÇÃO ÚMIDA**

O pré-tratamento do material lignocelulósico via oxidação úmida é conhecido na literatura desde a década de 80. Neste método, ocorre o fracionamento da biomassa, solubilizando parcialmente a hemicelulose e tornando a celulose mais susceptível à hidrólise enzimática. A degradação da hemicelulose e a formação de sub-produtos irá depender das condições do pré-tratamento e da estrutura química da biomassa. De acordo com Martín, Klinke e Thomsen (2007), o processo de oxidação úmida é adequado para fracionar o bagaço de cana e melhorar a hidrólise enzimática.

Uma das vantagens deste pré-tratamento é a utilização de condições menos severas quando comparados à explosão a vapor, pois utiliza como base água, ar, oxigênio e temperatura aproximadas a 120°C (KLINKE et al., 2002; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007).

De acordo com Martín, Klinke e Thomsen (2007), a combinação da oxidação úmida com materiais alcalinos reduz a formação de aldeídos furânicos e fenólicos. Os autores relatam que, em meio alcalino (195°C durante 15 minutos), obtiveram uma conversão enzimática de aproximadamente 75% de celulose a açúcar, ao produzir um material sólido com quase 70% de celulose com aproximadamente 93% de hemicelulose e 50% de lignina solúveis. Nas mesmas condições em meio ácido, relatam que houve uma perda significativa de polissacarídeos durante a formação de



sub-produtos, como ácidos carboxílicos, diminuindo sua sacarificação enzimática.

Em relação à produção de açúcares, Klinke e outros (2002) relatam que ao pré-tratar palha de trigo com oxidação úmida em meio alcalino (vapor de amônia) conseguiu-se melhores rendimentos em glicose do que ao hidrolisar a biomassa por via alcalina.

### **3.7. PRÉ-TRATAMENTOS EM MEIOS ÁCIDOS E ALCALINOS**

Usualmente é usada água quente com catalisadores ácidos ou alcalinos para melhorar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à celulose. Um dos catalisadores mais comuns é o ácido sulfúrico diluído em temperaturas entre 100-200°C, pois facilita o rompimento da matriz lignina-carboidrato e o ataque enzimático (MOSIER et al., 2005; ZHU et al., 2006, a; b).

Durante o aquecimento em meio ácido, polissacarídeos são hidrolisados, especialmente a hemicelulose, resultando em açúcares livres que podem ser degradados para furfural (de pentoses) e hidroximetilfurfural (de hexoses) (QIAN et al., 2005). Estes compostos inibem as células de levedura e diminuem sua taxa de crescimento, diminuindo a produção de etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Segundo Kootstra e outros (2009), ao tratar palha de trigo com ácido sulfúrico diluído, são formados menores quantidades de furfural a partir da xilose do que ao usar ácido maléico ou fumárico, mostrando ser uma alternativa viável a utilização de ácido sulfúrico diluído no pré-tratamento da palha de trigo.

Diferentes tipos de ácidos são usados em pré-tratamentos de biomassa (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; KUMAR et al., 2009). O ácido sulfúrico é comumente usado em pré-tratamentos de bagaço de cana (LAVARACK; GRIFFIN, 2002), mas outros, como ácidos clorídrico, nítrico e fosfórico também são usados (RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004; GÀMEZ et al., 2006). Recentemente, o uso de ácido acético combinado com peróxido de hidrogênio foi relatado como excelente na remoção da lignina para posterior hidrólise enzimática do bagaço (TAN et al., 2010).

De acordo com Rocha e outros (2011), os pré-tratamentos com ácidos sulfúrico e acético removeram aproximadamente 90% de hemicelulose, conseguindo a taxa de 76% de conversão enzimática, em que a porção de celulose degradada

corresponde a fração de baixa cristalinidade. O autor revela ainda que a produção de inibidores provenientes da lignina foi baixa, possibilitando assim a utilização dos hidrolisados da hemicelulose para fermentação.

Os pré-tratamentos utilizando ácidos merecem especial atenção por vários fatores: precisam de equipamentos especiais por serem corrosivos, a concentração utilizada dos ácidos são tóxicas, ocorre a liberação de muitos inibidores da fermentação e o processo envolve alto custo.

Compostos alcalinos podem ser utilizados no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos devido a parcial solubilização da lignina, mas neste tipo de pré-tratamento utilizam-se altas temperaturas e pressões elevadas. Os álcalis mais utilizados são: hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio. Se comparado ao pré-tratamento ácido, o meio alcalino leva a menores perdas de açúcares oriundos da celulose, mas ainda apresenta os mesmos problemas de custo, equipamentos e poluição ambiental (KUMAR et al., 2009).

### **3.8. ORGANOSOLV**

O pré-tratamento organosolv está entre os principais processos utilizados para pré-tratamentos de biomassas lignocelulósicas, e um dos mais pesquisados. Neste processo, uma mistura de solventes orgânicos (metanol, acetona, glicerol, por exemplo), em presença ou não de um catalisador, é usada para romper as ligações no complexo lignocelulósico.

Este pré-tratamento tem origem em 1970, devido ao processo Kraft e sulfito utilizados na produção de papel, mas foram adaptados devido produzirem poluentes para o ar e a água (KUMAR et al., 2009).

Neste pré-tratamento, pode-se chegar a um rendimento de até 80% de xilose, mas é um dos processos de maiores custos e que envolve maiores tempos de exposição da fibra (ROSA; GARCIA, 2009).

Apesar do alto custo deste processo, a agregação de valor em seus resíduos poderá compensar a indústria lignocelulósica no futuro. Os pré-tratamentos do tipo organosolv apresentam vantagens como a recuperação e reutilização do solvente orgânico e o possível isolamento da lignina como um material sólido para utilização na indústria (ROSA; GARCIA, 2009).

O rendimento total pode ser contabilizado em lignina seca, hemicelulose aquosa e celulose pura após a separação das frações. Entretanto, também existem desvantagens como a lavagem para precipitação da lignina com solventes orgânicos, e estes representam um custo a mais para o processo; e precisa-se do controle dos compostos voláteis liberados pelos solventes orgânicos.

Quando associado a ácido e altas temperaturas, o processo organosolv age rompendo o complexo lignina-carboidratos, aumentando a taxa de deslignificação e o rendimento de xilose. Os melhores ácido, para acelerar essa deslignificação são os ácidos minerais (ácido sulfúrico, fosfórico e clorídrico). Neste processo, ocorre a solubilização da hemicelulose e da lignina, permanecendo a celulose sólida. Já na presença de compostos alcalinos em meio aquoso, Demirbas (2009) relatou que ao aumentar a temperatura ocorre perda de celulose para o meio.

O etanol é o álcool mais utilizado por ser menos tóxico e mais barato, mas outros álcoois com altos pontos de ebulição, como glicerol e etilenoglicol, possibilitam que o processo ocorra em pressão atmosférica. O alto custo energético para recuperar os solventes com alto ponto de ebulição bem como seus preços diminuem o lucro no final do processo (ZHAO; CHENG; LIU, 2009; MESA et al., 2011).

Demirbas (2009) e Küçük (2005) relatam que, ao associar o glicerol a outros solventes (orgânicos e inorgânicos), ocorre a redução da recalcitrância do material lignocelulósico. Já Sun e Cheng (2007) relatam que, ao utilizar palha de trigo em glicerol aquoso a 240°C por 4 horas, obteve-se 95% de celulose e aproximadamente 70% de lignina. E que, após hidrolisar enzimaticamente este material, obteve-se em 24 horas 90% de rendimento de açúcar e em 48 horas 92%.

Segundo Sun e Cheng (2008), o pré-tratamento com organosolv é similar ao mecanismo da explosão a vapor, mas o organosolv apresenta mais vantagens e é mais efetivo na digestibilidade da celulose. Mesa e outros (2011) obteve um rendimento de 29,1 g de glicose /100 g de bagaço ao pré-tratar o bagaço com ácido, seguido por organosolv com NaOH (60min; 195°C; 30% v/v de etanol), com posterior hidrólise enzimática. Os autores relatam ainda que estes rendimentos de glicose foram semelhantes aos encontrados quando o bagaço foi pré-tratado em meio ácido em autoclave.

O pré-tratamento com organosolv e glicerol é um dos mais promissores na deslignificação de materiais lignocelulósicos, pois as características deste álcool associado ao aumento da oferta no mercado facilitará seu uso no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos.

Sabe-se que, sob condições adequadas, o glicerol em meio aquoso remove a lignina de lascas de madeiras, mas com atenção para o controle da temperatura, pois, apesar de haver um aumento da deslignificação, também podem ocorrer perdas de celulose durante o processo (DEMIRBAS 2009; KÜCÜK, 2005).

### **3.9. MICRO-ONDAS**

A procura por processos menos poluentes e mais eficientes tem recebido um grande interesse pela sociedade devido a aspectos ambientais. Nesta busca, as reações isentas de solvente assistidas por irradiação de micro-ondas parecem promissoras (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006; SANSEVERINO, 2002).

Segundo Sanseverino (2002), os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em micro-ondas surgiram em 1986 em dois trabalhos de Gedye e Guidere. As reações foram conduzidas em frasco selado e comparado com o aquecimento convencional, e uma notável redução no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão. Desde então, a irradiação de micro-ondas vem sendo usada com sucesso como fonte de ativação de reações químicas.

No espectro eletromagnético, as micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes que se situam entre as ondas de rádio e a radiação infravermelha, e caracterizam-se por ter frequência de emissão compreendida entre 300MHz e 300GHz (SANSEVERINO, 2002).

O aquecimento por micro-ondas, também chamado de aquecimento dielétrico, é completamente diferente daquele que ocorre em um forno convencional, onde o aquecimento ocorre por condução e convecção. Existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor.

O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um

estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor.

O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006).

Nos processos industriais, utiliza-se as frequências de  $915 \pm 25$  MHz e em processos científicos utiliza-se  $5800 \pm 75$  MHz. Na histerese dielétrica, a energia transformada em calor ocorre através da condução iônica e a rotação dipolar. Na condução iônica, os íons presentes na amostra orientam-se com o campo magnético deslocando-se e causando um aquecimento na amostra devido a resistência encontrada durante o deslocamento (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006).

Em geral, substâncias polares absorvem bem micro-ondas (como água, acetonitrila e etanol), enquanto que substâncias menos polares (hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos) ou substâncias com momento de dipolo nulo ( $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CO}_2$ ) absorvem micro-ondas fracamente (SANSEVERINO, 2002).

A ação das micro-ondas sobre as moléculas de água provoca um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento. Os choques provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo lignocelulósico e conseqüentemente facilitar a ação enzimática sobre os polímeros que o compõem (SANSEVERINO, 2002).

Pré-tratamentos de biomassa com a aplicação de micro-ondas em meio alcalino reduziram em 50% o tempo para obtenção da mesma quantidade de açúcares redutores por hidrólise enzimática da palha de arroz, quando comparado ao processo sem micro-ondas (ZHU et al., 2006a), e foi verificado um aumento de 5% no etanol obtido a partir de palha de trigo (ZHU et al., 2006b; ZHU et al., 2006c).

Gong, Liu e Huang (2010) também relatam bons resultados ao pré-tratar a palha de trigo com irradiação de micro-ondas em meio ácido. Em adição, Cullingford, George e Lightsey (1993) usaram micro-ondas para sacarificar resíduos de celulose sob alta pressão atmosférica.

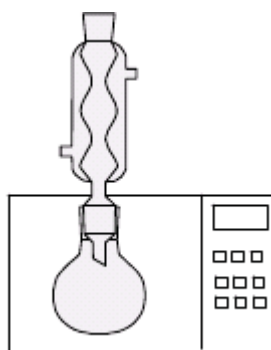
O aquecimento tradicional de sistemas contendo sólidos e solventes viscosos,

como o glicerol, requer mais tempo para transferência de calor em relação ao aquecimento por micro-ondas. Liu e outros (2010) relatam que ao associar irradiação de micro-ondas e glicerol no pré-tratamento de madeira em meio ácido houve um rendimento de sacarificação de 50,6%.

Demirbas (2009) afirma que a madeira, em glicerol a 600K, é completamente transformada a produtos líquidos e gasosos, ocorrendo a formação de sub-produtos oriundos da lignina neste processo. O autor relata que ao entrar em contato com a madeira, o glicerol se liga às fibras através de ligações de hidrogênio e promovem o intumescimento da biomassa que facilita o rompimento de sua estrutura.

Desta forma, a avaliação desta tecnologia na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar parece ser promissora, em termos de aumento e obtenção do rendimento de açúcares redutores para produção de etanol celulósico, e principalmente na aceleração do processo.

Existem no mercado fornos de micro-ondas específicos para diferentes finalidades, mas com preços elevados que chegam à ordem de 50 mil dólares. Neste sentido, alguns autores vem propondo formas de redução de custo desta tecnologia propondo adaptações de fornos de micro-ondas domésticos (Figura 6) para utilização em laboratórios (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006; SANSEVERINO, 2002).



*Figura 6: Sistema experimental para irradiação do bagaço com micro-ondas sob pressão atmosférica, adaptado estritamente de acordo com SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006.*

## **4. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho é avaliar o grau de desestruturação do bagaço após pré-tratamentos em soluções ácidas e alcalinas em glicerol e irradiadas com micro-ondas para produção de etanol celulósico.

### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Promover pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar utilizando micro-ondas, glicerol e hidróxido de sódio;
- Avaliar pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar utilizando micro-ondas, glicerol e ácido sulfúrico;
- Caracterizar a composição química do pré-hidrolisado, determinando a presença de compostos inibidores gerados nos pré-tratamentos;
- Hidrolisar enzimaticamente os bagaços pré-tratados e caracterizar a composição química dos hidrolisados do bagaço;
- Avaliar do impacto no bagaço pré-tratado por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica, no Departamento de Química e Ciências Ambientais no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em São José do Rio Preto – SP.

Todos os experimentos de pré-tratamentos foram realizados em triplicata e no interior de capela devido à liberação de gases ao final dos processos.

### **5.1 Materiais**

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico e não sofreram nenhuma etapa de purificação prévia. Para as análises foram utilizadas as marcas Dinâmica (Follin Ciocalteau) e Merck (Ácido vanílico, e todos os padrões para açúcares).

Os CFT e os ART foram determinados utilizando o espectrofotômetro da marca Gold Spectrum, modelo Lab 53 e as análises de carboidratos foram realizadas em Cromatógrafo iônico Dionex modelo ICS 3000 HPAEC–PAD equipado com amostrador automático AS40 e coluna de troca aniônica CarboPac PA–1. As medidas de calorimetria exploratória diferencial foram realizadas em um calorímetro Perkin-Elmer, modelo DSC 8000 e o forno de micro-ondas utilizado no pré-tratamento do bagaço foi da marca Electrolux, com capacidade de 20 litros, frequência do magnetron de 2,45 GHz, e foi programado para operar sempre com a potência máxima.

### **5.2 Preparo e determinação granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar**

O bagaço de cana utilizado foi coletado em usinas da região de São José do Rio Preto no primeiro semestre de 2008 e lavado com água, até a não detecção de ART livres presentes na fibra (usando o teste de DNS). Após a lavagem, o bagaço foi seco em estufa a 80°C por 72 horas, triturado (com triturador industrial) e peneirado para padronização granulométrica. As fibras escolhidas ultrapassaram a peneira granulométrica de 1,0 mm e após a limpeza e padronização, o bagaço foi armazenado em ambiente seco na ausência da luz para utilização na hidrólise.



### 5.3 Adaptação do forno de micro-ondas

Este equipamento foi inicialmente utilizado conforme as características técnicas e adaptações sugeridas por Silva e outros (2006), que permite a realização de reações à pressão atmosférica com um sistema de refluxo anexado na parte superior do equipamento.

Na adaptação inicial (Figura 7), o forno foi perfurado em sua parte central para a inserção de um conector de cobre, que permitiu a adaptação de um condensador de refluxo. As adaptações sugeridas por Silva e outros (2006) não permitem vazamentos de radiação através das perfurações realizadas, pois existe uma vedação externa com cola de silicone nas conexões que, além de impedir o vazamento da radiação de micro-ondas, é fácil de remover e resistente a temperaturas superiores a 110°C. Visando aumentar a vida útil do magnetron, foi adaptado anteriormente um cooler acima deste para forçar a saída do ar quente e evitar o desligamento por superaquecimento.



Figura 7: Forno de micro-ondas adaptado de acordo com SILVA; FERREIRA; SOUZA , 2006.

Após alguns experimentos, observou-se a necessidade de novas adaptações no sistema sugerido por Silva e outros (2006). Um sistema de rotação, originalmente empregado em um rota-evaporador, substituiu o condensador de refluxo comum e permitiu a rotação do balão dentro da cavidade do forno de micro-ondas em pressão reduzida, como visto na Figura 8.



Figura 8: Adaptação do micro-ondas doméstico com inserção de um sistema rotativo.

Com este novo sistema, a irradiação de micro-ondas foi melhor distribuída na superfície da amostra, evitando o ressecamento pontual com a consequente queima do material durante a etapa de pré-tratamento. Deve-se ressaltar que o sistema opera dentro de capela com vidro blindado para segurança dos usuários e todos os equipamentos de proteção individual foram utilizados.

#### 5.4 Pré-tratamentos

As amostras foram submetidas a um ou dois minutos de irradiação em balão de fundo redondo de 250 mL de forma estática ou rotacionado a 36 rpm. Diferentes condições químicas em termos de concentrações de hidróxido de sódio e ácido sulfúrico foram testadas variando-se também a porcentagem de água e glicerol presentes no meio reacional como apresentadas nas Tabelas 3, 4, 5, 6 e 7 e nas Figuras 9 a 18, sendo que em todos os experimentos foram utilizados 3 g de bagaço previamente lavado, seco e padronizado e 30 mL da solução escolhida.

O tempo de impregnação das soluções utilizado para todas as amostras foi de 24 horas, sendo que nas amostras com soluções de hidróxido de sódio a impregnação foi feita em recipientes de plástico e nas amostras de soluções contendo ácido sulfúrico a impregnação foi realizada diretamente no balão que foi inserido no forno de micro-ondas.

Depois de finalizado o processo de irradiação por micro-ondas, o balão foi

resfriado na capela, sem a ocorrência de choque térmico e o líquido foi separado do bagaço por meio de filtração simples. Em seguida, o líquido resultante foi centrifugado novamente, filtrado a vácuo em algodão e armazenado a -20°C para posterior análise dos compostos presentes.

No bagaço residual, foram adicionados 300 mL de água destilada para lavagem e retirada dos compostos solubilizados durante o pré-tratamento. Após a lavagem, a fração sólida foi seca a 60°C em estufa por 48 horas e armazenada em local seco e ao abrigo de luz para a realização do procedimento de hidrólise enzimática. Foram efetuadas três repetições para todos os experimentos.

## **5.5 Caracterização Química**

### **5.5.1 Determinação de compostos fenólicos totais - CFT**

Os compostos fenólicos totais, na fração solubilizada após os pré-tratamentos bem como do processo de hidrólise enzimática, foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu. De acordo com a metodologia proposta, 3,0 mL da amostra diluída e 0,2 mL do reagente Folin-Ciocalteu foram levados a agitação em vórtice. Em seguida, a solução foi deixada em repouso de 3 a 5 minutos ao abrigo de luz e à temperatura ambiente.

Após este período, foram adicionados 0,8 mL de Carbonato de Sódio 15% à reação, que foi novamente agitada em vórtice e mantida à temperatura ambiente e na ausência de luz por 30 minutos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A solução foi transferida para uma cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico e a leitura foi feita em um espectrofotômetro com absorvância em  $\lambda=760$  nm. O resultado foi expresso em concentração de polifenóis correspondente a ácido vanílico. A referência foi constituída apenas por água destilada com a adição dos mesmos reagentes em idêntico procedimento de análise (SANTOS; GOUVEIA, 2009).

### 5.5.2 Açúcares redutores totais - ART

Os açúcares redutores totais solúveis após os pré-tratamentos e o processo de hidrólise foram determinados pelo método de DNS. De acordo com a metodologia proposta, 0,5 mL da amostra diluída e 0,5 mL do reagente DNS foram levados a um banho termostático a 100°C por 10 minutos para ocorrer a reação. Em seguida, a reação foi interrompida colocando-a em um banho de gelo por aproximadamente 5 minutos.

Após este período, foram adicionados 4,0 mL de água à reação, que foi agitada em vórtice. A solução foi transferida para uma cubeta de vidro de 1 cm de caminho óptico e a leitura foi feita em um espectrofotômetro com absorvância em  $\lambda=540$  nm. O resultado foi expresso em concentração de açúcares redutores correspondente a glicose. A referência foi constituída apenas por água destilada com a adição dos mesmos reagentes em idêntico procedimento de análise (MILLER, 1959).

### 5.5.3 Análise cromatográfica da fração líquida do hidrolisado

A fim de avaliar o processo de degradação da fração lignocelulósica das fibras pelos pré-tratamentos, realizou-se análise de açúcares redutores por cromatografia iônica. A forma de onda empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes pulsos potenciais e durações:  $E_1= 0,10V$  ( $t=0,40s$ );  $E_2= -2,00V$  ( $t=0,02s$ );  $E_3= 0,60V$  ( $t= 0,01s$ );  $E_4=0,10V$  ( $t=0,06s$ ). Os diluentes foram preparados com água deionizada ultra pura ( $18M \Omega$ ) e desgaseificada com  $N_2$ .

O fluxo foi de 1 mL/minuto com solvente A (200 mM de NaOH), solvente B (água ultra pura) e solvente C (500mM de acetato de sódio com 150 mM de NaOH), com eluição isocrática de 0 a 14 minutos com 5% de A, 95% de B e 0% de C. Após 14 minutos, a eluição foi por gradiente até 30 minutos chegando a 90% de A, 0% de B e 10% de C.

Para as análises dos açúcares foram usados padrões de glicose, xilose, galactose, arabinose, xilobiase e celobiase (Merck). Antes da determinação de carboidratos por cromatografia líquida de alta eficiência, o líquido a ser analisado foi filtrado em membranas Millex®-GV 0,22  $\mu m$  (Millipore).

#### **5.5.4 Análise do bagaço pré-tratado por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Esta técnica foi utilizada para verificar as alterações ocorridas na estrutura do bagaço após os pré-tratamentos. Os bagaços foram pesados (em torno de um a dois miligramas), inseridos no porta-amostras de alumínio e selados. O porta-amostra de referência foi selado sem nenhuma amostra em seu interior e submetido às mesmas condições de análise dos porta-amostras contendo o bagaço. A programação térmica dos fornos foi linear entre 100 a 280°C com taxa de aquecimento de 25°C/min, com nitrogênio puro como gás de arraste a 20 mL/min.

### **5.6 Determinação das atividades enzimáticas**

O complexo enzimático lignocelulolítico Powercell<sup>®</sup> utilizado para a hidrólise foi cedido pela Prozyn BioSolutions (São Paulo) e as atividades enzimáticas deste complexo foram pré-determinadas antes do processo de hidrólise.

Em todas as caracterizações, foi considerada uma unidade (U) de atividade enzimática a quantidade de enzima (em mg) necessária para liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto.

#### **5.6.1 CMCcase**

A atividade CMCcase foi determinada diluindo a enzima e o CMC em três solventes diferentes: água, tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0) e tampão citrato (0,1 mol/L, pH 5,0). A metodologia empregada em todos os testes foi: 0,05 mL da enzima comercial Powercell<sup>®</sup> (Concentração 0,3 mg/mL), 0,45 mL de substrato CMC 4% em tubos de ensaio que foram levados a banho de 60°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) e a solução resultante foi levada a um banho de ebulição por 10 minutos. Foram adicionados 4,0 mL de água destilada em cada tudo e o açúcar liberado foi medido pelo método DNS com absorbância lida em  $\lambda=540$  nm (MILLER, 1959).

### **5.6.2 Xilanase e Avicelase**

O procedimento para análise de xilanase e avicelase foi realizado de forma idêntica à análise de CMCase. Entretanto, utilizou-se como substrato xilana 1% e avicel 1% para as análises, respectivamente.

### **5.6.3 $\beta$ - glicosidase e $\beta$ - xilosidase**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada com 50  $\mu$ L do extrato enzimático bruto devidamente diluído, 250  $\mu$ L de tampão 0,1 mol/L 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 interrompida pela adição 2,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,0 mol/L e o nitrofenol liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0  $\mu$ mol de nitrofenol por minuto de reação a partir da curva padrão de nitrofenol. A atividade de  $\beta$ -xilosidade foi determinada de maneira análoga, utilizando-se como substrato 4-nitrofenol-D-xilopiranosídeo 4 mM (PNPX, Sigma Co.).

## **5.7 Hidrólise Enzimática**

### **5.7.1 Determinação da metodologia para hidrólise enzimática**

Inicialmente foram realizados testes com bagaço não tratado em tubos de 50 mL com 0,03 g de enzima por 0,25 g de bagaço. As soluções utilizadas neste processo foram água, tampão citrato (0,1 mol/L, pH 5,0) e tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,0). As amostras foram mantidas em banho termostático a 60°C a 150 rpm e os açúcares redutores totais liberados foram analisados após 12, 24 e 48 horas de hidrólises.

Os controles das amostras foram feitos com bagaço não tratado sem enzima. De acordo com Santos, Souto-Maior, Gouveia e Rocha (2010), o uso de tampão citrato em bagaço pré-tratado apresenta bons resultados de hidrólise enzimática.

### **5.7.2 Hidrólise enzimática das amostras pré-tratadas**

O bagaço foi pesado (0,25 g de bagaço) em tubos de acrílico de 50 mL e adicionados 0,03 g da enzima diluídos em 10 mL de água destilada. Os tubos foram mantidos fechados, em banho termostático por 24 horas, 60°C e com agitação de 150 rpm. Os controles foram feitos com bagaço pré-tratado sem enzima e bagaço não tratado com e sem enzima. Todos os bagaços pré-tratados anteriormente foram submetidos a este processo de hidrólise.



## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1 Preparo e determinação granulométrica do bagaço de cana-de-açúcar**

A granulometria do bagaço escolhida para a pesquisa impossibilitou o cálculo de variação de massa após os pré-tratamentos, pois houve muitas perdas durante as etapas de lavagem, centrifugação e filtração. Além disso, os pré-tratamentos que envolvem glicerol requerem mais etapas de lavagem do que os em água, o que aumenta as perdas de bagaço.

Entre todos os pré-tratamentos analisados, os que envolvem maiores concentrações de ácido (0,07 e 0,1 mol/L) tornaram os bagaços quase completamente liquefeitos, impossibilitando a pesagem final.

Assim, o erro na determinação da variação de massa torna os resultados não confiáveis e praticamente impossíveis de serem determinados com acuracidade em algumas amostras.

### **6.2 Determinação das atividades enzimáticas e adaptação da metodologia para hidrólise enzimática.**

De acordo com o fabricante, o complexo enzimático Powercell® apresenta condições ótimas de atividade em pH 5,0 e temperatura 60°C. Assim, as atividades enzimáticas deste complexo foram testadas em dois sistemas tampões (citrato e acetato) e em meio aquoso (Tabela 1). A opção pelo sistema tampão citrato foi estabelecida pois, de acordo com Santos, Souto-Maior, Gouveia e Rocha (2010), a hidrólise de bagaço de cana neste sistema tampão apresentou excelentes resultados, atingindo um rendimento de 60% em 24 horas após pré-tratar o bagaço com explosão a vapor em meio alcalino, e utilizar o processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando a *Saccharomyces cerevisiae*.

Para determinação do tempo de hidrólise a ser empregado neste estudo, utilizou-se bagaço não tratado e a proporção de 12% (m/m) do complexo enzimático por massa de bagaço seco, como sugerido pelo laudo técnico fornecido pelo fabricante do complexo enzimático.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 1, o complexo enzimático no meio reacional com tampão citrato não apresentou atividade



enzimática detectável em termos de carboximetilcelulase, xilanase,  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e avicelase.

**Tabela 1:** Perfil das atividades enzimática do complexo Powercell® utilizado para hidrólise enzimática.

Atividade Enzimática	U/mg de complexo enzimático		
	Tampão citrato	Meio Reacional Tampão Acetato	Água destilada
Carboximetilcelulase	-	11,3 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,1
Xilanase	-	10,5 $\pm$ 0,8	3,0 $\pm$ 0,2
$\beta$ -Glicosidase	-	0,8 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1
$\beta$ -Xilosidase	-	-	-
Avicelase	-	-	-

- Valores não detectados através do teste DNS.

Como já esperado pelos resultados dos testes das atividades enzimáticas, durante todo o período avaliado de hidrólise, não foram detectados açúcares redutores totais no meio reacional contendo tampão citrato.

Embora o tampão acetato seja amplamente empregado na literatura como condicionador de pH para ação de enzimas lignocelulolíticas (PAN et al., 2005; TERAMOTO; LEE; ENDO, 2008; MARTÍN et al., 2006) e também ter possibilitado os maiores valores de atividades enzimáticas (Tabela 1), nos ensaios de hidrólise de bagaço realizados com o complexo enzimático em estudo, os melhores resultados foram obtidos com as reações promovidas em meio não tamponado (água destilada) em todos os tempos de hidrólise avaliados.

Ao variar o tempo de hidrólise (12, 24 e 48 h), verificou-se que houve variação de 71 % no teor de açúcares redutores totais obtidos entre os tempos de 12 e 24 horas em meio aquoso e mantendo-se praticamente inalterado entre os tempos de 24 e 48 h, mantendo-se o patamar próximo a 216 mg de açúcares redutores totais/g de bagaço seco (Tabela 2).

**Tabela 2:** Determinação do tempo ideal para hidrólise enzimática do bagaço *in natura* em diferentes meios reacionais.

Meio reacional utilizado para hidrólise	mg de açúcares redutores totais/ g de bagaço		
	Tempo de hidrólise		
	12 h	24 h	48 h
Tampão Citrato	-	-	-
Tampão Acetato	125 ± 7	169 ± 0,9	182 ± 18
Água destilada	153 ± 5	215 ± 6	217 ± 13

- Valores não detectados através do teste DNS.

Assim, de acordo com estes resultados, optou-se por submeter as amostras dos bagaços pré-tratados a hidrólise enzimática em meio não tamponado durante 24 horas, com agitação orbital (150 rpm) e a temperatura de 60°C.

### 6.3 Pré-tratamentos

#### 6.3.1 Utilização do glicerol associado à irradiação de MO como pré-tratamento do bagaço.

Nossos estudos com glicerol em micro-ondas para pré-tratamento de fibras vegetais foram iniciados em 2009, e mais recentemente foi publicado um trabalho com mesmo tema para pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (LIU et al., 2010), o que mostra a potencialidade desta proposta.

Na Tabela 3, observa-se que no bagaço *in natura* não foram detectados compostos fenólicos e ART, e ao comparar a utilização de 100% glicerol com 100% água, após o pré-tratamento associado a 2 minutos de irradiação de micro-ondas, houve uma liberação de compostos fenólicos totais superior a 7 vezes envolvendo glicerol em relação a água, mas o teor de ART permaneceu na mesma ordem.

**Tabela 3:** Influência dos solventes empregados nos pré-tratamentos de bagaço sobre a liberação de compostos fenólicos e ART.

Condição de pré-tratamento	Após o pré-tratamento		Após a hidrólise enzimática
	CFT (mg/ g bagaço)	ART (mg/ g bagaço)	ART (mg/ g bagaço)
<i>In natura</i>	-	-	215 ± 6
100% água	1,3 ± 0,1	3,6 ± 0	202 ± 7
100% glicerol	9,6 ± 0,6	2,7 ± 0,4	247 ± 7

- Valores não detectados através do teste DNS.

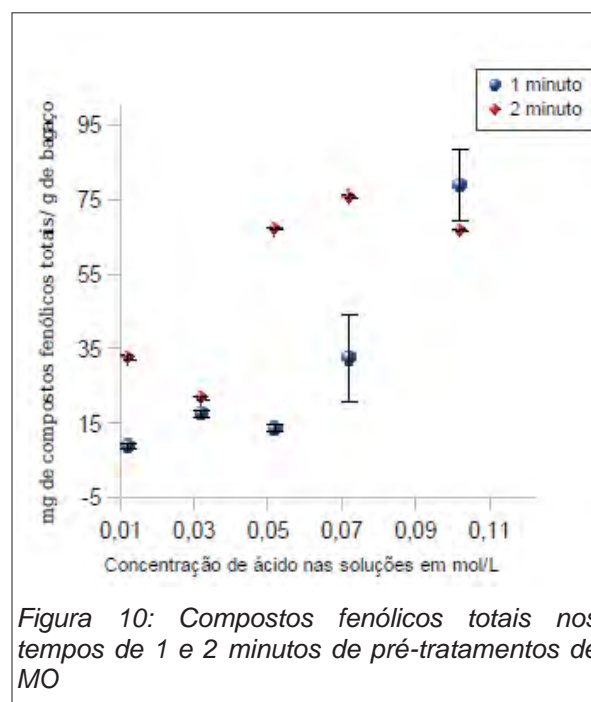
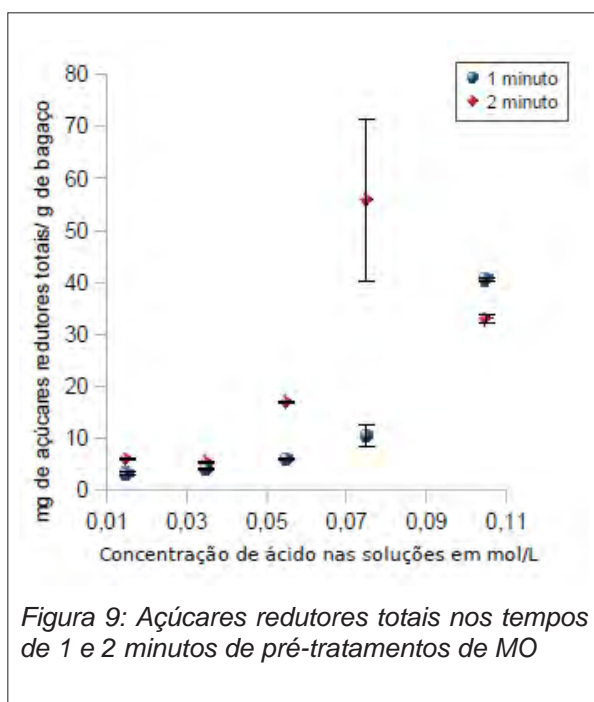
A influência do tratamento com glicerol no processo hidrolítico enzimático foi 15% superior em ART em relação ao bagaço *in natura* e o tratamento com água praticamente não alterou o resultado da hidrólise enzimática.

Os resultados encontrados neste estudo mostram-se em acordo com os sugeridos por Demirbas (2008), pois o uso de solventes orgânicos polares, como o glicerol, em contato com o material lignocelulósico de madeira da árvore de álamo causa intumescimento da fibra, e também formam ligações de hidrogênio que, ao sofrerem as repulsões com os grupos adjacentes, proporcionam o alisamento da cadeia de celulose e facilita o processo de hidrólise enzimática. O autor ainda cita a ocorrência do rompimento das ligações entre lignina-carboidratos e a dissolução da lignina no glicerol, o que pode explicar os maiores teores de CFT na presença deste solvente.

Em um teste preliminar com as amostras provenientes do processo de hidrólise, não foram detectados compostos fenólicos totais, tornando-se assim desnecessária a determinação destes compostos nas amostras.

### **6.3.2 Influência do tempo de irradiação de micro-ondas no pré-tratamento do bagaço em soluções de ácido sulfúrico em glicerol.**

O tempo para irradiação de micro-ondas foi avaliado com variações na concentração de ácido sulfúrico em glicerol na ausência de água. A influência do tempo em termos de liberação de ART e compostos fenólicos estão apresentados nas figuras 9 e 10.

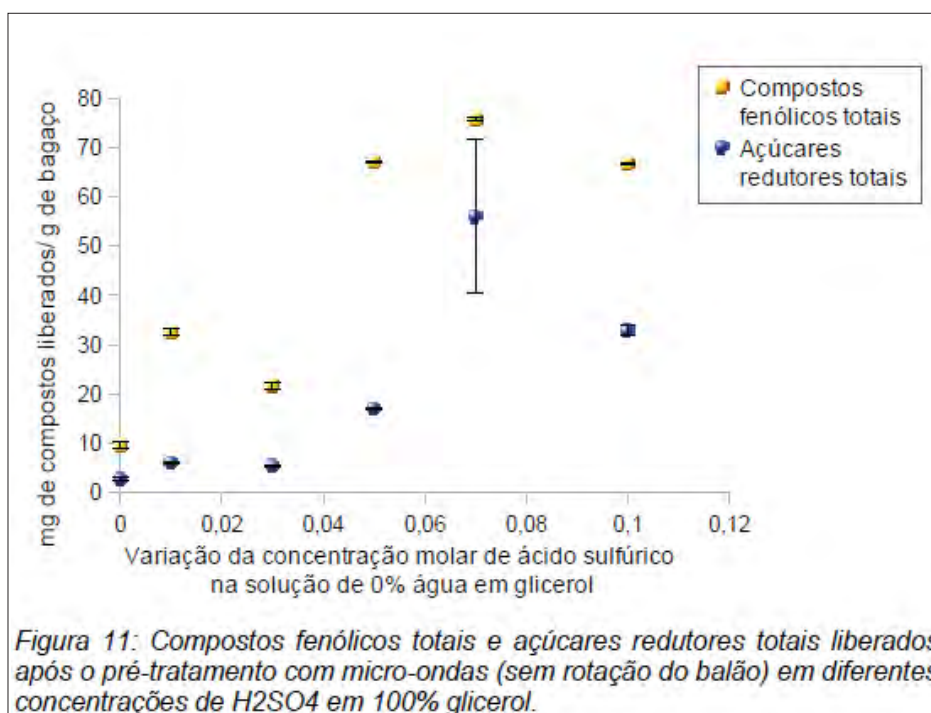


Observa-se na Figura 9 e na Figura 10 que apenas na concentração de ácido sulfúrico igual a 0,1 mol/L obteve-se maiores liberações de CFT e ART após 1 minuto de irradiação em relação a 2 minutos. Este resultado pode indicar algum tipo de degradação do material solubilizado devido as condições de acidez e temperatura que ocorrem neste caso. Deve-se salientar que a temperatura do meio reacional aumenta gradativamente até atingir o ponto de ebulição do glicerol (290°C).

De acordo com estes resultados e visando o aumento de escala deste processo, optou-se por explorar métodos que envolvam menores concentrações de ácido sulfúrico (0,05 e 0,01 mol/L) e tempo de irradiação de 2 minutos. Nestas condições foi possível também observar o início da degradação do bagaço, o que impediu os testes com tempos de irradiação superiores com esta granulometria de bagaço.

### 6.3.3 Influência da variação na concentração de $H_2SO_4$ no pré-tratamento do bagaço.

A Figura 11 apresenta as variações das concentrações de ART e CFT encontradas após o pré-tratamento com diferentes concentrações de ácido sulfúrico em glicerol puro após a irradiação de 2 minutos de micro-ondas mantendo o balão estático dentro da cavidade do forno.



Observa-se uma pequena tendência de aumento de concentração de ambos os parâmetros analisados em função do aumento da concentração de ácido sulfúrico no meio, exceto para a concentração de  $H_2SO_4$  igual a 0,03 mol/L. Os pré-tratamentos nas concentrações de 0,07 mol/L e 0,1 mol/L promoveram a liquefação por completo da amostra de bagaço, não produzindo assim fibras sólidas que pudessem ser submetidas ao processo de sacarificação enzimática.

Com a ação do complexo enzimático sobre os bagaços pré-tratados, constatou-se que os melhores resultados em termos de ART foram obtidos com as amostras tratadas com  $H_2SO_4$  na concentração de 0,01 mol/L, em glicerol anidro (Tabela 4).

Ao comparar tal resultado com o controle (bagaço irradiado em somente

glicerol na ausência de ácido) houve um aumento de 196% no rendimento de açúcares redutores totais após a hidrólise enzimática. Os resultados deste trabalho encontram-se de acordo com a literatura (GONG; LIU; HUANG et al., 2010), que afirmam ter obtido melhores rendimentos ao tratar a palha de arroz em meio ácido e micro-ondas.

**Tabela 4:** Açúcares redutores totais liberados após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com micro-ondas em diferentes concentrações de  $H_2SO_4$  em 100% de glicerol\*.

Concentração de $H_2SO_4$ em mol/L	ART após hidrólise mg/ g de bagaço
Controle (sem $H_2SO_4$ )	247 ± 7
0,01	485 ± 12
0,03	369 ± 28
0,05	362 ± 6
0,07	-
0,10	-

- Não realizada. \* Amostra estática na cavidade do forno de micro-ondas.

De acordo com Gong, Liu e Huang (2010), a presença de ácido em glicerol nos pré-tratamentos facilita a diminuição da recalcitrância da fibra e a liberação da celulose para a hidrólise enzimática, com rendimento de 71% de açúcar ao pré-tratar palha de arroz com ácido acético (25%, proporção de 1:15 sólido/líquido) e 5 minutos de irradiação de micro-ondas. Em seu estudo, os autores relatam a observação da irregularidade da superfície das amostras após o pré-tratamento e justificam esta mudança na estrutura da fibra pela remoção da lignina.

Em nosso estudo, foi observado o aumento dos CFT liberados em função do aumento da concentração de  $H_2SO_4$ , sendo que possivelmente, este comportamento está relacionado com a solubilização da lignina para o meio. Por outro lado, o aumento da concentração de  $H_2SO_4$  no meio reacional pode promover a solubilização de açúcares da hemicelulose e da celulose, diminuindo assim o rendimento de ART após a hidrólise enzimática.

Como o foco deste trabalho é a avaliação dos diferentes pré-tratamentos do bagaço de cana objetivando facilitar o posterior processo de hidrólise enzimática, a utilização de menores quantidades de produtos químicos e reduzir a formação de compostos inibitórios ao processo fermentativo, e os melhores resultados

encontrados foram na menor concentração utilizada (0,01 mol/L), escolheu-se para dar seqüência a novos pré-tratamentos, concentrações mais baixas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,01 mol/L e 0,05 mol/L) variando a quantidade de água nas soluções de glicerol.

#### **6.3.4 Influência da água nas soluções de glicerol com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no pré-tratamento do bagaço.**

Na Figura 12, pode-se notar que há uma diminuição de compostos fenólicos e açúcares redutores totais com o aumento da quantidade de água nas soluções, provavelmente pela diminuição da temperatura de ebulição do meio, o que contribui para diminuir a eficiência em termos de rupturas da estrutura lignocelulósica.

De acordo com Ogeda, Petri (2010) e Gouveia, Nascimento e Souto-Maior (2009), a presença de ácidos em pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos contribui para hidrolisar parcialmente a hemicelulose liberando xilose, ácido acético e furfural, e a partir da celulose, glicose e hidroximetilfurfural. Neste caso, observa-se que após o pré-tratamento estudado, há formação de açúcares redutores totais no meio que podem ter sido gerados pela hidrólise parcial da hemicelulose ou pelo rompimento de fragmentos da celulose.

A presença destes açúcares no momento de hidrólise enzimática pode inibir o processo ou reduzir seu rendimento final. A retirada dos açúcares redutores liberados durante o pré-tratamento elevaria os custos de produção e tornaria o processo inviável. Assim é imprescindível que para viabilizar economicamente este processo deve-se encontrar uma concentração ideal de água no meio que possibilite a ruptura parcial da lignina, facilitando o ataque enzimático, mas que não produza tantos inibidores às enzimas.

Pode-se observar na Figura 13 que as amostras com maiores teores de água no meio produziram menores quantidades de açúcares redutores totais após o processo de sacarificação enzimática.



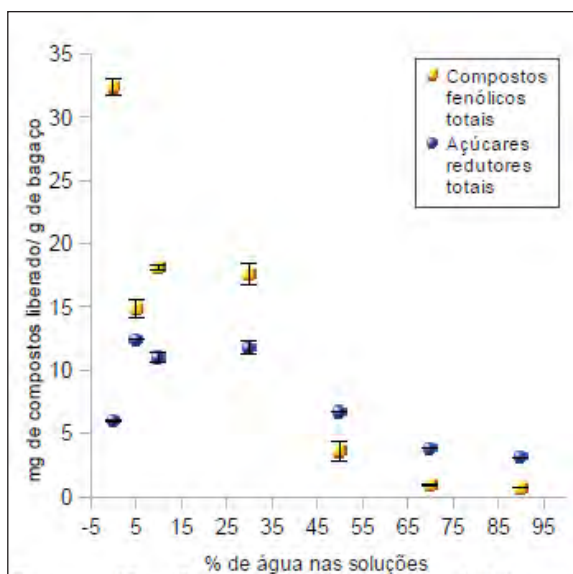


Figura 12: Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas sem rotação, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01M, glicerol e diferentes % de água como solução.

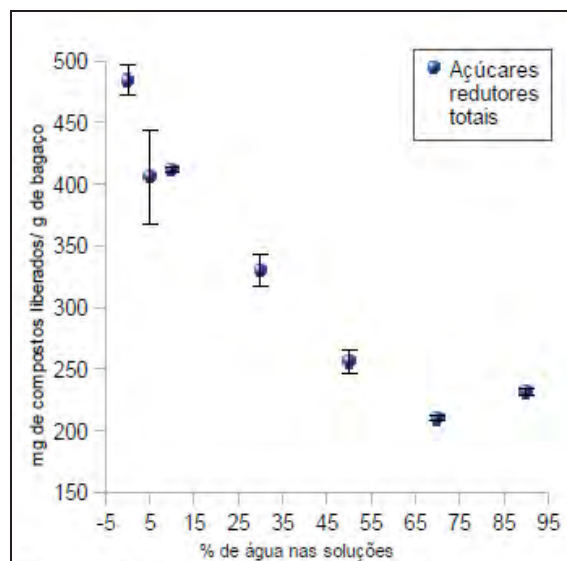
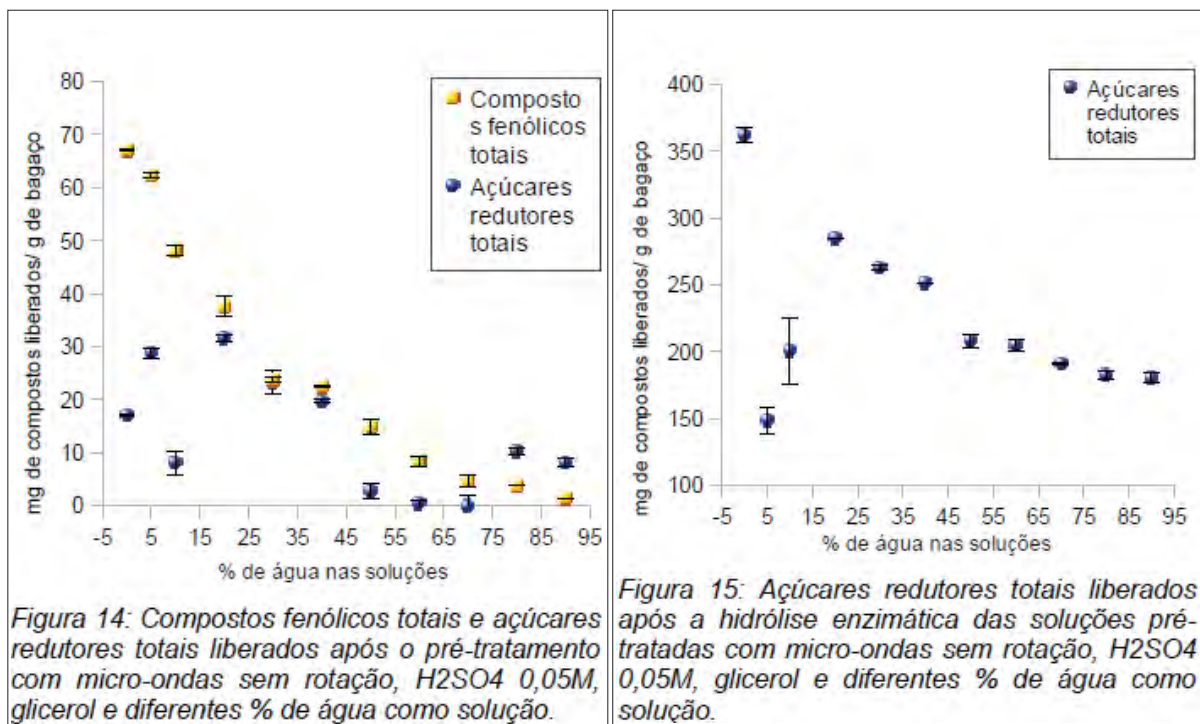


Figura 13: Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas sem rotação, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01M, glicerol e diferentes % de água como solução.

Nos bagaços pré-tratados com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,05 mol/L), ocorreu a mesma tendência de diminuição da liberação de compostos fenólicos totais com o aumento do teor água nas soluções (Figura 14). No entanto, os açúcares redutores totais nos pré-hidrolisados não demonstraram nenhuma tendência com o aumento de água no meio (Figura 14). Os resultados após a hidrólise enzimática foram concordantes com os obtidos no pré-tratamento com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 mol/L, no qual ocorre uma diminuição nos açúcares redutores produzidos com o aumento de água no meio. Entretanto, a maior concentração de ácido sulfúrico (0,05 mol/L) não contribuiu para potencializar a hidrólise enzimática (Figura 15).





Analisando-se as concentrações de ácido sulfúrico e quantidades de água nos pré-tratamentos estudados, o melhor rendimento encontrado após a hidrólise enzimática ( $485 \pm 12$  mg/g de bagaço) foi encontrado nas condições de 0,01 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> com solução de 100% glicerol e irradiação de 2 minutos de micro-ondas. Este pré-tratamento produziu apenas  $32 \pm 0,7$  mg de compostos fenólicos totais por grama de bagaço, valor baixo se comparado com outros pré-tratamentos.

Nestas condições torna-se muito evidente que bagaços submetidos a radiação por micro-ondas, em maiores teores de água, tiveram suas estruturas celulares menos alteradas, mantendo assim sua recalcitrância.

### 6.3.5 Avaliação dos pré-tratamentos do bagaço de cana em glicerol/água em meio alcalino.

Demirbas (2009) tem aplicado hidróxido de sódio no processo de pré-tratamento de madeira em combinação com glicerol e micro-ondas. O autor relata que em presença do glicerol em meio alcalino, a madeira foi completamente convertida a produtos líquidos e gasosos em temperaturas acima de 600K. Cita ainda a completa perda do glicerol (DEMIRBAS, 2009) após o procedimento, devido à formação de sub-produtos derivados da degradação da lignina.

Para os testes iniciais, preparou-se duas concentrações de NaOH (0,1 mol/L e 0,03 mol/L) em glicerol puro e com 5% de água. Observou-se que no preparo da solução com glicerol puro houve dificuldade de dissolução do NaOH.

Pode-se observar na Tabela 5 que os valores de ART e fenólicos totais obtidos após os pré-tratamentos foram semelhantes em todas as condições estudadas, diferenciando apenas do tratado com glicerol puro.

Os ART detectados após a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* foram semelhantes aos do bagaço pré-tratado com glicerol puro, com um aumento de somente 15% (m/m) no valor médio do rendimento (Tabela 5).

**Tabela 5:** Impacto do pré-tratamento com NaOH e irradiado por MO (modo estático) e hidrólise enzimática na liberação de compostos fenólicos totais e ART.

Condições de pré-tratamento	Após pré-tratamento do bagaço			Após hidrólise enzimática
	Teor de água em %	CFT mg/ g de bagaço	ART mg/ g de bagaço	ART mg/ g de bagaço
<i>In natura</i> *	0	-	-	216 ± 6
Glicerol puro**	0	9,6 ± 0,6	2,7 ± 0,4	247 ± 7
0,03 mol/L NaOH	0	23,9 ± 1,8	12,1 ± 0,8	478 ± 6
	5	20,9 ± 0,2	11,7 ± 0,2	350 ± 1
0,10 mol/L NaOH	0	28,2 ± 1,1	10,3 ± 0,4	417 ± 4
	5	20,4 ± 1,3	3,5 ± 0,5	334 ± 13

\* Bagaço não tratado

\*\* Bagaço tratado em glicerol puro na ausência de NaOH

Ao comparar o bagaço *in natura* com o bagaço tratado com NaOH na concentração de 0,03 mol/L na ausência de água, observou-se um aumento de 121% (m/m) no rendimento de ART. Com 5% de água no meio houve uma diminuição de 73% no rendimento de ART após a hidrólise enzimática. Entre os pré-tratamentos realizados com NaOH, houve maior liberação de ART na concentração de 0,03 mol/L.

Assim como ocorreu com o tratamento com  $H_2SO_4$ , a adição de água no meio reacional causa diminuição significativa na liberação de ART pelo complexo enzimático empregado. Várias hipóteses podem ser lançadas para este resultado. A presença de água diminui o ponto de ebulição do sistema e no curto período de irradiação, a temperatura mais baixa, não promoveria a desestruturação adequada da fibra para plena ação do complexo enzimático.

Também se pode pensar no efeito de intumescimento que o glicerol proporciona à fibra, pois o glicerol se liga com a matriz sólida através de ligações de hidrogênio, e ao sofrerem as repulsões pelos grupos polares do material lignocelulósico causa um alisamento da cadeia de celulose e o intumescimento da fibra (DEMIRBAS, 2009). Mas, a redução de apenas 5% no teor de glicerol presente não teria, a primeira vista, um impacto significativo para a variação na liberação de ART observada nestes experimentos.

Ao comparar os teores de ART obtidos após a hidrólise enzimática do bagaço *in natura* (216 mg/ g de bagaço), do bagaço pré-tratado com glicerol puro (247 mg/ g de bagaço) e do bagaço pré-tratado com NaOH 0,03 mol/L em glicerol puro (478 mg/ g de bagaço), é evidente a influência do hidróxido de sódio no processo. Este aumento de 93% no rendimento da hidrólise enzimática é resultado da maior degradação e exposição da fibra vegetal para as enzimas hidrolíticas quando em presença de meio alcalino. A mesma tendência é observada na concentração de 0,10 mol/L de NaOH.

De acordo com Demirbas (2009), pode ocorrer o aumento na degradação do material lignocelulósico nos pré-tratamentos em presença de glicerol. O autor justifica essa degradação devido à quebra da tensão superficial com a elevação da temperatura do líquido, o que promove a maior penetração dos compostos alcalinos na fibra e a quebra da lignina, liberando assim os compostos fenólicos no meio e facilitando assim o ataque enzimático no processo de hidrólise enzimática.

Neste momento, não está claro se a degradação observada da lignina em glicerol alcalino se deve à ação direta dos íons hidroxilas sobre a estrutura da lignina ou se esta degradação é fruto da ação dos gliceróxidos formados pela desprotonação do glicerol sobre a estrutura da lignina.

### 6.3.6 Adaptação do forno de micro-ondas para irradiação em modo rotativo.

A irradiação do bagaço no forno de micro-ondas em modo estático, como proposto por Silva e outros (2006), proporciona visivelmente a não uniformidade do material em alguns dos pré-tratamentos realizados, e assim decidiu-se readaptar o forno empregado em modo estático com a introdução de dispositivo rotativo.

Esta adaptação constitui-se na inserção, na parte superior do forno, de um rotor com rotação controlada eletronicamente, de forma que o balão com as amostras de bagaço se mantenha conectado ao sistema de refluxo e em rotação sem entrar em contato com a base cavidade do forno.

As condições dos pré-tratamentos do bagaço em modo rotativo estão descritos na Tabela 6. O controle adotado foi o bagaço *in natura* (não tratado) que produziu  $216 \pm 6$  mg de ART por grama de bagaço.

Enquanto que, no modo estático, o bagaço tratado com glicerol puro produziu  $247 \pm 7$  mg de ART, operando em modo rotativo este valor sofreu aumento de 52% após a hidrólise enzimática mantendo as demais condições de pré-tratamento.

**Tabela 6:** Comparação entre pré-tratamentos com soluções de  $H_2SO_4$ , glicerol e água irradiados por micro-ondas nos modos estático e rotativo.

Concentração de $H_2SO_4$	Condições de pré-tratamento		Após pré-tratamento do bagaço		Após hidrólise enzimática
		Teor de água em %	CFT mg/ g de bagaço	ART mg/ g de bagaço	ART mg/ g de bagaço
<i>In natura</i>	*	*	*	*	$216 \pm 6$
Glicerol puro	-	0	$9,6 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,4$	$247 \pm 7$
	+	0	$21,0 \pm 1,0$	$6,3 \pm 0,2$	$376 \pm 26$
0,05 mol/L	-	20	$37,6 \pm 1,8$	$31,6 \pm 0,7$	**
	+	20	$88,1 \pm 0,3$	$51,4 \pm 0,9$	$436 \pm 6$
	-	40	$22,4 \pm 0,2$	$19,7 \pm 0,4$	**
0,07 mol/L	+	40	$47,4 \pm 7,9$	$47,3 \pm 0,4$	$466 \pm 86$
	-	0	$75,7 \pm 0,4$	$55,9 \pm 15,6$	**
0,10 mol/L	+	0	$77,2 \pm 2,7$	$40,7 \pm 1,9$	$617 \pm 24$
	-	0	$66,7 \pm 0,2$	$32,9 \pm 0,9$	**
	+	0	$81,6 \pm 2,6$	$57,8 \pm 0,8$	$326 \pm 16$

\* O bagaço *in natura* não foi submetido à irradiação de M.O. e os valores de CFT e ART não foram detectados antes da hidrólise enzimática; \*\* Bagaços não hidrolisados enzimaticamente; + Irradiação micro-ondas no modo rotativo; - Irradiação micro-ondas no modo estático.

Os resultados obtidos indicam que o aumento do rendimento em ART no processo de hidrólise enzimática está relacionado diretamente com a melhor distribuição das micro-ondas sobre o bagaço durante o processo de irradiação no modo rotativo.

Empregando ácido sulfúrico (0,05 mol/L) com 20% e 40% de água em glicerol nos modos de operação estático e rotativo, obteve-se o dobro de CFT liberados no modo rotativo em relação ao modo estático. Já nas concentrações de 0,07 mol/L e 0,1 mol/L em glicerol puro, não se observou grande variação nos CFT após os pré-tratamentos. Esta informação é importante na medida que no caso de se promover o aumento de escala do processo proposto, os custos para neutralização dos efluentes serão menores se usarmos concentrações mais diluídas de ácido sulfúrico.

Um aspecto muito importante é que com as concentrações de ácido sulfúrico apresentadas na Tabela 6 e com irradiação de micro-ondas no modo estático ocorreu a total liquefação do bagaço, impedindo a realização da hidrólise enzimática. Neste momento, não se sabe exatamente a composição química deste material liquefeito, e o teor de ART presente nesta solução não ultrapassou 58 mg/g de bagaço empregando 0,10 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Após a constatação do aumento no rendimento dos ART pela ação enzimática sobre bagaço irradiado com irradiação de micro-ondas em modo rotativo, foram realizados novos testes variando o teor de água nas soluções de 0,05 mol/L de NaOH em glicerol.

A tendência observada para a liberação dos compostos fenólicos totais após os pré-tratamentos em meio alcalino (Figura 16) se assemelha à observada após os pré-tratamentos em meio ácido, nos quais o aumento da quantidade de água no meio reacional diminui os CFT liberados.

Liu e outros (2010) sugerem que ao usar glicerol em meio ácido como pré-tratamento da madeira, ocorre o aumento da porosidade da fibra, facilitando a liberação de açúcares redutores na hidrólise enzimática e um possível aumento do rendimento em até 50%. No presente trabalho, observou-se um aumento de 185% ao comparar o tratamento com glicerol em ácido sulfúrico (0,07 mol/L em modo rotativo) com o bagaço *in natura*, após a hidrólise enzimática.

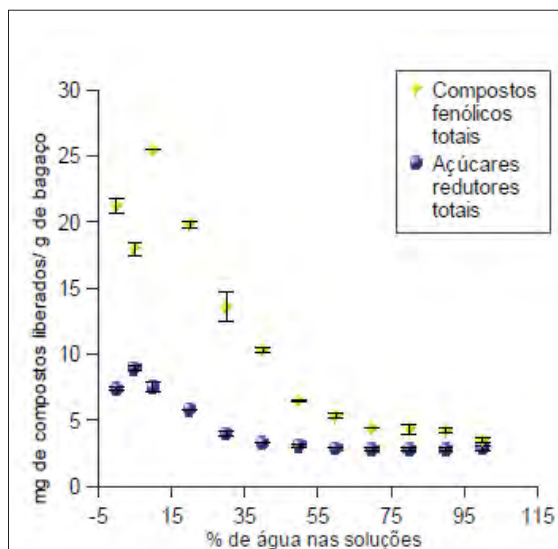


Figura 16: Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas com rotação, NaOH 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.

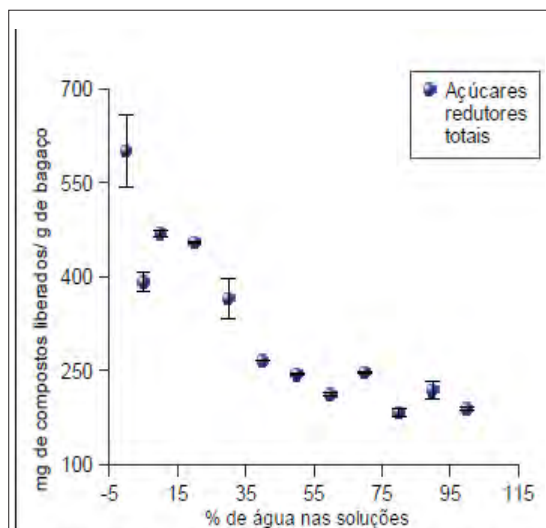


Figura 17: Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas com rotação, NaOH 0,05M, glicerol e diferentes % de água como solução.

Aparentemente a diminuição da temperatura do sistema devido à maior quantidade de água no meio é a causa da diminuição dos CFT liberados da fibra vegetal. A maior liberação de ART, após a hidrólise enzimática, pode estar relacionada com a formação de poros na fibra pelo pré-tratamento com  $H_2SO_4$ /Glicerol/ micro-ondas, o que facilita o ataque das enzimas.

Outra possibilidade a ser considerada é o fato do glicerol estar interferindo diretamente no pré-tratamento devido as possíveis ligações formadas entre o solvente e a biomassa, que podem facilitar o intumescimento e o rompimento da fibra.

Ao rotacionar o bagaço no forno de micro-ondas, a distribuição da irradiação das ondas eletromagnéticas é mais homogênea, dissipando melhor o calor gerado dentro do balão de vidro e facilitando a interação entre o glicerol e a fibra por ligações de hidrogênio.



### 6.3.7 Pré-tratamento do bagaço utilizando água e glicerol associados à irradiação de micro-ondas em modo rotativo.

Após observar (Tabela 6) maiores liberações de ART pela hidrólise enzimática com a irradiação de micro-ondas das amostras no modo rotativo, realizou-se pré-tratamentos do bagaço em soluções contendo somente glicerol e água, já que Demirbas (2008) relata bons resultados empregando somente glicerol como pré-tratamento de madeira. O outro fator que incentivou o teste destas condições de pré-tratamento é a possibilidade de reduzir o uso de compostos químicos corrosivos, como ácidos e álcalis. Assim, neste pré-tratamento a questão foi determinar a melhor quantidade de glicerol presente no meio visando o rompimento da estrutura lignocelulósica.

Ao analisar os resultados da Tabela 7, constatou-se o aumento de aproximadamente 52% de ART, após a hidrólise enzimática, em relação aos bagaços pré-tratados com glicerol puro nos modos rotativo e estático.

**Tabela 7:** Comparação entre pré-tratamentos com glicerol e água (0, 5 e 10%) e irradiados por micro-ondas nos modos estático e rotativo.

MO	Teor de água em %	Após pré-tratamentos		Após hidrólise enzimática
		CFT mg/g de bagaço	ART mg/g de bagaço	ART mg/g de bagaço
<i>In natura</i>	*	*	*	216 ± 6
-	0	9,6 ± 0,6	2,7 ± 0,4	247 ± 7
+	0	21,1 ± 0,9	6,3 ± 0,1	376 ± 27
-	5	13,1 ± 0,2	3,8 ± 0,1	298 ± 5
+	5	16,5 ± 2,2	6,5 ± 0,1	347 ± 5
-	10	7,7 ± 0,2	2,5 ± 0,1	185 ± 13
+	10	16,5 ± 0,4	6,3 ± 0,1	294 ± 7

\* O bagaço *in natura* não foi submetido à irradiação de M.O. e os valores de CFT e ART não foram detectados antes da hidrólise enzimática; + Irradiação de micro-ondas no modo rotativo; - Irradiação de micro-ondas no modo estático.

Após constatar que os melhores resultados em termos de ART liberados foram obtidos com o modo rotativo, repetiu-se os experimentos variando o teor de água de 0 a 100% em relação ao glicerol.

A mesma tendência de diminuição dos CFT liberados após o pré-tratamento, com a diminuição do teor de glicerol foi observada nestas condições, enquanto os teores de ART liberados após o pré-tratamento mostraram-se quase constantes com o aumento do teor de água na solução (Figura 18).

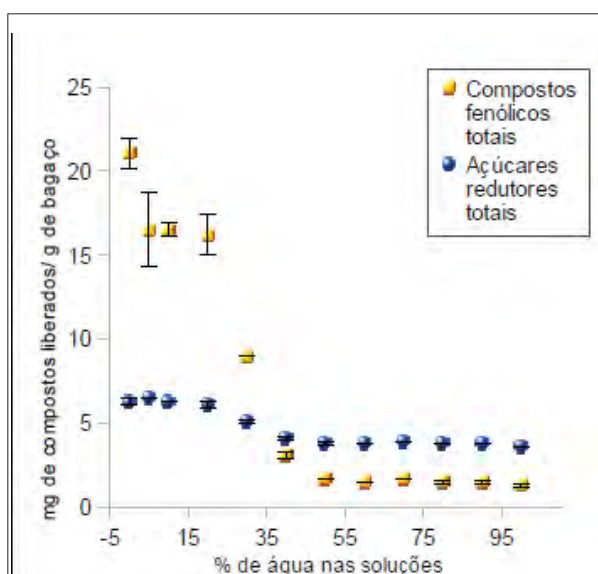


Figura 18: Compostos fenólicos totais e açúcares redutores totais liberados após o pré-tratamento com micro-ondas com rotação, glicerol e diferentes % de água como solução.

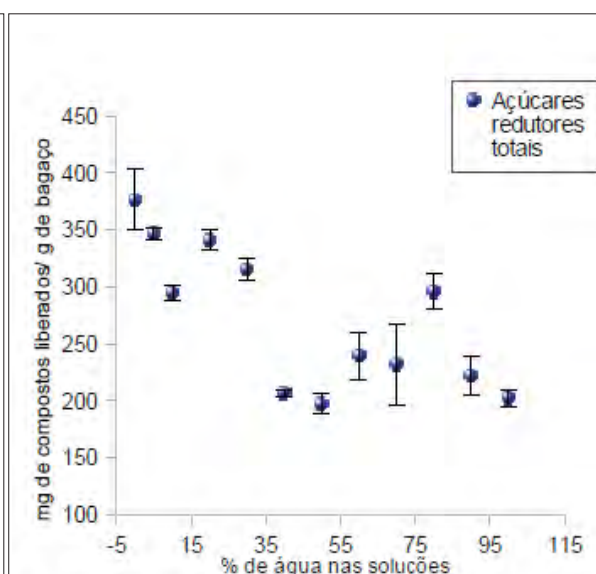


Figura 19: Açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática das soluções pré-tratadas com micro-ondas com rotação, glicerol e diferentes % de água como solução.

Os teores de ART liberados após a hidrólise enzimática apresentam uma pequena correlação linear de diminuição com o aumento do teor de água, dificultando o estabelecimento conclusivo da influência do teor de água no meio reacional (Figura 19).

### 6.3.8 Determinação de açúcares por cromatografia líquida com detecção por amperometria pulsada.

Os hidrolisados foram obtidos a partir da ação enzimática do complexo Powercell® sobre o bagaço de cana de açúcar *in natura* e também tratado em



diferentes condições. O líquido resultante deste processo de hidrólise foi submetido à centrifugação seguido de filtração em membrana (0.22  $\mu\text{m}$ ) para a remoção de resíduos sólidos e encaminhado para a determinação de açúcares redutores totais através do método de DNS. As amostras hidrolisadas com os teores de ART mais elevados foram encaminhadas para análise cromatográfica. Na Tabela 8 encontram-se os tempos de retenção dos padrões de açúcares encontrados nas amostras.

**Tabela 8:** Tempo de retenção dos padrões de carboidratos nos hidrolisados.

Açúcares analisados	Tempo de Retenção (min)
Glicose	6,7
Arabinose	5,2
Galactose	6,1
Xilose	8,0
Xilobiose	25,8
Celobiose	26,3

As análises foram realizadas em triplicata e dois cromatogramas de hidrolisados são apresentados a título de exemplo nas figuras 20 e 21, os quais são resultado da hidrólise de bagaços pré-tratados com 100% glicerol nos modos estático e rotativo, respectivamente. No bagaço pré-tratado com glicerol em modo estático do balão houve uma maior quantidade de glicose liberada (60,5  $\mu\text{g/mL}$ ) do que a obtida no modo rotativo (44,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

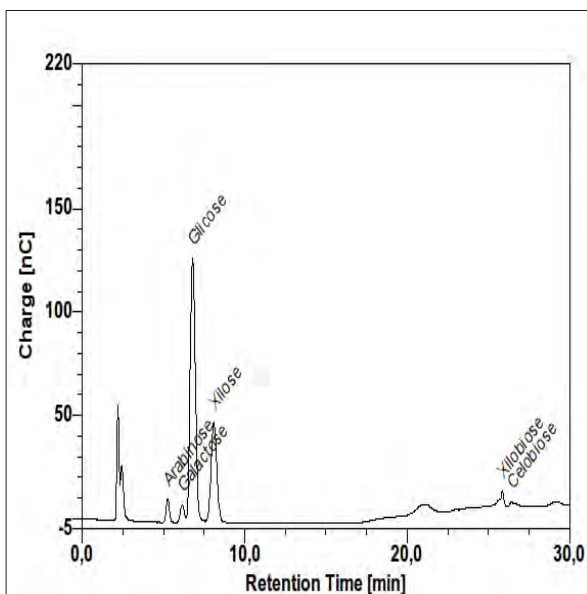


Figura 20: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 100% glicerol após hidrólise enzimática, com o balão em modo estático no forno de micro-ondas

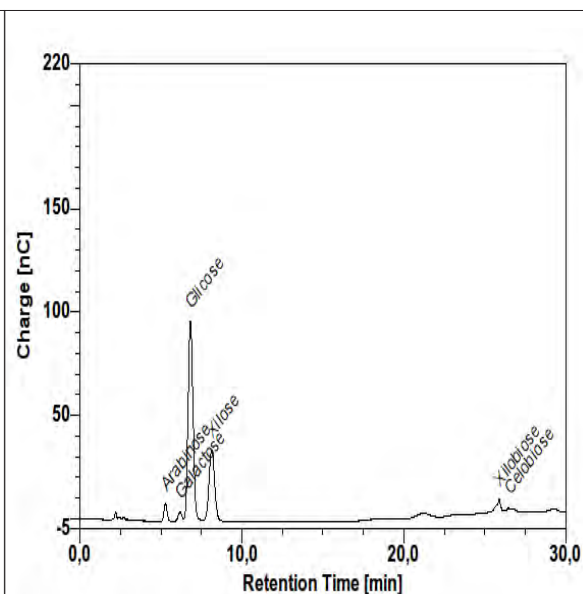


Figura 21: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 100% glicerol após hidrólise enzimática, com o balão em modo rotativo no forno de micro-ondas.

Entre os bagaços pré-tratados com ácido sulfúrico (figuras 22 e 23), o de concentração mais baixa (0,01 mol/L) apresentou o maior teor de glicose (79,9  $\mu\text{g/mL}$ ) e xilose (4,6  $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto que com o bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico 0,05 mol/L foi obtido 67,1  $\mu\text{g/mL}$  de glicose e não apresentou xilose. De acordo com os resultados, o meio ácido juntamente a irradiação de micro-ondas potencializou o rompimento da fibra favorecendo o ataque enzimático no processo de hidrólise, liberando maiores quantidades de açúcares. O bagaço pré-tratado com ácido sulfúrico liberou 79,9  $\mu\text{g/mL}$  de glicose e o bagaço pré-tratado somente com glicerol liberou 60,5  $\mu\text{g/mL}$  deste açúcar.

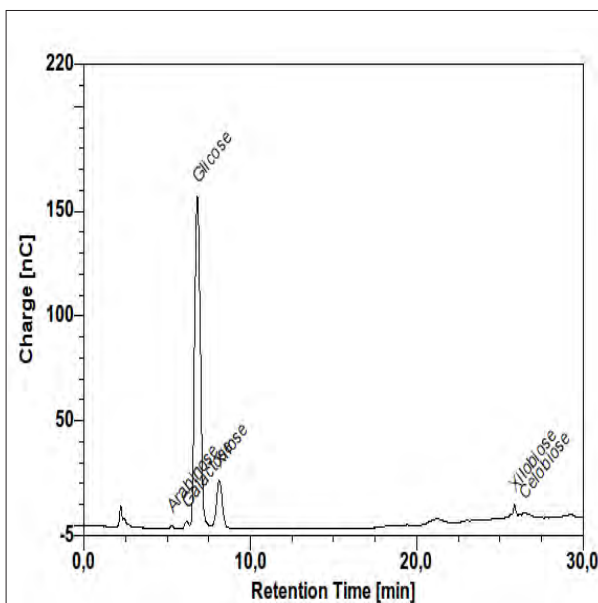


Figura 22: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,01 mol/L de  $H_2SO_4$  em 100% glicerol após hidrólise enzimática, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.

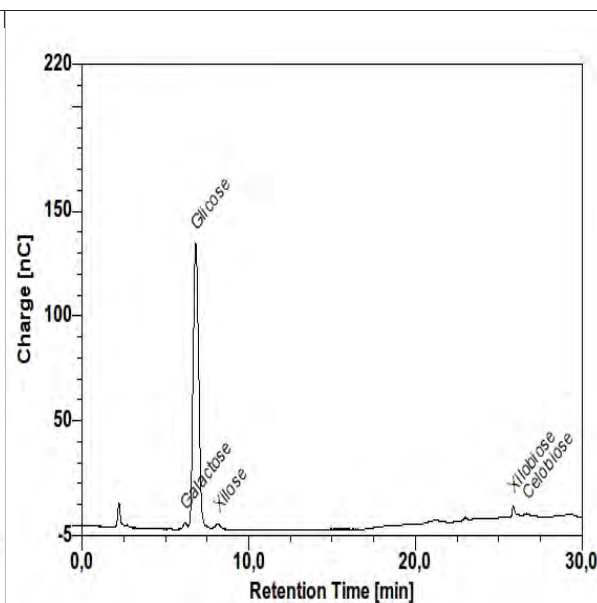


Figura 23: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05 mol/L de  $H_2SO_4$  em 100% glicerol após hidrólise enzimática, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.

Tratamentos em meio alcalino, geralmente utilizados em processos de deslignificação (ADSUL et al., 2005), resultaram na liberação de 63,5  $\mu\text{g/mL}$  de glicose e 12,0  $\mu\text{g/mL}$  de xilose na concentração de 0,05 mol/L de NaOH em glicerol puro (Figura 24). No pré-tratamento com 0,05 mol/L de NaOH com 5% de água em glicerol, houve liberação de 54,1  $\mu\text{g/mL}$  de glicose e 12,8  $\mu\text{g/mL}$  de xilose (Figura 25). Provavelmente houve o rompimento e a liberação da lignina para o meio e uma hidrólise parcial da hemicelulose. É importante ressaltar que o pré-tratamento em meio alcalino não mostrou resultados muito diferentes dos pré-tratamentos com glicerol puro (Tabela 9).

**Tabela 9:** Açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática de bagaço ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Hidrolisado	Gli.	Ara.	Gala.	Xilo.	Xilob.	Celo.	$\Sigma^*$	ART
glicerol puro (-)	60,5	2,3	0,5	16,3	1,5	0,5	81,6	247 $\pm$ 7
glicerol puro (+)	44,5	1,7	0,2	10,1	0,3	0,3	57,1	376 $\pm$ 26
0,05 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0% água (-)	67,1	-	0,1	-	-	0,2	67,4	362 $\pm$ 6
0,01 M $\text{H}_2\text{SO}_4$ 0% água (-)	79,9	0,1	0,1	4,6	-	0,3	85,0	485 $\pm$ 12
0,05 M NaOH 0% de água (+)	63,5	1,4	-	12,0	3,9	0,4	81,2	601 $\pm$ 58
0,05 M NaOH 5% de água (+)	54,1	2,1	-	12,8	8,7	0,4	78,1	392 $\pm$ 15

(-) modo estático; (+) modo rotativo; Gli. - Glicose; Ara. - Arabinose; Gala. - Galactose; Xilo. - Xilose; Xilob. - Xilobiose; Celo. - Celobiose;  $\Sigma^*$  - Soma dos açúcares (HPLC); ART – Açúcares Redutores Totais detectados por DNS;

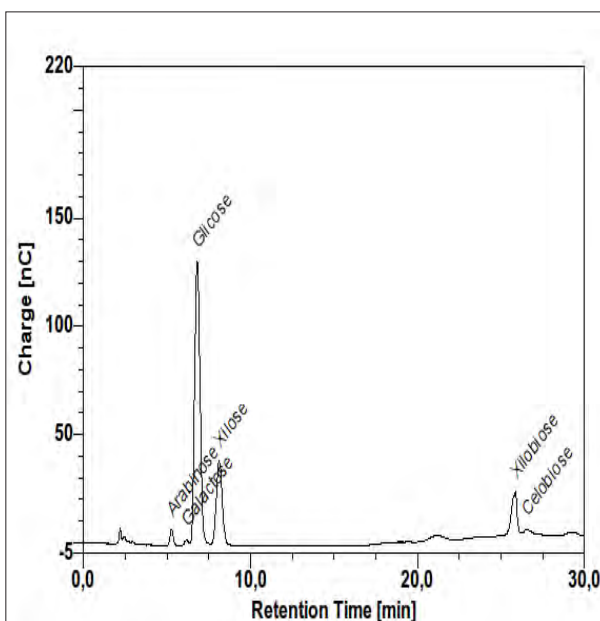


Figura 24: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05mol/L de NaOH com 0% em água em glicerol, com rotação do balão no forno de micro-ondas.

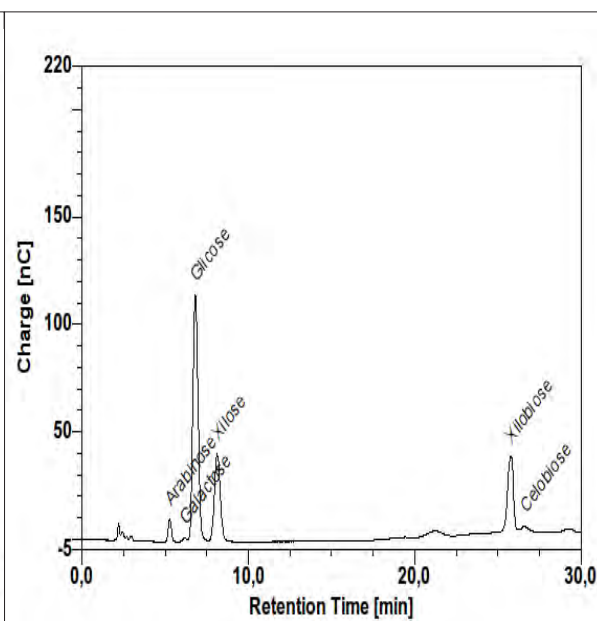


Figura 25: Perfil cromatográfico do bagaço pré-tratado com 0,05mol/L de NaOH com 5% de água em glicerol, com rotação do balão no forno de micro-ondas.

### 6.3.9 Caracterização térmica do bagaço por DSC

A caracterização das amostras de bagaço por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) não apresentou resultados que possam ser conclusivos no momento.

De acordo com Ju e outros (2011), os termogramas de reações endotérmicas demonstram a desintegração de interações intramolecular e a decomposição do polímero vegetal. O autor cita ainda a possível variação na organização do complexo celulose-hemicelulose em diferentes proporções dependendo do pré-tratamento.

Dentre os pré-tratamentos, o realizado com 0,01 mol/L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em glicerol puro apresentou o menor valor de temperatura “onset” (191,9°C), que corresponde a um aumento de 7 % do valor encontrado com o bagaço *in natura*. Já no pré-tratamento com 0,05 M de NaOH em 5% água em glicerol foi observado a maior temperatura “onset” (222,3°C), ou seja, 68% acima do valor encontrado no bagaço *in natura* (Tabela 10). A mudança da temperatura “onset” provavelmente foi ocasionada pela alteração do calor específico da amostra, visto que os pré-tratamentos alteraram sua composição.

**Tabela 10:** Valores encontrados após a análise de DSC para bagaços pré-tratados.

Amostra	Onset °C	Endset °C	ΔH J/g
<i>In natura</i>	179,3	185,5	174,5
100% glicerol com rotação	201,1	205,6	47,4
0,01 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> glicerol puro	191,9	196,2	93,5
0,05 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> glicerol puro	210,8	216,7	53,8
0,05 M NaOH 5% água em glicerol	222,3	226,0	21,2

Pode-se observar que ocorreu a diminuição da variação de entalpia (ΔH) dos bagaços pré-tratados ao compará-los com o *in natura*, indicando uma provável exposição dos carboidratos após os pré-tratamentos. Entre os bagaços pré-tratados, observa-se que o tratado com NaOH 0,05 mol/L com 5% de água em glicerol foi o que apresentou a menor variação de entalpia, sugerindo a maior desestruturação do carboidrato após o pré-tratamento. Entre as concentrações dos meios ácidos, a de 0,05 mol/L foi a que apresentou o menor valor de variação de entalpia.

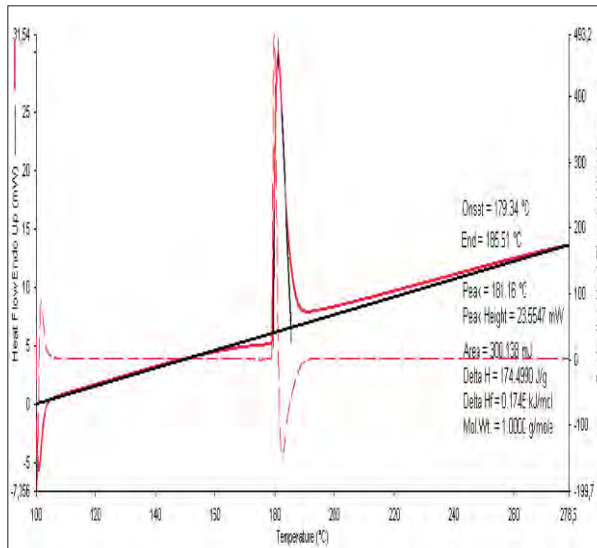


Figura 26: Termograma do bagaço não tratado.

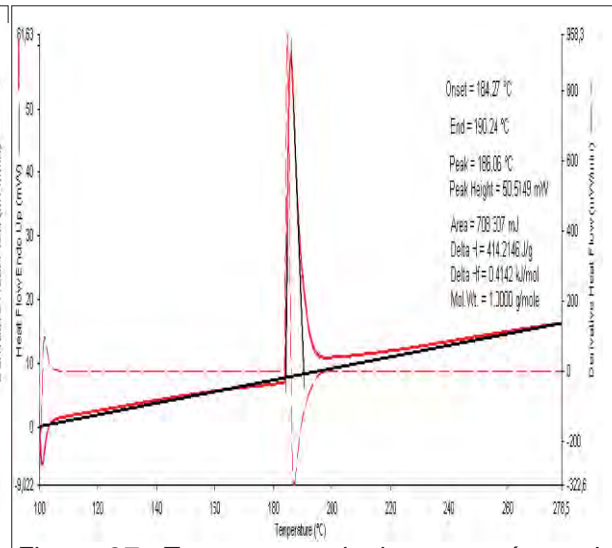


Figura 27: Termograma do bagaço pré-tratado com 100% glicerol, com o balão em rotação no forno de micro-ondas.

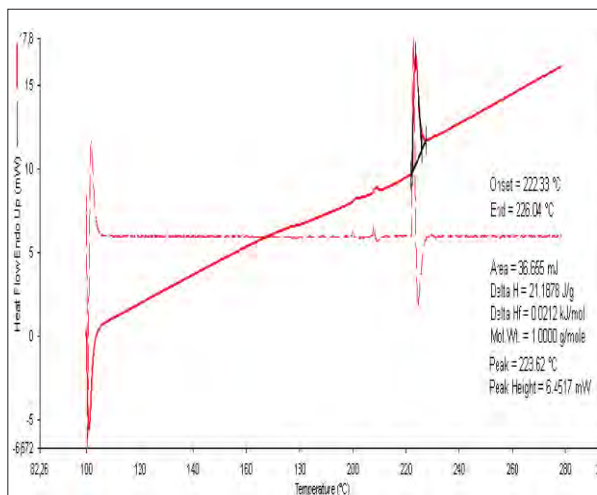


Figura 28: Termograma do bagaço pré-tratado com NaOH 0,05M com 5% de água em glicerol, com o balão em rotação no forno de micro-ondas.

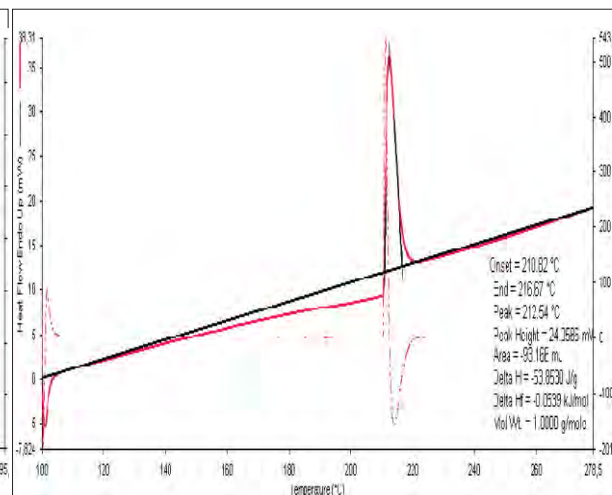


Figura 10: Termograma do bagaço pré-tratado com 0,05M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 100% glicerol, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.

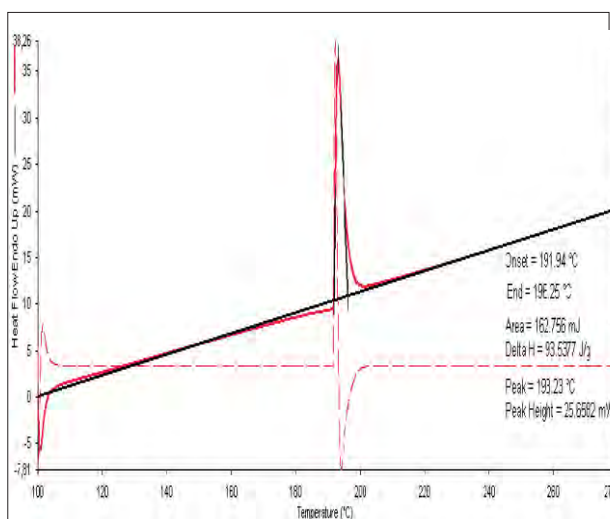


Figura 30: Termograma do bagaço pré-tratado com 0,01M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 100% glicerol, sem rotação do balão no forno de micro-ondas.

Nos termogramas apresentados pode-se observar picos endotérmicos que possivelmente estão relacionados com o rompimento de ligações intramoleculares e a ocorrência de mudanças físicas na estrutura do bagaço após os pré-tratamentos.

## 7. CONCLUSÃO

A granulometria do bagaço escolhida para a pesquisa impossibilitou o cálculo de variação de massa após os pré-tratamentos, pois ocorreram muitas perdas de material durante as etapas de lavagem, centrifugação e filtração. Para se avaliar o real impacto dos tratamentos sobre a solubilização da fibra do bagaço, de acordo com o observado, deve-se utilizar fibras com tamanho maior.

O tampão acetato é amplamente empregado na literatura como condicionador de pH para ação de enzimas lignocelulolíticas e apresentou os maiores valores de atividades enzimáticas, mas os melhores resultados foram obtidos com as reações promovidas em meio não tamponado (água destilada) em todos os tempos de hidrólise avaliados. Entre os tempos de hidrólise enzimática, verificou-se que houve variação de 71 % no teor de ART obtidos entre os tempos de 12 e 24 horas em meio aquoso e mantendo-se praticamente inalterado entre os tempos de 24 e 48 h, próximo a 216 mg de ART/ g de bagaço seco.

Com relação aos diferentes pré-tratamentos utilizados neste trabalho, pode-se concluir que os melhores resultados foram encontrados após a hidrólise enzimática em meio ácido (0,07 mol/L  $H_2SO_4$ ) em 100% glicerol com a rotação do balão dentro do forno de micro-ondas ( $617 \pm 24$  mg de ART/ g de bagaço). Em meio alcalino, o melhor resultado encontrado foi na ausência de água no meio reacional (0,05 mol/L NaOH) com a rotação do balão dentro do forno de micro-ondas ( $601 \pm 58$  mg de ART/ g de bagaço).

Através da análise cromatográfica, ficou claro que os pré-tratamentos realizados atacaram a estrutura lignocelulósica da fibra do bagaço, facilitando o ataque do complexo enzimático à celulose, o que pode ser constatado através da quantidade de glicose encontrada no hidrolisado.

Foi observado aumento dos CFT liberados em função do aumento da concentração de  $H_2SO_4$  empregado no pré-tratamento e possivelmente este comportamento está relacionado com a solubilização da lignina. Por outro lado, o aumento da concentração de  $H_2SO_4$  no meio reacional pode promover a solubilização de açúcares da hemicelulose e da celulose, diminuindo assim o rendimento de ART após a hidrólise enzimática. Nestas condições, torna-se muito evidente que bagaços submetidos a radiação por micro-ondas, em maiores teores



de água, tiveram suas estruturas celulares menos alteradas, mantendo assim sua recalcitrância.

Outro fator importante encontrado neste trabalho foi com relação à homogeneidade da irradiação de micro-ondas sobre as amostras. Concluiu-se que ao inserir um sistema de rotação no forno de micro-ondas, as amostras sofreram a irradiação de forma mais homogênea e obteve-se melhores resultados nestas condições. Esta informação é muito importante para se propor formas de irradiação do bagaço em processos de fluxo contínuo para processamento em grande escala. Acredita-se que o tratamento do bagaço por micro-ondas poderá ser empregado aproveitando o excesso de energia elétrica produzida na usina, oferecendo menores riscos operacionais que o tratamento por explosão a vapor.

Ao avaliar o grau de desestruturação do bagaço através da Análise Térmica Diferencial (DSC), pôde-se constatar variações nas temperaturas "onset" bem como na variação de entalpia que, neste momento, podem ser associadas ao rompimento de ligações nos bagaços pré-tratados ao compará-los com o bagaço *in natura*.

## 8. REFERÊNCIAS

ADSUL, M.G. et al. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carboh. Polym.**, v. 62, p. 6-10, 2005.

BADHAN, A. K. et al. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora sp.*IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504-510, 2007.

CARRILLO, F. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochem.**, v. 40, p. 3360, 2005.

CARVALHO, G. B. M. et al. Estudo do hidrolisado de eucalipto em diferentes concentrações utilizando evaporação a vácuo para fins fermentativos. **Revista Analytica**, dez./jan., n. 14, p. 54-57, 2005. a

CARVALHO, R. J. et al. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**. n. 18, ago./set. 2005. b

CULLINGFORD, H. S.; GEORGE, C. E.; LIGHTSEY, G. R. United State Patent, v. 5, p. 196, 1993.

DEMIRBAS, A. Liquefaction of Biomass Using Glycerol. **Energy Sources**, v. 30, pt A, p.1120–1126, 2008.

DEMIRBAS, A. Mechanisms of thermal degradation of wood in alkaline glycerol. **Energy Sources**, v. 31, pt A, p.1294–1299, 2009.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in waste water and soil treatment: a review. **Appl.**

**Catal.**, v. 28, p. 83-99, 2000.

EL-NASSER, N. H. A.; HELMY, S. M.; EL-GAMMAL, A. A. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with rot fungi. **Polym. Degrad. Stabil.** v. 55, p. 249-253, 1997.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y. H., Cellulose Hydrolysis. Biotechnology Monographs. **Springer**, Berlin, p. 57. 1987.

GAMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **J. Food. Eng.** v. 74, p. 78-88, 2006.

GÔMEZ, C.H.R.J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. **Univers. Estad. de Camp.**, 1985.

GONG, G.; LIU, D.; HUANG, Y. Microwave-assisted organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Biosystems engineering**, v. 107, p. 67-73, 2010.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Quim. Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

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

ITOH, H. et al. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 103, p. 273-280, 2003.

JU, Y. et al. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 591-599, 2011.

KARAM, J.; NICELL, J.A. Potential applications of enzymes waste treatment. **J.Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 69, p. 141, 1997.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 66, p. 10–26, 2004.

KLINKE, H. B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology.** v. 82, p. 15-26, 2002.

KOOTSTRA, A. M. J. et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal.** v.46, p. 126–131, 2009.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KÜCÜK, M. Delignification of biomass using alkaline glycerol. **Energy Sources**, v. 27, p. 1245-1255, 2005.

LAVARACK, B. P; GRIFFIN, G. J. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass Bioenergy.** v. 23, p. 367-80, 2002.

LIU, J. et al. Microwave-assisted pretreatment of recalcitrant softwood in aqueous glycerol. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9355–9360, 2010.

MARTÍN, C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 274–282, 2002.

MARTÍN, C. et al. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v 81, p. 1669–1677, 2006.

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

MESA, L. et al. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, 2011, No prelo.

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

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673–686, 2005.

OGEDA, T. L. ; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa, **Quim. Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

OJEDA, K. et al. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 270–279, 2011.

PAN, X. et al. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 4, may 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition, **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25–33, 2000.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. **Biores. Technol.**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Quím. Nova**, v. 16, p. 435-448, 1993.

QIAN, X. H. et al. A initio molecular dynamics simulations of beta-d-glucose and beta-d-xylose degradation mechanisms in acidic aqueous solution, **Carbohydr. Res.** v. 340, p. 2319–2327, 2005.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. **Quím. Nova.**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

REYES, J.; PERALTA-ZAMORA, P.; DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas, efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v. 2, 1998.

RIDIEL, 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.

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**. v. 35, p. 663 -670, 2011.

RODRIGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **J Food Eng.**, v. 61, p. 143, 2004.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, dez. 2009.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. **Quím. Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, **Quim. Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p. 27, 2009.

SANTOS, C.P. et al. Papel, como se fabrica? **Química Nova na Escola**. n. 14, nov 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.

SILVA, F. C.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Adaptação do forno de microondas doméstico para realização de reações de transesterificação sob refluxo e catálise por argilas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 376-380, 2006.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Quím. Nova**, v.32, n. 3, São Paulo, 2009.

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

SUN, F., CHENG, H. Evaluation of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by atmospheric glycerol autocatalysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 1039-1044, 2007.

SUN, F. B.; CHENG, H. Z. Comparison of atmospheric aqueous glycerol and steam explosion pretreatments of wheat straw for enhanced enzymatic hydrolysis. **J Chem**

**Technol Biotechnol.** v. 83, p. 707–704, 2008.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. **International Journal Molecular Sciences**, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAN, H. et al. Peroxide-acetic acid pretreatment to remove bagasse lignin prior to enzymatic hydrolysis. **Ind Eng Chem Res.**, v. 49, p. 1473, 2010.

TERAMOTO, Y.; LEE, S.; ENDO, T. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8856-8863, 2008.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1, 4- xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 52, p. 305- 317, 1988.

ZHANG, Y. H. P.; MICHAEL, E. H.; JONATHAN, R. M. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnol. Advan.**, v.24, p. 452-481, 2006.

ZHAO, X.; CHENG, K.; LIU, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 82, p. 815–827, 2009.

ZHU, S. et al. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Biosystems Engineering**, v. 94, p. 437-442, 2006. (a)

ZHU, S.D. et al. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. **Proc. Biochem.**, v. 41, p. 869-873, 2006. (b)

ZHU, S.D. et al. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. **Green Chem.**, v. 8, p. 325-327, 2006. (c)