

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE BAGAÇO DE CANA PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL POR MEIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

FELIPPE MARIANO COLOMBARI

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Mauricio Boscolo

São José do Rio Preto, SP

Abril de 2012

FELIPPE MARIANO COLOMBARI

TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE BAGAÇO DE CANA PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL POR MEIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberto da Silva

Professor Titular

UNESP - São José do Rio Preto

Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria de Lourdes T. P. Polizeli

Professor Associado

USP - FFCLRP - Ribeirão Preto

Profa. Dra. Eleni Gomes

Professor Assistente Doutor

UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 13 de abril de 2012

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a todos aqueles que tiveram uma participação extremamente importante em mais essa etapa que se realiza;

À minha família, Paulo (pai), Ceile (mãe), Rodrigo (irmão) e Larissa (irmã), pelo imenso apoio durante todo o tempo.

Aos amigos da República Quilombo, Guaraci Requena e Gisandro Carvalho e às grandes amigas, Juliana Galhardi, Luísa Campos, Renata Góes e Laís Bruzadin, pessoas que estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Sem vocês nada disso estaria acontecendo!

## **Agradecimentos**

Aos Profs. Drs. Roberto da Silva e Maurício Boscolo, orientador e co-orientador, respectivamente, pela oportunidade, pelas orientações e pela confiança.

CAPES e FAPESP, pelas bolsas e auxílios financeiros.

Ao Prof. Dr. João Cláudio Thoméo e à Prof. Dra. Eleni Gomes, pela valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica: Janaína Borges, Thiago Ohe e Amanda Jordano, especialmente àqueles que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho: Ticiane Magalhães, Viviane Shiota, Olavo Perrone e Amanda Panza.

**"Do rio que tudo arrasta se diz que é  
violento, mas ninguém diz violentas as  
margens que o comprimem."**

*Bertold Brecht*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose (CARVALHO et al., 2009).....	14
Figura 2. Representação esquemática de uma molécula de xilana e as respectivas ações das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanasas; 2 - $\alpha$ -L-arabionofuranosidasas; 3 – glucuronidasas; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases; 6- $\beta$ -xilosidasas (Chávez et al., 2006).....	15
Figura 3. Reações envolvidas na sonólise da água (TEZCANLI-GÜYER, 2004). .....	17
Figura 4. Reações de sonólise do oxigênio (a) e do ozônio (b) (TEZCANLI-GÜYER, 2004). .....	17
Figura 5. Esquema de ataque às ligações duplas de ligninas pelo ozônio (NASCIMENTO et al., 1998). .....	18
Figura 6. Liberação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise do bagaço. ....	34
Figura 7. Efeito da variação dos níveis de cada variável empregada no planejamento fatorial sobre o teor de ART após hidrólise enzimática para os tratamentos envolvendo ultrassom. ....	37
Figura 8. Quantificação dos efeitos principais e de interação sobre o teor de ART após a hidrólise enzimática do bagaço nos tratamentos do bagaço utilizando ultrassom. ....	38
Figura 9. Efeito da variação dos níveis de cada variável empregada no planejamento fatorial sobre o teor de ART após hidrólise enzimática para os tratamentos envolvendo micro-ondas. ....	40
Figura 10. Quantificação dos efeitos principais e de interação sobre o teor de ART após a hidrólise enzimática do bagaço nos tratamentos do bagaço utilizando micro-ondas. ....	40
Figura 11. Termogramas do bagaço <i>in natura</i> e dos padrões CMC, avicel, xilana e lignina. ....	42
Figura 12. Relação do $\Delta H_{deg}$ com CFT solubilizado após os pré-tratamentos (A) e ART liberados após hidrólise enzimática (B) para as amostras de bagaço de cana tratados com US nas condições descritas na Tabela 11. Quadrados preenchidos representam amostras tratadas em meio ácido enquanto quadrados vazios representam amostras tratadas em meio alcalino. ....	45
Figura 13. Relação entre $\Delta H_{deg}$ , ART após hidrólise enzimática e CFT das amostras de bagaço de cana pré-tratado conforme planejamento fatorial empregado para o US. ....	46
Figura 14. Relação do $\Delta H_{deg}$ com CFT solubilizado após os pré-tratamentos (A) e ART liberados após hidrólise enzimática (B) para as amostras de bagaço de cana tratados com MO nas condições descritas na Tabela 11. Quadrados preenchidos representam amostras tratadas em meio ácido enquanto quadrados vazios representam amostras tratadas em meio alcalino. ....	47
Figura 15. Relação entre $\Delta H_{deg}$ , ART após hidrólise enzimática e CFT das amostras de bagaço de cana pré-tratado conforme planejamento fatorial empregado para o MO. ....	48
Figura 16. Comparação dos espectros de FTIR-ATR do bagaço <i>in natura</i> (linhas escuras) e bagaços pré-tratados (linhas claras): (A) $H_2SO_4$ 0.1 M e US por 5 minutos; (B) $H_2SO_4$ 0.1 M, $O_3$ e US por 5 minutos; (C) $H_2SO_4$ 0.1 M e US 10 por minutos; (D) $H_2SO_4$ 0.1 M, $O_3$ e US .....	49
Figura 17. Comparação dos espectros de FTIR-ATR do bagaço <i>in natura</i> (linhas escuras) e bagaços pré-tratados (linhas claras): (A) $H_2SO_4$ 0.1 M, $O_3$ e MO por 2 minutos; (B) $H_2SO_4$ 0.1 M, $O_3$ e MO por 4 minutos. ....	51

Figura 18. Comparação entre os espectros obtidos por FTIR-ATR do bagaço in natura, representado pela linha escura, e (A) bagaço tratado com NaOH 0,1 M e 2 min. de MO; (B) bagaço tratado com NaOH 0,1 M e 4 min. de MO, representados pelas linhas claras. ....	52
Figura 19. Comparação entre os teores dos açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática das frações celulósicas (GLI e CEL) e hemicelulósicas (ARA, GAL e XIL) do bagaço em função de cada pré-tratamento. ....	54
Figura 20. Comparação do teor de AR obtidos pelo método colorimétrico (DNS) e cromatográfico (HPLC-PAD).....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bandas de absorção observadas em materiais lignocelulósicos.....	22
Tabela 2. Variáveis e respectivos níveis empregados nos experimentos com ultrassom 22 kHz (US). .....	25
Tabela 3. Variáveis e respectivos níveis empregados nos experimentos com micro-ondas 2,45 GHz (MO).....	25
Tabela 4. Teores de CFT e ART solubilizados a partir dos pré-tratamentos com ultrassom.....	31
Tabela 5. Teores de CFT e ART solubilizados a partir dos pré-tratamentos com micro-ondas. ....	32
Tabela 6. Resumo das atividades enzimáticas do extrato utilizado na hidrólise do bagaço. ....	33
Tabela 7. Carga enzimática empregada na hidrólise enzimática do bagaço de cana após os pré-tratamentos. ....	35
Tabela 8. Liberação de ART por hidrólise enzimática do bagaço submetido previamente aos tratamentos envolvendo ultrassom. ....	36
Tabela 9. Liberação de ART por hidrólise enzimática do bagaço submetido previamente aos tratamentos envolvendo micro-ondas.....	39
Tabela 10. $T_{onset}$ e $\Delta H_{deg}$ do bagaço <i>in natura</i> , CMC, xilana, avicel e lignina.....	42
Tabela 11. Valores de $T_{onset}$ e $\Delta H_{deg}$ do bagaço pré-tratado.....	44
Tabela 12. Tempo de retenção dos sacarídeos quantificados por HPLC-PAD.....	53
Tabela 13. Teores de arabinose, celobiose, galactose, glicose e xilose quantificados por HPLC-PAD. ....	53



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta H_{deg}$	Variação de entalpia de degradação
AR	Açúcares redutores
ARA	Arabinose
ART	Açúcares Redutores Totais
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
Avicel	Celulose Microcristalina
CEL	Celobiose
CFT	Compostos Fenólicos Totais
CMC	Carboximetilcelulose
DNS	Ácido 3,5-Dinitrosalicílico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
FTIR – ATR	Espectrofotometria no infravermelho por Transformada de Fourier – Reflectância total atenuada
GAL	Galactose
GLI	Glicose
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa – Espectrometria de massas
HPLC-PAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Detecção por amperimetria pulsada
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MO	Micro-ondas
PF	Papel Filtro
pNP	p-nitrofenol
pNPG	p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo
pNPX	p-nitrofenil- $\beta$ -D-xilanopiranosídeo
TG	Termogravimetria
UFP/g	Unidades de papel de filtro por grama de substrato
US	Ultra-som
UV-VIS	Ultravioleta-visível
XIL	Xilose

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
2.1. MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	13
2.2. PRÉ-TRATAMENTOS DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO .....	16
2.2.1. Irradiação de micro-ondas.....	16
2.2.2. Irradiação de ultrassom .....	16
2.2.3. Utilização de ozônio.....	18
2.2.4. Efeitos da utilização de ácidos ou bases .....	19
2.3. ANÁLISE ESTRUTURAL DO BAGAÇO .....	20
2.3.1. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	20
2.3.2. Espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR).....	22
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. AQUISIÇÃO DO BAGAÇO .....	24
4.2. GERAÇÃO DE OZÔNIO .....	24
4.3. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	24
4.4. PREPARO DO BAGAÇO E APLICAÇÃO DE OZÔNIO .....	25
4.5. APLICAÇÃO DE MICRO-ONDAS OU ULTRASSOM .....	26
4.6. PROCESSAMENTO DO BAGAÇO APÓS OS PRÉ-TRATAMENTOS .....	26
4.7. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	26
4.8. METODOLOGIA ANALÍTICA .....	27
4.8.1. Determinação de compostos fenólicos totais por Espectrofotometria de UV-VIS.....	27
4.8.2. Determinação de açúcares redutores totais por Espectrofotometria de UV-VIS.....	27
4.8.3. Atividades enzimáticas .....	28
4.8.4. Análise térmica do bagaço de cana por calorimetria exploratória diferencial: DSC.....	29
4.8.5. Análise do bagaço de cana por espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada: FTIR-ATR .....	30
4.8.6. Determinação dos açúcares liberados pela ação enzimática do bagaço por HPLC-PAD .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
5.1. COMPOSTOS FENÓLICOS E AÇÚCARES REDUTORES SOLUBILIZADOS PELOS PRÉ-TRATAMENTOS .....	31
5.2. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS .....	33

5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	34
5.3.1. <i>Determinação do tempo ótimo de hidrólise</i> .....	34
5.3.2. <i>Hidrólise do bagaço pré-tratado</i> .....	34
5.4. ANÁLISE TÉRMICA POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL: DSC .....	41
5.4.1. <i>Comparação dos valores de <math>\Delta H_{deg}</math> e <math>T_{onset}</math> dos padrões Avicel, CMC, Xilana e Lignina e do bagaço in natura.</i> .....	41
5.4.2. <i>Determinação de <math>\Delta H_{deg}</math> e <math>T_{onset}</math> do bagaço de cana pré-tratado</i> .....	43
5.5. ANÁLISE DO BAGAÇO DE CANA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO INFRAVERMELHO POR REFLECTÂNCIA TOTAL ATENUADA (FTIR-ATR) .....	48
5.6. QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE, XILOSE, CELOBIOSE, ARABINOSE E GALACTOSE POR HPLC-PAD .....	52
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>

## RESUMO

O material lignocelulósico do qual o bagaço é formado contém principalmente açúcares polimerizados na forma de celulose e hemiceluloses, e compostos fenólicos polimerizados na forma de lignina. Tais polímeros podem ser hidrolisados via química e/ou enzimática, dando origem a, entre outros compostos, açúcares fermentescíveis. O objetivo desse trabalho foi investigar alguns tratamentos físico-químicos aplicados ao bagaço de cana de açúcar que favoreçam o aumento da liberação de açúcares fermentescíveis por hidrólise enzimática, com a mínima produção possível de compostos inibidores da fermentação alcoólica.

Diferentes condições de pré-tratamento foram testadas, como utilização de  $H_2SO_4$  ou NaOH em diferentes concentrações, concomitantemente com a utilização de tratamentos combinados de ozônio, ultrassom e micro-ondas. Os resultados mostraram que tais processos promoveram certa desestruturação do complexo lignocelulósico da parede celular do bagaço, a qual foi relacionada com a concentração de compostos fenólicos e açúcares redutores. O bagaço pré-tratado foi então submetido à ação de enzimas celulolíticas e o teor de açúcares redutores totais formados foi analisado. As condições nas quais maiores quantidades destes açúcares foram liberados foram:  $H_2SO_4$  0,1 M, irradiado por ultrassom durante 5 minutos ( $81,7 \pm 0,2$  mg de glicose por grama de bagaço) e  $H_2SO_4$  0,1 M saturado com ozônio, irradiado por micro-ondas por 4 minutos ( $86,0 \pm 0,2$  mg de glicose por grama de bagaço), que representam um ganho significativo frente aos  $6,8 \pm 0,2$  mg de glicose por grama de bagaço não tratado.

As análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e por Espectrofotometria no Infravermelho (FTIR-ATR) possibilitaram comparar as modificações no sistema estrutural da parede após os tratamentos, indicando que pré-tratamentos que utilizaram irradiação de ultrassom foram efetivos na desestruturação da hemicelulose e na diminuição na cristalinidade da celulose enquanto pré-tratamentos que utilizaram irradiação de micro-ondas foram mais efetivos na remoção de lignina e hemicelulose. Os resultados da análise por HPLC-PAD mostraram que os tratamentos com ultrassom apresentaram maiores teores de glicose após hidrólise enzimática em relação aos tratamentos com micro-ondas, devido à capacidade de diminuir a cristalinidade da celulose, gerando frações amorfas na qual atuaram as endoglucanases.

Palavras-chave: Etanol celulósico, Bioenergia, Hidrólise enzimática, Bagaço de cana

## ABSTRACT

The lignocellulosic material of which the sugarcane bagasse is made contains, mainly, polymerized sugars as cellulose and hemicelluloses and polymerized phenolic compounds as lignin. These polysaccharides can be hydrolyzed chemically or enzymatically, giving rise to, among other compounds, fermentable sugars. The aim of this work is to investigate some physicochemical treatments applied to the sugarcane bagasse that favors the release of the maximum amount of fermentable sugars by enzymatic hydrolysis, with a minimal production of alcoholic fermentation inhibitor compounds.

Different pre-treatment conditions were tested as different concentrations of sulfuric acid or sodium hydroxide concomitantly with the combined treatments of ozone, ultrasound and microwaves. Results showed that such processes promoted certain disruption of lignocellulosic complex of the bagasse cell wall, which was related to the concentration of phenolic compounds and reducing sugars. Then, the bagasse was subjected to the action of cellulolytic enzymes and the reducing sugars content was quantified. The conditions in which the maximum amount of these sugars were released were: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M, irradiated by ultrasound for 5 minutes (81.7 ± 0,2 mg/g bagasse) and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M irradiated by microwaves for 4 minutes (86.0 ± 0,2 mg/g bagasse), that represents a significant gain compared to untreated bagasse.

Structural analysis by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Fourier-Transform Infrared Spectrophotometry Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR) analysis allowed comparing the structural modifications in the wall after the pretreatments, indicating that ultrasound pretreatments were effective for hemicelluloses destructure and decrease in the cellulose crystallinity index while microwave pretreatments were more effective on lignin and hemicelluloses removal.

HPLC-PAD results showed that ultrasound pretreatments could release higher glucose amounts after enzymatic hydrolysis comparing to microwave pretreatments due to its capacity of decrease the cellulose crystallinity index, giving rise to amorphous regions where endoglucanases could act.

Keywords: Cellulosic ethanol, bioenergy, enzymatic hydrolysis, sugarcane bagasse.

## 1. INTRODUÇÃO

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico fibroso que contém 32-50% de celulose e 19-25% de hemicelulose, embebidos em uma matriz de lignina correspondente a 23-32% da fibra.

A sacarificação enzimática da celulose cristalina por fungos e bactérias requer a ação de enzimas altamente específicas que atuam sinergicamente, cujo produto final é, principalmente, a glicose. Existem três grupos principais de celulases: as endoglucanases (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolase ou EC 3.2.1.4), que atacam ao acaso regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose no interior da molécula, hidrolisando as ligações  $\beta$  (1-4) acessíveis no interior da molécula e geram novas terminações de cadeia, onde as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucana celobiodehidrolases ou EC 3.2.1.91), degradam a molécula resultante da ação da endoglucanase pela remoção de unidades de glicose ou celobiose; as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose liberando glicose e com isso impedem a inibição da ação das exoglucanases. As ações combinadas das endo e exoglucanases modificam a superfície (topografia) da fibra de celulose acelerando a velocidade de hidrólise por facilitar o acesso das enzimas aos seus substratos.

A obtenção do etanol celulósico inclui as seguintes atividades: hidrólise química/enzimática; caracterização química do hidrolisado; seleção de micro-organismos degradadores/fermentadores de fibras lignocelulósicas; monitoramento/modelamento/controle das condições do processo fermentativo e projeto/construção de biorreatores. Tais etapas são muito importantes, mas quando realizados isoladamente conduzem a resultados dispersos e não conclusivos sobre a produção comercial de etanol celulósico, visto que também se entende que um processo será avaliado como economicamente viável se além de bom rendimento, houver uma redução significativa de tempo e consumo de energia.

O entendimento e domínio dos parâmetros físico-químicos e biológicos envolvidos na produção de açúcares fermentescíveis e não fermentescíveis, além da formação de compostos inibidores da ação microbiológica fermentativa, são fundamentais para o sucesso do etanol celulósico. A sacarificação enzimática do material lignocelulósico pode ser associada a diferentes pré-tratamentos físico-químicos como, por exemplo, micro-ondas, ultrassom, ozônio combinados com modificações no pH para se conseguir uma desestruturação do complexo celulose/lignina/hemicelulose da parede celular vegetal e com isso, facilitar o acesso das

enzimas às fibras. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo investigar alguns tratamentos químicos combinados com a utilização de ozônio, ultrassom e micro-ondas visando à desestruturação do complexo lignina/celulose/hemicelulose a fim de potencializar a ação de enzimas despolimerizantes de fibras lignocelulósicas no processo de produção de etanol celulósico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Material Lignocelulósico

Materiais lignocelulósicos são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa (BADHAN et al., 2007 apud SANTOS; GOUVEIA, 2009). O bagaço de cana-de-açúcar é um material fibroso lignocelulósico que contém 32-50% de celulose, 19-25% de hemicelulose embebidos em numa matriz de lignina correspondente a 23-32% da fibra (PANDEY et al., 2000).

A celulose é um homopolissacarídeo linear que consiste de unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$  (1-4) cujo tamanho é determinado pelo grau de polimerização (DP) que varia de 100 a 20.000 DP (RAMOS, 2003; CAMPBELL, 2000). As cadeias de celulose formam as fibrilas elementares, caracterizadas por duas regiões distintas, a cristalina, de configuração mais ordenada formada por cadeias de celulose unidas por ligações de hidrogênio e força de van der Waals, e a amorfa, menos ordenada e mais susceptível à hidrólise (GOMEZ, 1985).

A sacarificação enzimática da celulose cristalina por fungos e bactérias requer a ação de várias enzimas altamente específicas que atuam sinergisticamente e cujo produto final é, principalmente, a glicose. Existem três grupos principais de celulases: as endoglucanases (EG, endo-1,4-D-glucanohidrolase ou EC 3.2.1.4), que atacam ao acaso regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose no interior da molécula, hidrolisando as ligações  $\beta$  (1-4) acessíveis no interior da molécula e geram novas terminações de cadeia, onde as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH, 1,4- $\beta$ -D-glucana celobiodehidrolases ou EC 3.2.1.91), degradam a molécula resultante da ação da endoglucanase pela remoção de unidades de glicose ou celobiose; as  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose liberando glicose e com isso impedem a inibição da ação das exoglucanases (RIEDEL et al., 1997; GÓMEZ, 1985). As ações combinadas das endo e exoglucanases modificam a superfície (topografia) da fibra de celulose acelerando a velocidade de hidrólise por facilitar o acesso das enzimas aos seus substratos.

Além das enzimas citadas, outras proteínas como as expansinas e as suoleninas têm sido reportadas como capazes de afrouxar a estrutura da celulose cristalina, o que favorece a



sua sacarificação (CARVALHO et al., 2009). Na Figura 1 a ação de cada enzima e da suolenina é ilustrada.

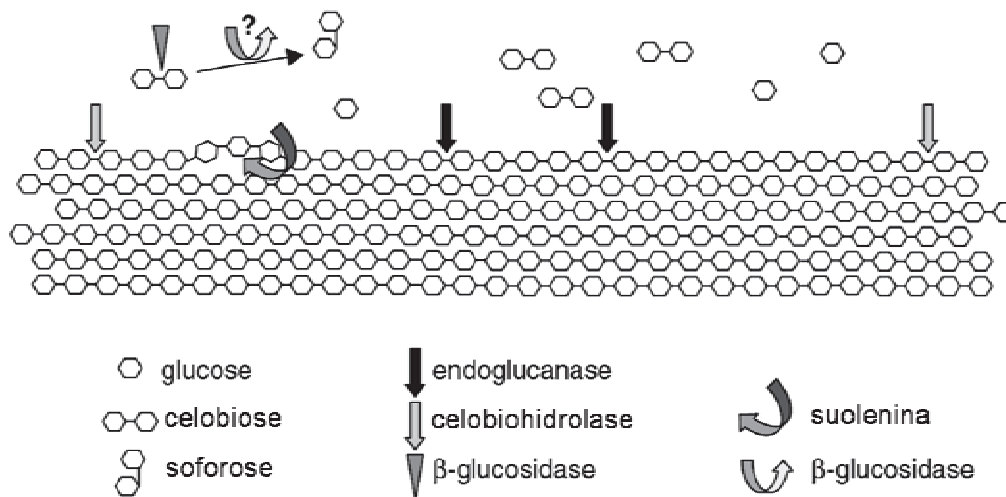
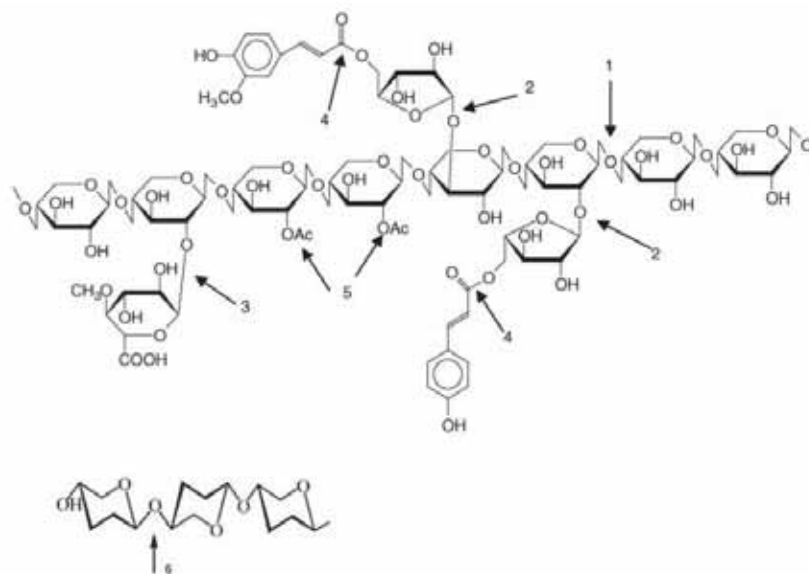


Figura 1. Sistema enzimático envolvido na degradação da celulose (CARVALHO et al., 2009).

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por pentoses (xilose, ramnose e arabinose), hexoses (glicose, manose e galactose) ou ácidos urônicos (4-*O*-ácido metilglucurônico e ácido galacturônico) (RAMOS, 2003). A xilose constitui o maior componente da hemicelulose, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (polímero de xilose) e xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose) e 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).

A hidrólise da hemicelulose, ilustrada na Figura 2, é realizada pelas enzimas do complexo xilanolítico, com destaque para as endoxilanases (1,4-β-D-xilana xilanahidrolase, EC 3.2.1.8), que hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da molécula de xilana, resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato. Outras enzimas do complexo xilanolítico são a exo-1,4-β-xilosidase (EC 3.2.1.37), α-L-Arabinosidasas (EC 3.2.1.55) e acetil esterases (EC 3.1.1.6) (WONG et al., 1988).



**Figura 2. Representação esquemática de uma molécula de xilana e as respectivas ações das enzimas do sistema xilanolítico. 1 – endoxilanasas; 2 -  $\alpha$ -L-arabionofuranosidas; 3 – glucuronidas; 4 – feruloil e cumaril esterases; 5 – acetil xilana esterases; 6-  $\beta$ -xilosidas (Chávez et al., 2006)**

A lignina é uma macromolécula polifenólica, amorfa formada pela polimerização radicalar de unidades de álcool p-hidroxicinâmico, com variados grupos metoxilas. A estrutura química da lignina baseia-se em três precursores monoméricos: álcool coniferil, álcool sinapil, álcool p-coumaril. Dependendo do grau de metoxilação, o grupo aromático é p-hidroxibenzil (derivado por álcool p-coumaril), guaiacil (derivado por álcool coniferil) e siringil (derivado por álcool sinapílico). A propriedade física mais importante desta macromolécula orgânica é sua rigidez, que além de proporcionar resistência aos tecidos das plantas, também previne o colapso dos elementos condutores de água que são altamente resistentes à degradação (RAMOS, 2003).

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 (LiP- EC 1.11.10.14), que catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio (DURAN; ESPOSITO, 2000); as manganês-peroxidases (MnP-EC 1.11.1.13), 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 (EC 1.10.3.2), que catalisam as reações de oxidação dos componentes fenólicos ou não fenólicos quando em presença de um mediador (DURAN; ESPOSITO, 1997).

## **2.2. Pré-tratamentos do material lignocelulósico**

A sacarificação enzimática do material lignocelulósico pode ser associada a diferentes pré-tratamentos físico-químicos como, por exemplo, micro-ondas, ultrassom (LIU et al., 2007), ozônio combinados com modificações no pH para se conseguir uma desestruturação do complexo celulose/lignina/hemicelulose da parede celular vegetal e com isso, facilitar o acesso das enzimas às fibras.

### **2.2.1. Irradiação de micro-ondas**

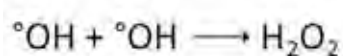
As micro-ondas atuam sobre as moléculas de água, provocando um intenso movimento rotacional que, por atrito, gera aquecimento (SANSEVERINO, 2002). Os choques e o aquecimento provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo ligno-hemicelulósico. Pré-tratamentos de biomassa com a aplicação de micro-ondas em meio alcalino reduziram em 50% do 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). Em adição, Cullingford et al. (1993) usaram micro-ondas para sacarificar resíduos de celulose sob alta pressão atmosférica.

Desta forma, a avaliação desta tecnologia na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar parece ser promissora em termos de aumento no rendimento de obtenção de açúcares redutores para produção de etanol celulósico e principalmente na aceleração do processo. Chen et al. (2011) estudou os efeitos das micro-ondas sobre a estrutura do material lignocelulósico e, utilizando microscopia eletrônica de varredura, demonstrou que há grande fragmentação e desestruturação das fibras.

### **2.2.2. Irradiação de ultrassom**

A utilização de ultrassom em processos químicos vem se tornando mais frequente nos últimos anos, dando origem a uma nova subárea da química: a sonoquímica. As ondas de choque ultrassônicas geradas em meio líquido causam o crescimento seguido do colapso de

bolhas microscópicas no líquido (IERSEL et al., 2008) que dão origem a microrregiões com temperatura e pressão que podem, conforme a potência empregada, alcançar valores da ordem de  $10^4$  °C e  $10^3$  atm, respectivamente (BARBOZA, 1992), fenômeno conhecido como cavitação acústica. Tais condições podem gerar radicais livres a partir de moléculas estáveis e produzir emulsões (SILVA, 2002), além de romper paredes celulares, facilitando a penetração de solventes e aumentando a transferência de massa (LIU et al., 2007). A irradiação de ultrassom em meio aquoso promove a sonólise das ligações O-H da água (TEZCANLI-GÜYER, 2004), conforme a Figura 3:



**Figura 3. Reações envolvidas na sonólise da água (TEZCANLI-GÜYER, 2004).**

Em soluções saturadas com oxigênio ou ozônio, reações envolvendo a geração de radicais altamente oxidantes são favorecidas, conforme mostrado na Figura 4:



**Figura 4. Reações de sonólise do oxigênio (a) e do ozônio (b) (TEZCANLI-GÜYER, 2004).**

A utilização de irradiação de ultrassom tem sido usada para acelerar processos químicos e biológicos. Vargas et al. (2004) demonstraram que é possível potencializar o processo de inversão de carboidratos por ultrassom. Sun et al (2004) conseguiram a solubilização de até 91% da lignina e de 92 % da hemicelulose de bagaço de cana usando solução alcalina e peróxido de hidrogênio sob impacto de ondas ultrassônicas. Pétrier et al. (2004) demonstraram

que a taxa de degradação de fenóis em solução é maior quando frequências mais elevadas são utilizadas, fato observado porque o efeito de sonólise da água é mais acentuado em frequências maiores (GARBELLINI et al., 2008). De acordo com Liu et al. (2005), a irradiação de ultrassom durante o processo enzimático de sacarificação de resíduos de papéis tem um efeito significativo na cinética do processo e no teor de açúcares solúveis totais. Wood et al. (1997) provaram que a utilização de ultrassom em ciclos intermitentes pode aumentar a produção de etanol a partir de celulose em 20%, entretanto com metade da quantidade de celulase usada no mesmo tratamento sem ultrassom.

### 2.2.3. Utilização de ozônio

O mecanismo de ação do ozônio consiste no ataque às ligações duplas, que podem pertencer tanto aos seus anéis fenólicos quanto às cadeias alifáticas da lignina, destruindo o seu caráter aromático e a cadeia polimérica (GODSAY, 1985), e gerando fragmentos menores, mais oxigenados que, conseqüentemente, são mais solúveis (NASCIMENTO et al., 1998). Dentre os polímeros constituintes dos materiais lignocelulósicos, a lignina é a mais susceptível à solubilização por ozonólise (QUESADA et al., 1999). A reação característica de adição do ozônio às duplas ligações da lignina é mostrada na Figura 5:

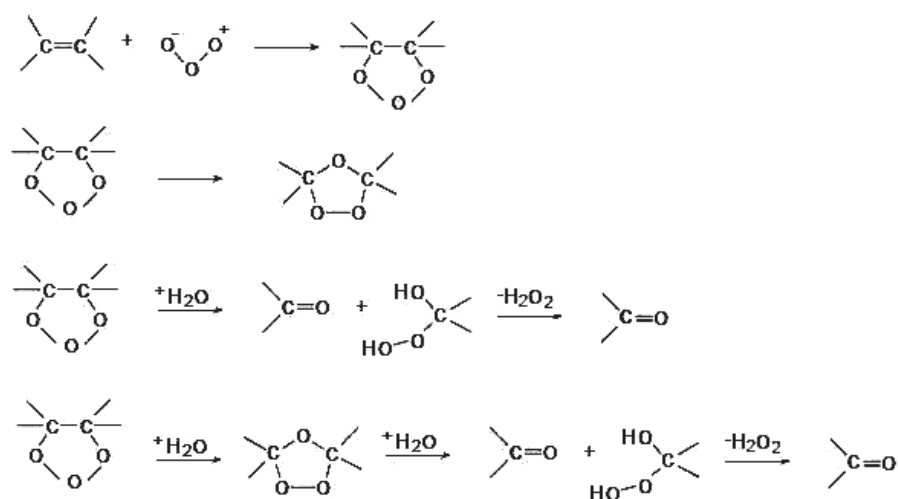


Figura 5. Esquema de ataque às ligações duplas de ligninas pelo ozônio (NASCIMENTO et al., 1998).

O emprego de ozônio como promotor de solvência de lignina já foi relatado na literatura (EUPHROSINEMOY et al., 1991; QUESADA et al., 1997) e por meio de um GC-MS foram detectados os seguintes compostos resultantes da ozonólise: p-hidroxibenzaldeído, vanilina, seringaldeído, ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, glicólico, oxálico, malônico, butanedióico, málico e glicérico.

Em estudo realizado com resíduos de algodão por Yosef et al. (1994), foi provado que os teores de compostos fenólicos monoméricos solúveis aumentaram em 100% com a utilização de ozônio, e que o teor de glicose aumentou de 3,0 para 10,0 g/100g de matéria seca após a aplicação de celulases. O pré-tratamento com ozônio aumentou em 54% o teor de açúcares redutores após ação enzimática sobre a palha de arroz (REYES, et al. 1998), mostrando que a ozonólise é uma tecnologia que não deve ser negligenciada.

Mvula et al. (2009) estudaram a cinética da degradação de derivados fenólicos da lignina através de soluções aquosas de ozônio e mostrou os mecanismos de formação de adutos de ozônio, bem como radicais superóxido e oxigênio singlete (eletronicamente excitado), espécies altamente reativas e com alto poder oxidante frente a sítios com elevada densidade eletrônica, como os grupos aromáticos da lignina.

#### **2.2.4. Efeitos da utilização de ácidos ou bases**

Vários trabalhos relatam o uso de diferentes ácidos e bases associados a outras técnicas nas etapas de pré-tratamento do bagaço de cana. Hendriks e Zeeman (2009) estudaram o uso de substâncias de caráter alcalino e verificou-se inicialmente um intumescimento da biomassa, o que pode aumentar a acessibilidade das enzimas ao substrato. Ressaltaram também que há solubilização da lignina, bem como modificação na cristalinidade da celulose e solubilização parcial da hemicelulose.

Alvira et al (2009) utilizaram tratamentos com NaOH e Ca(OH)<sub>2</sub> e verificaram que tais substâncias podem promover a remoção de grupos acetil da hemicelulose, diminuindo o impedimento estérico provocado por tais grupos e aumentando o acesso enzimático à fibra. Verificou-se, também, que a remoção da lignina aumenta a efetividade enzimática pela redução do número de sítios de adsorção não-produtivos, aumentando a acessibilidade à celulose.

Geddes et al. (2010) concluíram que pequenas quantidades de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> durante o pré-tratamento de explosão a vapor aumenta a solubilização da hemicelulose e, conseqüentemente,

a acessibilidade à celulose. A utilização de ácidos concentrados causa maior solubilização da hemicelulose e precipitação da lignina solubilizada (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Alvira et al. (2009) constataram que altas taxas de hidrólise enzimática foram alcançadas quando se utilizou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluído. Xiang et al. (2003) mostraram que tratamentos ácidos e térmicos associados desestabilizam a estrutura da celulose através da ruptura das ligações de hidrogênio, o que diminui sua cristalinidade.

Deve-se destacar que poucas referências do uso do ozônio associado a energias de alta frequência como micro-ondas e ultrassom foram encontrados na literatura, motivando a realização desse trabalho. Um dos desafios a serem superados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico é a diminuição da produção de substâncias inibidoras da fermentação alcoólica, que devido a altas temperaturas e condições ácidas que se desenvolvem durante o processo são obtidas secundariamente como produto da degradação dos açúcares (ROSSEL, 2007). A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo de celulose, hemicelulose e lignina), do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos.

Segundo Dominguez (2003), há três categorias principais de compostos que são potenciais inibidores da fermentação alcoólica: compostos furânicos, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos. Tais compostos exercem efeitos negativos sobre as enzimas fermentativas afetando a viabilidade do processo.

## **2.3. Análise estrutural do bagaço**

### **2.3.1. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A definição das técnicas termoanalíticas adotada pela IUPAC e ASTM é a seguinte:

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

A utilização deste conjunto de técnicas na elucidação do grau de desestruturação do bagaço de cana após diferentes pré-tratamentos foi demonstrada por diversos autores. Dentre os vários métodos térmicos de análise, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) tem como objetivo o estudo da variação de energia da amostra em relação a uma referência, em função da temperatura. As diferenças existentes entre os componentes da fibra lignocelulósica faz com que apresentem diferentes comportamentos quando submetidos a um programa controlado de temperatura. O grau de cristalinidade da celulose afeta diretamente sua estabilidade térmica e o caráter amorfo da hemicelulose e da lignina faz com que tais componentes tendam a degradar antes da celulose, sendo que a hemicelulose é a estrutura menos estável termicamente, devido à presença dos grupos acetil (WHITE et al, 2011). A lignina começa a sofrer degradação parcial em temperaturas relativamente baixas, mas tal processo continua até temperaturas mais elevadas. (BODĪRLĂU et al, 2008). Desta forma, espera-se que alterações na composição (remoção de lignina, hemicelulose) e/ou estrutura (alteração da cristalinidade da celulose) do bagaço de cana após os pré-tratamentos sejam detectados.

Os dados sobre pirólise do bagaço de cana, ou seja, aquecimento na ausência de oxigênio, ainda são motivos de discussão. Bonelli et al. (2007) em seus experimentos com TG sob atmosfera de N<sub>2</sub> mostraram que o processo de pirólise tem início em 150°C, com maiores taxas de perda de massa entre 200 e 380°C. Um estudo sobre a cinética de decomposição térmica do bagaço realizado por Lora e Soler (1988) mostrou que por volta de 200°C há o início do desprendimento de orgânicos voláteis, enquanto as taxas máximas de degradação da hemicelulose e celulose ocorrem por volta de 300 e 350°C, respectivamente.

Ju et al. (2011) em seus experimentos com DSC sob atmosfera de N<sub>2</sub> relacionaram o deslocamento dos picos endotérmicos com os tratamentos sofridos pelo bagaço. No bagaço *in natura* houve um pico endotérmico em 218°C enquanto nos bagaços que sofreram tratamentos com NaOH 1,0 M e 2,0 M, tais picos se deslocaram para 180 e 195°C, respectivamente. Os autores associam tais picos à decomposição do bagaço, sendo que, os pré-tratamentos promovem a desintegração das estruturas intramoleculares dos polímeros que compõem o bagaço, diminuindo sua estabilidade térmica.



### 2.3.2. Espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)

A absorção de radiação infravermelha pela molécula é capaz de alterar o estado vibracional de suas ligações. As diferentes ligações químicas em uma molécula possuem frequências de vibração quantizadas (SOLOMONS; FRYHLE, 2001) e, variando-se o comprimento de onda da radiação incidente, os componentes absorvem a energia do Infravermelho em regiões particulares da porção do espectro. Para compostos orgânicos, a porção do espectro de interesse é a região cujo número de ondas vai de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Os dados são registrados na forma de um espectro que, geralmente, representa a Transmitância (razão entre a energia radiante transmitida pela amostra e a energia radiante que nela incide) nos números de ondas correspondentes (BICCA, 1994).

O espectro pode ser dividido em regiões que correspondem a grupos de interações, cada qual correspondente à vibração de diferentes ligações na molécula (STUART et al. 1998). No que diz respeito ao bagaço de cana, as bandas de interesse são mostradas na Tabela 1.

**Tabela 1. Bandas de absorção observadas em materiais lignocelulósicos.**

Tipo de vibração e grupos funcionais	Nº de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )
Estiramento O-H	3400 – 3200
Estiramento C-H ( $\text{sp}^3$ )	3000 – 2850
Benzenos substituídos	2000 – 1650
Presença de grupos carbonila	1730 – 1630
Vibração de anel aromático	1605-1590
Vibração do anel aromático de esqueleto fenilpropanoico.	~ 1425
Vibração do anel siringila	1375 – 1250
Vibração do anel guaiacila	1260 – 1230
Estiramento C-O da celulose, hemicelulose ou lignina	~ 1160
Deformação C-H aromático; Deformação C-O de álcool primário.	1035 – 1030
Estiramento da Ligação glicosídica: indica aumento do caráter amorfo.	~ 896
Vibração C-H fora do plano de unidades hidroxifenil.	~ 830

Liu et al. (2008) relacionaram as diferenças nas bandas entre 1260 e 1270  $\text{cm}^{-1}$  (atribuída à presença de grupos Guaiacil) e entre 1330 e 1375  $\text{cm}^{-1}$  (atribuída à presença de grupos Siringil) com diferentes espécies de madeiras. Segundo os mesmos autores, a presença de carbonila na faixa entre 1730 – 1700  $\text{cm}^{-1}$  e não entre 1675 – 1660  $\text{cm}^{-1}$  indica que a carbonila não está conjugada com o anel aromático.

As bandas de absorção em 1600, 1515 e 1425  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a vibrações do anel aromático do esqueleto fenilpropanóico, típico no espectro de ligninas (TEJADO et al., 2007).

Geralmente, segundo Ju et al. (2011), as bandas presentes em 3424, 2914, 1166, 1118, 1075, 1039, 985 e 894  $\text{cm}^{-1}$  são associadas com as estruturas centrais da celulose e hemicelulose, sendo que as bandas entre 1170 e 1000  $\text{cm}^{-1}$  são típicas de arabinoxilanas. Devido ao fato do bagaço de cana não ser translúcido, foi utilizada a Reflectância Total Atenuada (ATR).

### **3. OBJETIVOS**

#### **Gerais**

Estudar a utilização de tratamentos ácidos e alcalinos associado a tratamentos com ozônio, micro-ondas e ultrassom do bagaço de cana de açúcar visando à produção de etanol celulósico por hidrólise enzimática.

#### **Específicos**

- Promover tratamentos de bagaço de cana em condições químicas ácidas e alcalinas concomitantemente com a utilização de micro-ondas, ultrassom e ozônio;
- Caracterizar a composição química do pré-hidrolisado por métodos colorimétricos (CFT e ART);
- Avaliar a ação de enzimas hemicelulolíticas sobre o bagaço de cana pré-tratado com as metodologias propostas e comparar os teores de açúcares fermentescíveis liberados com os obtidos a partir do bagaço *in natura* e, também comparar com outros pré-tratamentos;
- Caracterizar por HPLC-PAD os sacarídeos liberados hidrólise enzimática;

- Avaliar o impacto dos processos do pré-tratamento na estrutura física do bagaço por DSC e FTIR-ATR.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Aquisição do bagaço**

O bagaço de cana foi coletado em usinas da região de S. J. do Rio Preto, lavado 3 vezes com água destilada quente, triturado e peneirado para padronização de tamanho (1 a 3 mm) empregando um triturador agroindustrial. Após o processo de padronização, o bagaço foi seco em estufa a 60 °C por 72 horas e mantidos em ambiente seco, ventilado e sem luz.

### **4.2. Geração de ozônio**

O gás ozônio foi gerado *in situ* usando um gerador Radast 10C, Ozoxi-Ozônio. O equipamento concentra o oxigênio atmosférico por um sistema de peneiras moleculares e produz ozônio pelo método de descarga por coroa, sendo resfriado à água. O equipamento também permite o controle de potência e de fluxo.

### **4.3. Planejamento experimental**

A fim de se conhecer o efeito de cada variável e interação de variáveis sobre a resposta, foi utilizado planejamento fatorial completo tanto para os pré-tratamentos envolvendo ultrassom, quanto para micro-ondas. O planejamento foi do tipo  $2^K$ , ou seja, foram utilizados dois níveis para as variáveis estudadas: um inferior (-) e um superior (+).

As variáveis empregadas nos tratamentos com ultrassom e seus níveis estão relacionadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Variáveis e respectivos níveis empregados nos experimentos com ultrassom 22 kHz (US).**

Variáveis	Nível Inferior ( - )	Nível Superior ( + )
Meio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH
Concentração do ácido ou da base (mol/L)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>
Ozônio	Ausente	Solução saturada
Tempo (minutos)	5	10

A Tabela 3 relaciona as variáveis empregadas nos tratamentos com micro-ondas e seus níveis:

**Tabela 3. Variáveis e respectivos níveis empregados nos experimentos com micro-ondas 2,45 GHz (MO).**

Variáveis	Nível Inferior ( - )	Nível Superior ( + )
Meio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NaOH
Concentração do ácido ou da base (mol/L)	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>
Ozônio	Ausente	Solução saturada
Tempo (minutos)	2	4

Os experimentos foram realizados em duplicata e as respostas foram: o teor de compostos fenólicos liberados em função da degradação da lignina; os teores de açúcares fermentescíveis formados nos pré-tratamentos e após a hidrólise enzimática do bagaço tratado.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o software estatístico Origin 8.0 e Minitab 16, e com isso foi possível encontrar a variável (ou interação de variáveis) responsável por um maior rendimento no processo de hidrólise enzimática.

#### **4.4. Preparo do bagaço e aplicação de ozônio**

Alíquotas de 2,0 g de bagaço de cana foram colocadas em balões de 250 mL onde foram adicionadas diferentes soluções ácidas ou básicas nas concentrações especificadas. As amostras foram mantidas sob fluxo de ozônio durante 5 minutos, agitadas e mantidas em repouso nos balões tampados, e então seguiram para os tratamentos com ultrassom ou micro-ondas.

#### **4.5. Aplicação de micro-ondas ou ultrassom**

O forno de micro-ondas empregado neste projeto foi adaptado a partir da proposta de Silva et al. (2006), porém não foi utilizado condensador de refluxo uma vez que optou-se por utilizar um sistema rotativo visando a obtenção de uma maior homogeneidade na distribuição das micro-ondas na amostra.

Para irradiação de ultrassom foi empregada sonda ultrassônica operante a 22 kHz, à temperatura ambiente. O equipamento permite controle da potência de saída e possui isolamento acústico. A sonda foi inserida nos balões com as soluções contendo o bagaço de cana descritas no item 4.4. A temperatura das amostras ao final das irradiações foi medida utilizando-se pirômetro ótico.

#### **4.6. Processamento do bagaço após os pré-tratamentos**

Depois de transcorridos os processos de pré-tratamento, a fração solubilizada correspondente ao pré-hidrolisado foi recolhida, centrifugada, filtrada e congelada para análises subseqüentes. O bagaço tratado foi lavado com água destilada, seco a 60 °C e armazenado protegido de luz e umidade.

#### **4.7. Hidrólise Enzimática**

A fim de saber o efeito dos pré-tratamentos sobre a liberação de açúcares fermentescíveis, o bagaço foi submetido à ação degradadora de enzimas lignocelulolíticas presente no extrato enzimático bruto de *Myceliophthora* L1D3B, cedido por outros membros do grupo de pesquisa.

A hidrólise foi realizada em tubos de 50 mL, nos quais foram adicionados 0,25 g de bagaço de cana proveniente dos pré-tratamentos, 1,0 mL do extrato enzimático devidamente diluído e 9,0 mL de água destilada. Os tubos foram colocados em banho a 50 °C com agitação orbital a 150 rpm. Depois de transcorrido o tempo de hidrólise, as amostras foram centrifugadas, filtradas e o teor de açúcares redutores totais foi determinado pelo método de Miller. Foram feitos controles para o substrato (bagaço não tratado) e para a enzima (bagaço não tratado + água destilada) e as hidrólises foram realizadas em duplicata.

## **4.8. Metodologia analítica**

### **4.8.1. Determinação de compostos fenólicos totais por Espectrofotometria de UV-VIS**

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) solúveis no pré-hidrolisado foi avaliado pelo método Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927) modificado. O reagente de Folin-Ciocalteu tem sua coloração alterada de amarelo para diferentes intensidades de azul gerada pela redução dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico presentes em sua composição, de acordo com a concentração de compostos fenólicos nas amostras.

A reação foi conduzida adicionando-se 3,0 mL da amostra filtrada e diluída e 0,2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em tubos, aos quais, após 5 minutos, na ausência de luz, foram adicionados 0,8 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (150 g/L). Após 30 minutos em repouso, as absorvâncias a 760 nm foram medidas. Foi traçada curva de calibração utilizando como padrão o ácido gálico, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico/g de bagaço tratado.

### **4.8.2. Determinação de açúcares redutores totais por Espectrofotometria de UV-VIS**

Os açúcares redutores totais solúveis (ART) do pré-hidrolisado e do hidrolisado foram determinados pelo método de Miller (MILLER, 1959) no qual o DNS, ao reagir com os açúcares redutores presentes na amostra, sofre redução a ácido 3-amino-5-nitro salicílico, reação que apresenta alteração de coloração do amarelo para tons castanhos, proporcionalmente à quantidade de açúcares redutores em solução.

A reação foi conduzida adicionando-se 0,5 mL da amostra filtrada e diluída, juntamente com 0,5 mL do reagente DNS em tubos que seguiram para o banho de ebulição por 10 minutos. Os tubos foram então resfriados em banho de gelo por 5 minutos e então, em cada tubo foram adicionados 4,0 mL de água destilada e as amostras seguiram para leitura espectrofotométrica a 540 nm. Foi traçada curva de calibração utilizando-se glicose como padrão e os resultados foram expressos em mg de glicose/g de bagaço tratado.

### **4.8.3. Atividades enzimáticas**

As atividades enzimáticas do extrato obtido do fungo *Myceliophthora* L1D3B foram determinadas a fim de se conhecer seu perfil catalítico. Todos os ensaios foram conduzidos a 50 °C e pH 5,0 (temperatura e pH ótimos do extrato enzimático), e também com a utilização de água em substituição ao tampão acetato.

#### **4.8.3.2. Atividade de β-glicosidase e β-xilosidase**

A atividade de β-glicosidase foi determinada com 50 μL do extrato enzimático bruto devidamente diluído, 250 μL de tampão acetato 0,1 M em pH = 5,0 e 250 μL de pNPG (Sigma Co.) 4 mM, por 10 minutos em banho termostático a 50 °C. A reação foi interrompida pela adição 2,0 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2,0 M e o pNP 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 μmol de pNP por minuto de reação a partir da respectiva curva padrão. A atividade de β-xilosidase foi determinada de maneira análoga, utilizando-se como substrato pNPX (Sigma Co.).

#### **4.8.3.2. Atividade de exoglucanase, endoglucanase e xilanase**

A Atividade da exoglucanase foi determinada com 50 μL do extrato enzimático devidamente diluído, 450 μL de avicel (Avicel, Sigma Co.) 1,0% em tampão acetato 0,1 M em pH = 5,0 por 10 minutos em banho termostático a 50 °C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1,0 mL de DNS. O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 4,0 mL de água destilada, finalmente a quantidade de glicose liberada será medida por espectrofotometria a λ=540 nm (MILLER,1959).

Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μmol de glicose por minuto de reação, determinado a partir de curva padrão de glicose. As atividades de endoglucanase e xilanase foram realizadas de forma

análoga substituindo-se os substratos por CMC (Sigma Co.) a 1% e xilana (Xylan Birchwood, Sigma Co.) a 1%.

#### **4.8.3.3. Atividade de PFase (celulase total)**

A atividade papel de filtro foi determinada medindo a liberação de açúcares redutores provenientes da hidrólise do papel de filtro Whatman n°1 (0,5 cm x 6,0 cm). Foram utilizados 500 µL do tampão acetato 0,1 M pH 5,0 e 250 µL do extrato enzimático devidamente diluído. A reação foi incubada em banho termostático por 60 minutos, tempo e a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de DNS. O volume resultante foi colocado em banho de ebulição por 5 minutos e então resfriado em gelo. A seguir, foram adicionados 4,0 mL de água destilada e a quantidade de glicose liberada foi medida por espectrofotometria a  $\lambda=540$  nm (MILLER,1959).

Uma unidade de atividade enzimática (UPF) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 µmol de glicose por minuto de reação.

#### **4.8.4. Análise térmica do bagaço de cana por calorimetria exploratória diferencial: DSC**

Esta técnica foi utilizada para comparar as alterações ocorridas na estrutura do bagaço de cana após os diferentes pré-tratamentos. Cerca de 2 mg de bagaço seco foi inserido no porta-amostra hermético de alumínio e então submetido à aquecimento de 100 a 275 °C, a uma taxa de aquecimento de 25 °C por minuto em um DSC Perkin Elmer (DSC 8000). N<sub>2</sub> puro foi utilizado como gás de arraste (20 mL/min) e foi utilizado porta-amostra vazio como referência. Para fins de comparação, foram analisados o bagaço *in natura* e também os padrões: avicel, CMC, xilana, lignina.



#### **4.8.5. Análise do bagaço de cana por espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada: FTIR-ATR**

Aproximadamente 0,1 g do bagaço seco foram prensados para a formação de discos (12 mm de diâmetro e 1 mm de espessura). Os espectros foram coletados em um espectrofotômetro Perkin Elmer (FT-IR Spectrum Two – UATR Two) na região de 750 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Foi utilizado ar como *background* e foram analisadas as amostras de bagaço cujos tratamentos proporcionaram valores de ART superiores a 40 mg por grama de bagaço após hidrólise enzimática. Devido à heterogeneidade do bagaço de cana, o feixe de luz foi posicionado em diferentes posições da pastilha e foi então construído um espectro médio para cada amostra.

#### **4.8.6. Determinação dos açúcares liberados pela ação enzimática do bagaço por HPLC-PAD**

A fim de se conhecer o perfil dos açúcares liberados pela hidrólise enzimática empregou-se a técnica de cromatografia líquida de alta performance com detecção por amperimetria pulsada (HPLC-PAD; Dionex). A forma de onda empregada foi a “standard quadrupole” cujos pulsos foram configurados com os seguintes potenciais e durações:  $E_1 = 0,10 \text{ V}$ , 0,40 s;  $E_2 = -2,00 \text{ V}$ , 0,02 s;  $E_3 = 0,60 \text{ V}$ , 0,01 s;  $E_4 = 0,10 \text{ V}$ , 0,06 s. Os diluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18M $\Omega$ ) degaseificada com  $\text{N}_2$ .

Foi empregado fluxo de 1,0 mL por minuto e os solventes (A = hidróxido de sódio 0,2 mol/L; B = água ultrapura; C = acetato de sódio 0,5 mol/L + hidróxido de sódio 0,15 mol/L) foram eluídos isocraticamente até 14 minutos na proporção: 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.

As amostras que apresentaram teores de ART maiores que 40 mg por grama de bagaço e o controle (bagaço não tratado) foram diluídas e filtradas em membranas Millex®-GV 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore). Foram utilizados os padrões glicose, xilose, celobiose, arabinose e galactose (Merk).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Compostos fenólicos e açúcares redutores solubilizados pelos pré-tratamentos

Os compostos fenólicos totais (CFT) e açúcares redutores totais (ART) são formados a partir da quebra da lignina e celulose/hemicelulose, respectivamente, durante os pré-tratamentos. Pode-se relacionar o teor destes compostos com a severidade do pré-tratamento empregado, sendo possível, portanto, relacionar o grau de desestruturação do material lignocelulósico com a concentração de compostos fenólicos e açúcares redutores totais solubilizados. Na Tabela 4 são relacionados cada um dos pré-tratamentos com ultrassom descritos no item 4.3 com os respectivos teores de CFT e ART liberados no pré-hidrolisado.

**Tabela 4. Teores de CFT e ART solubilizados a partir dos pré-tratamentos com ultrassom.**

Exp.	Solução	[ ](mol/L)	irradiação (min)	O <sub>3</sub>	CFT (mg/g bagaço)	ART (mg/g bagaço)
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	5	-	0,04 ± 0,00	-
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	5	saturada	0,06 ± 0,00	-
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	10	-	0,04 ± 0,00	-
4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	10	saturada	0,05 ± 0,01	-
5	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	5	-	0,13 ± 0,00	-
6	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	5	saturada	0,14 ± 0,00	-
7	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	10	-	0,14 ± 0,00	-
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	10	saturada	0,11 ± 0,02	-
9	NaOH	0,100	5	-	1,67 ± 0,02	2,23 ± 0,03
10	NaOH	0,100	5	saturada	1,91 ± 0,03	2,54 ± 0,03
11	NaOH	0,100	10	-	1,76 ± 0,01	2,24 ± 0,01
12	NaOH	0,100	10	saturada	1,93 ± 0,09	2,49 ± 0,00
13	NaOH	0,001	5	-	0,16 ± 0,00	-
14	NaOH	0,001	5	saturada	0,17 ± 0,03	-
15	NaOH	0,001	10	-	0,16 ± 0,00	-
16	NaOH	0,001	10	saturada	0,15 ± 0,00	-

- valores não detectados

Os tratamentos com ultrassom não mostraram diferenças significativas entre si, com exceção das amostras tratadas com NaOH 0,1 M, nas quais pode-se observar uma maior liberação de CFT e ART em relação às demais amostras, observando-se ainda um leve aumento dos teores de CFT nas amostras que receberem fluxo de ozônio.

A Tabela 5 relaciona cada um dos pré-tratamentos com micro-ondas descritos no item 4.3 com os respectivos teores de CFT e ART liberados no pré-hidrolisado.

**Tabela 5. Teores de CFT e ART solubilizados a partir dos pré-tratamentos com micro-ondas.**

Exp.	Solução	[ ](mol/L)	irradiação (min)	O <sub>3</sub>	CFT (mg/g bagaço)	ART (mg/g bagaço)
17	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	2	-	0,06 ± 0,01	-
18	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	2	saturada	1,65 ± 0,01	4,50 ± 0,03
19	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	4	-	0,07 ± 0,02	9,54 ± 0,15
20	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	4	saturada	1,82 ± 0,04	8,39 ± 0,05
21	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	2	-	0,07 ± 0,00	-
22	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	2	saturada	1,20 ± 0,07	-
23	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	4	-	0,07 ± 0,00	-
24	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	4	saturada	1,14 ± 0,06	-
25	NaOH	0,100	2	-	11,75 ± 0,26	3,55 ± 0,07
26	NaOH	0,100	2	saturada	8,74 ± 0,05	3,47 ± 0,03
27	NaOH	0,100	4	-	15,30 ± 0,19	3,83 ± 0,00
28	NaOH	0,100	4	saturada	12,41 ± 0,14	3,53 ± 0,05
29	NaOH	0,001	2	-	2,46 ± 0,21	-
30	NaOH	0,001	2	saturada	1,00 ± 0,02	-
31	NaOH	0,001	4	-	3,61 ± 0,30	-
32	NaOH	0,001	4	saturada	0,87 ± 0,06	-

- valores não detectados

Tais análises podem indicar qual combinação de tratamentos teve maior efeito na desestruturação das fibras bagaço através da remoção da lignina (CFT) ou solubilização parcial da celulose ou hemicelulose (ART). É importante ressaltar que a degradação da celulose não é desejável, pois menos material estará disponível para hidrólise enzimática.

Os tratamentos com micro-ondas foram responsáveis por uma maior remoção de CFT em relação aos tratamentos com ultrassom, fato que pode ser explicado pelas elevadas temperaturas alcançadas durante os tratamentos (na faixa de 180°C contra 60°C das amostras sonicadas). Observa-se, também que a associação de micro-ondas com as maiores concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH causaram as maiores perdas de ART, podendo indicar grandes modificações na estrutura da celulose.

Pode-se observar também que, nas amostras tratadas em meio ácido com ozônio houve aumento na liberação de CFT em relação às amostras que não receberam tratamento com o gás. Por outro lado, nas amostras tratadas com ozônio em meio básico ocorreu justamente o oposto, podendo sugerir uma maximização dos efeitos do ozônio quando utilizado pH baixo.

## 5.2. Atividades enzimáticas

Na Tabela 6 são mostrados os resultados das atividades enzimáticas realizadas com a utilização de tampão acetato (pH = 5,0) e também em água destilada. Os valores das atividades foram expressos em U por mL de extrato enzimático e U por g de enzima.

**Tabela 6. Resumo das atividades enzimáticas do extrato utilizado na hidrólise do bagaço.**

Substrato	Atividade	Água		Tampão	
		U/mL	U/g	U/mL	U/g
CMC	Endoglucanase	25 ± 1	200 ± 7	44 ± 1	350 ± 6
Avicel	Exoglucanase	-	-	-	-
Xilana	Xilanase	69 ± 1	551 ± 5	54 ± 1	433 ± 6
Papel Filtro	Celulase Total	2,5 ± 0,1	20 ± 1	2,4 ± 0,1	19 ± 1
pNPG	β glicosidase	34 ± 1	271 ± 12	34 ± 1	268 ± 8
pNPX	β xilosidase	0,7 ± 0,1	5,6 ± 0,7	-	-

- valores não detectados

Pode-se observar que, com exceção da endoglucanase, as atividades enzimáticas ligeiramente maiores utilizando-se água em substituição ao tampão acetato, alternativa que foi então adotada na etapa de hidrólise enzimática do bagaço.

## 5.3. Hidrólise Enzimática

### 5.3.1. Determinação do tempo ótimo de hidrólise

A fim de se conhecer o tempo ótimo de hidrólise enzimática, foi realizado um ensaio com o bagaço não tratado no qual foi avaliado o teor de açúcares redutores hidrolisados em função do tempo de hidrólise (Figura 6).

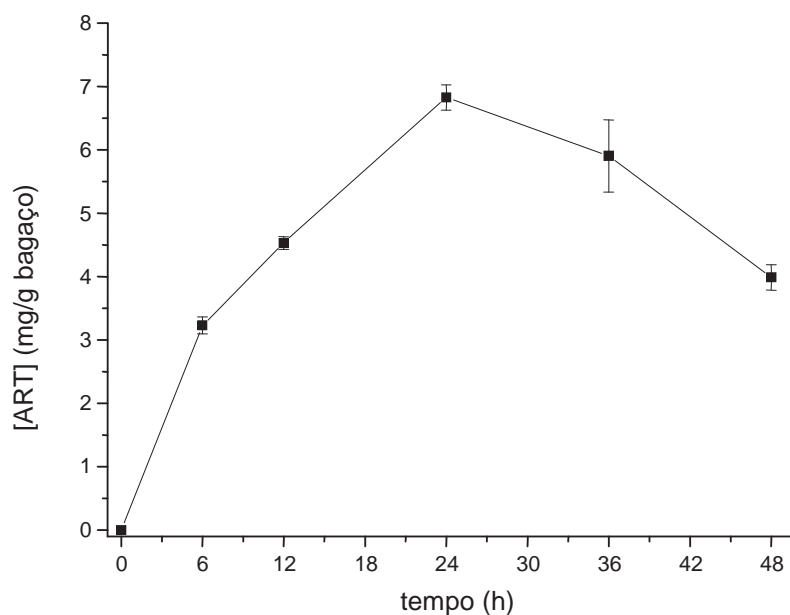


Figura 6. Liberação de açúcares redutores em função do tempo de hidrólise do bagaço.

Pode-se observar um ponto ótimo no tempo de hidrólise em 24 horas, tempo que foi então adotado na etapa de hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.

### 5.3.2. Hidrólise do bagaço pré-tratado

A hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado foi realizada com uma carga enzimática conforme tabela 7 e pôde revelar as diferenças nos teores de açúcares liberados em cada amostra em função dos pré-tratamentos.

**Tabela 7. Carga enzimática empregada na hidrólise enzimática do bagaço de cana após os pré-tratamentos.**

Enzima	Atividade (U/g de bagaço seco)
Endoglucanase	100
Exoglucanase	-
Xilanase	276
Celulase Total	10
$\beta$ -glicosidase	136
$\beta$ -xilosidase	3

- valor não detectado

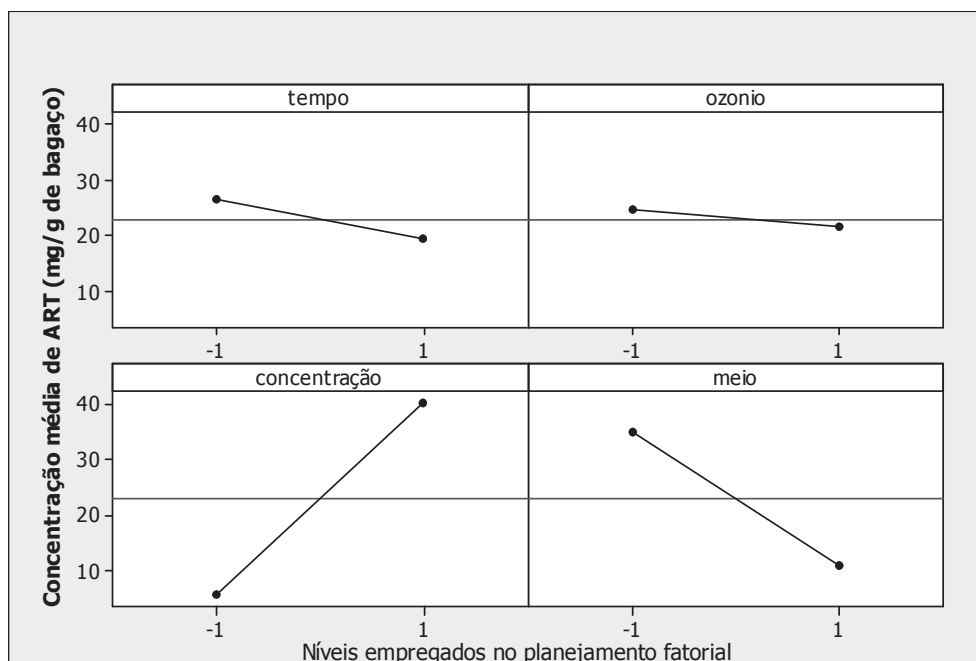
A hidrólise do bagaço *in natura* (não tratado) liberou  $6,8 \pm 0,2$  mg de ART por grama de bagaço enquanto os controles para a enzima não liberaram quantidades detectáveis de açúcares redutores.

Os teores de ART formados após a hidrólise enzimática das amostras de bagaço que sofreram tratamentos envolvendo ultrassom são informados na Tabela 8.

**Tabela 8. Liberação de ART por hidrólise enzimática do bagaço submetido previamente aos tratamentos envolvendo ultrassom.**

Exp.	Solução	[ ](mol/L)	irradiação (min)	O <sub>3</sub>	ART (mg/g bagaço)
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	5	-	82 ± 0,2
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	5	saturada	66,7 ± 0,6
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	10	-	52,3 ± 1,3
4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	10	saturada	54,2 ± 1,1
5	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	5	-	8,3 ± 0,1
6	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	5	saturada	3,9 ± 0,2
7	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	10	-	8,4 ± 0,3
8	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	10	saturada	1,9 ± 0,1
9	NaOH	0,100	5	-	14,6 ± 0,2
10	NaOH	0,100	5	saturada	23,4 ± 0,4
11	NaOH	0,100	10	-	13,8 ± 0,1
12	NaOH	0,100	10	saturada	13,2 ± 0,4
13	NaOH	0,001	5	-	7,1 ± 0,3
14	NaOH	0,001	5	saturada	4,2 ± 0,1
15	NaOH	0,001	10	-	6,7 ± 0,4
16	NaOH	0,001	10	saturada	4,2 ± 0,1

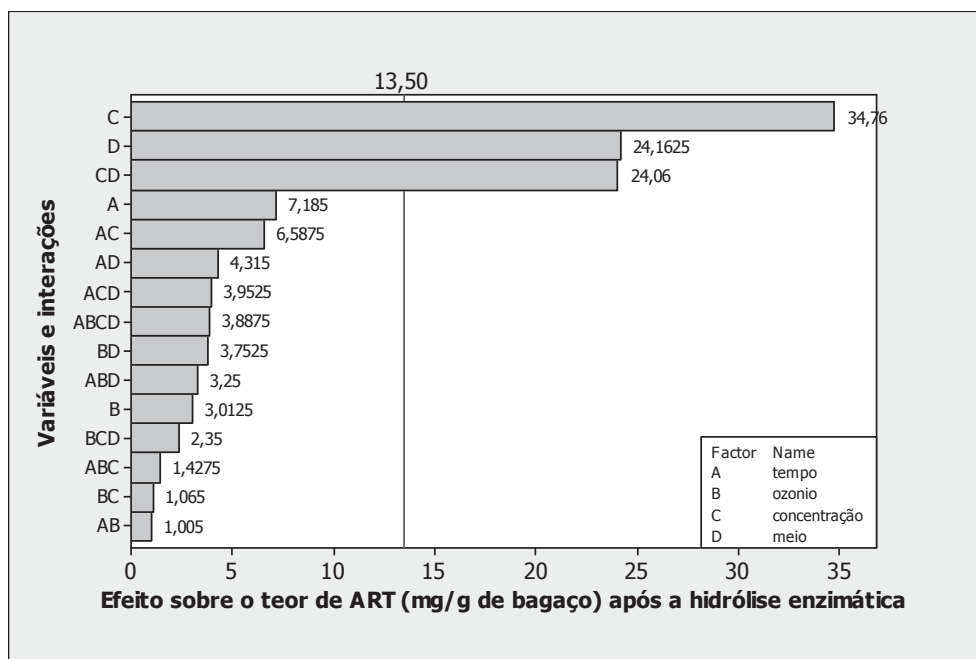
Pode-se observar que ao utilizar as maiores concentrações de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e de NaOH obteve-se maiores teores de ART em relação à concentração de 0,001 mol/L, sendo que os tratamentos em meio ácido mostraram maior eficiência. Tais efeitos, bem como a não-dependência do rendimento da hidrólise com a presença de ozônio ou tempo de irradiação são mostrados na Figura 7.



**Figura 7. Efeito da variação dos níveis de cada variável empregada no planejamento fatorial sobre o teor de ART após hidrólise enzimática para os tratamentos envolvendo ultrassom.**

Neste tipo de gráfico, as retas ascendentes indicam que há aumento da resposta (no caso, a liberação de ART) ao passar a variável em questão do nível inferior para o superior. Retas descendentes indicam que ocorre o oposto, enquanto retas horizontais indicam que não há efeito da variável na resposta final. O efeito quantitativo das variáveis principais e de interação são mostrados na Figura 8, na qual são ilustradas quais as variáveis e interações apresentam significância na resposta final. As barras que passam pela linha vertical de referência indicam as variáveis significativas (poucas vitais) enquanto as barras menores indicam as variáveis não significativas (muitas triviais).





**Figura 8. Quantificação dos efeitos principais e de interação sobre o teor de ART após a hidrólise enzimática do bagaço nos tratamentos do bagaço utilizando ultrassom.**

Coletando as informações das Figuras 7 e 8, podemos afirmar com certeza que, alterando a concentração da solução utilizada do nível inferior (0,001 mol/L) para o nível superior (0,1 mol/L) há um ganho médio na hidrólise enzimática (Figura 7) equivalente a 34,8 mg de glicose por grama de bagaço (Figura 8). De forma análoga, há uma perda média de cerca de 24 mg de glicose por grama de bagaço utilizando-se NaOH (nível superior) ao invés de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (nível inferior).

A Tabela 9 relaciona os pré-tratamentos do bagaço de cana baseados na irradiação de micro-ondas com os respectivos teores de ART solubilizados.

**Tabela 9. Liberação de ART por hidrólise enzimática do bagaço submetido previamente aos tratamentos envolvendo micro-ondas.**

Exp.	Solução	[ ](mol/L)	irradiação (min)	O <sub>3</sub>	ART (mg /g bagaço)
17	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	2	-	17,9 ± 0,2
18	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	2	saturada	77,4 ± 1,0
19	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	4	-	49,4 ± 0,3
20	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,100	4	saturada	86,4 ± 0,2
21	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	2	-	7,2 ± 0,3
22	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	2	saturada	2,3 ± 0,2
23	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	4	-	11,7 ± 0,7
24	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,001	4	saturada	2,6 ± 0,3
25	NaOH	0,100	2	-	56,0 ± 0,5
26	NaOH	0,100	2	saturada	9,8 ± 0,3
27	NaOH	0,100	4	-	67,7 ± 0,5
28	NaOH	0,100	4	saturada	32,4 ± 1,3
29	NaOH	0,001	2	-	10,5 ± 0,1
30	NaOH	0,001	2	saturada	2,6 ± 0,1
31	NaOH	0,001	4	-	6,5 ± 0,3
32	NaOH	0,001	4	saturada	2,4 ± 0,1

Assim como nos tratamentos utilizando ultrassom, podem-se observar melhores rendimentos utilizando-se o nível superior da variável concentração (0,1 mol/L), sendo que os experimentos conduzidos em meio ácido se mostraram mais favoráveis em relação aos conduzidos em meio básico, sendo a combinação H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 mol/L a única condição na qual o ozônio apresenta efeito positivo. Na Figura 9 é mostrada a influência dos efeitos principais para os tratamentos com micro-ondas.

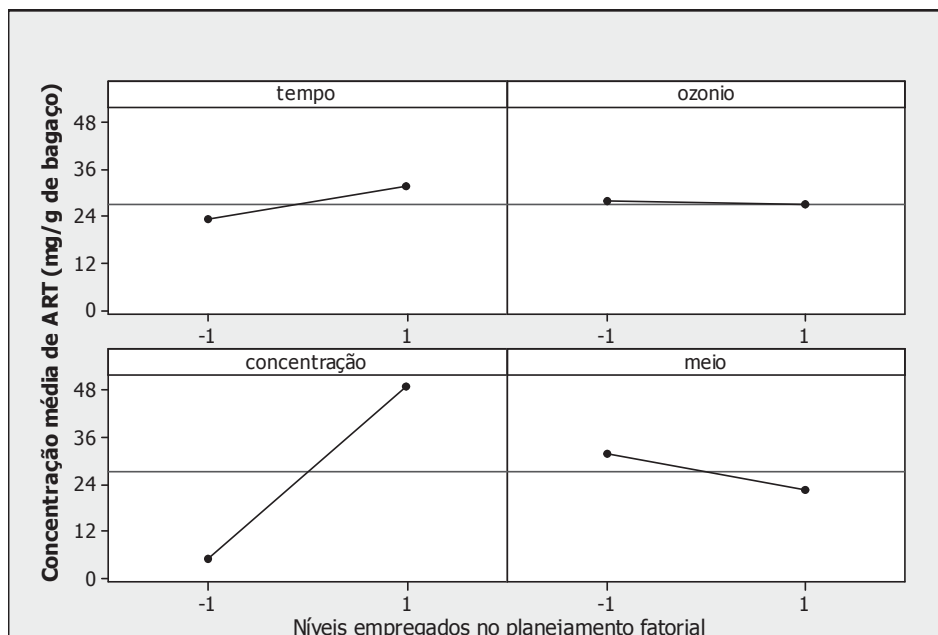


Figura 9. Efeito da variação dos níveis de cada variável empregada no planejamento fatorial sobre o teor de ART após hidrólise enzimática para os tratamentos envolvendo micro-ondas.

No caso dos experimentos com micro-ondas, a variável que apresentou maior efeito na hidrólise enzimática foi a Concentração, enquanto a variável “Ozônio” isolada tem efeito praticamente nulo na liberação de ART. Os efeitos principais e de interação quantificados são mostrados na Figura 10.

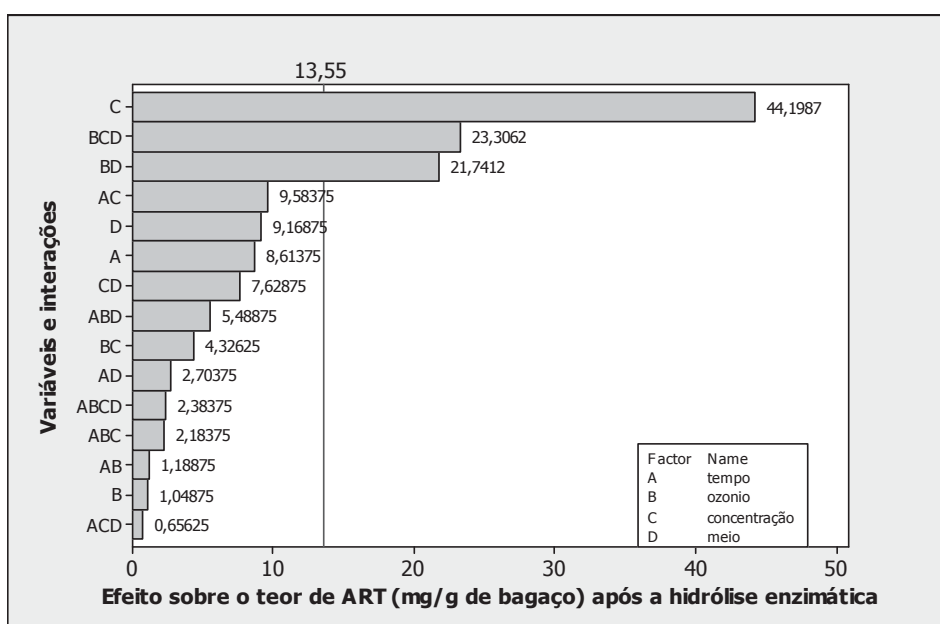


Figura 10. Quantificação dos efeitos principais e de interação sobre o teor de ART após a hidrólise enzimática do bagaço nos tratamentos do bagaço utilizando micro-ondas.

Pode-se confirmar ao analisar as Figuras 9 e 10 que a variável de maior influência quando se utiliza micro-ondas é a concentração, sendo que, em meio ácido há maior rendimento. As associações “Ozônio e Meio” e “Ozônio, Meio e Concentração” mostraram-se significativas utilizando-se micro-ondas, confirmando a relação existente entre ozônio e pH.

Para alguns pré-tratamentos houve uma menor liberação de açúcares redutores totais após a hidrólise enzimática em relação ao bagaço não tratado (cerca de 7 mg/g). Em todas as amostras envolvidas foi utilizado H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou NaOH 0,001 mol/L e saturação da solução com ozônio, sugerindo alterações na estrutura e/ou composição do material lignocelulósico decorrentes da oxidação causada pelo ozônio que interferem na ação das enzimas, podendo ser a formação de compostos inibidores ou a oxidação de açúcares.

#### **5.4. Análise térmica por calorimetria exploratória diferencial: DSC**

##### **5.4.1. Comparação dos valores de $\Delta H_{deg}$ e $T_{onset}$ dos padrões Avicel, CMC, Xilana e Lignina e do bagaço *in natura*.**

Com esta técnica, foi determinada a temperatura inicial de degradação ( $T_{onset}$ ) e energia absorvida na desintegração das interações intra-moleculares da estrutura da celulose/hemicelulose ( $\Delta H_{deg}$ ), grandeza esta proporcional às áreas dos picos endotérmicos obtidos a partir das curvas de DSC. Na Figura 11 são mostradas as curvas de DSC correspondentes aos padrões utilizados e ao bagaço *in natura*.

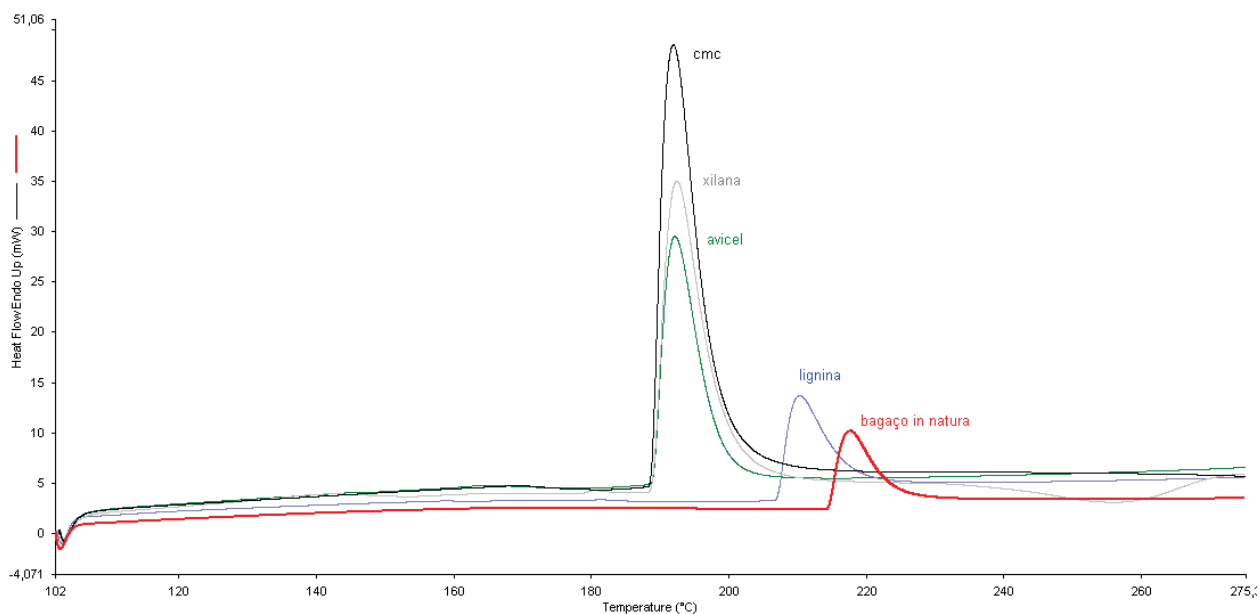


Figura 11. Termogramas do bagaço *in natura* e dos padrões CMC, avicel, xilana e lignina.

Pode-se observar que os três polissacarídeos mantiveram-se estáveis até temperatura próxima 185°C enquanto a lignina alcançou 206°C até sua degradação. Os valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_{\text{deg}}$  para o CMC, Xilana, Avicel, Lignina e bagaço *in natura* são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10.  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_{\text{deg}}$  do bagaço *in natura*, CMC, xilana, avicel e lignina.

Amostra	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{deg}}$ (J/g)
CMC	186 ± 4	300 ± 1
Xilana	186 ± 5	228 ± 7
Avicel	185 ± 7	139 ± 2
Lignina	206 ± 2	67 ± 2
Bagaço <i>in natura</i>	215 ± 1	65 ± 5

Ao se degradarem, os polissacarídeos absorveram maior quantidade de energia em relação à lignina, que pode ser explicado pelo rompimento das diferentes interações envolvidas na formação do arranjo tridimensional das estruturas: na Avicel, composto utilizado para representar a fração cristalina da celulose, as interações envolvidas na formação da estrutura tridimensional são as ligações de hidrogênio entre cadeias; na xilana, as ligações de hidrogênio são mais fracas, por conta do menor número de hidroxilas (SUNDARARAJAN; RAO, 1969) e do impedimento estérico imposto pelos grupos acetil e pelas ramificações na cadeia; no CMC, composto derivado da celulose utilizado para representar a fração amorfa da celulose no qual

há substituição de hidroxilas por grupos  $-\text{CH}_2\text{-COONa}$ , há predominância de interações de Van der Waals entre as cadeias; na lignina, diferentemente dos polissacarídeos utilizados, o arranjo tridimensional é formado por ligações covalentes entre suas unidades, conferindo-lhe uma estrutura mais rígida em relação aos carboidratos analisados. No bagaço *in natura* estão presentes as interações citadas, além de ligações covalentes lignina-carboidrato, conferindo-lhe uma rigidez ainda superior à lignina.

Pode-se notar com os valores de  $\Delta H_{\text{deg}}$  e  $T_{\text{onset}}$ : (i) uma relação inversa entre recalcitrância e o  $\Delta H$  obtido, o que pode sugerir que o valor da variação de entalpia do evento endotérmico que ocorre durante o aquecimento sob as condições estudadas tem sua ocorrência mais acentuada em estruturas menos recalcitrantes; (ii) relação direta entre a  $T_{\text{onset}}$  obtida e recalcitrância, pois para romper estruturas mais estáveis são necessárias temperaturas mais elevadas.

#### **5.4.2. Determinação de $\Delta H_{\text{deg}}$ e $T_{\text{onset}}$ do bagaço de cana pré-tratado**

Para este estudo, apenas as amostras de bagaço tratado com ácido ou base na concentração de 0,1 mol/L foram utilizadas, visto que, nos pré-tratamentos que utilizaram soluções diluídas (0,001 mol/L) foram obtidos baixos rendimentos, sendo que em alguns casos, conforme mencionado anteriormente, a hidrólise enzimática mostrou níveis de ART inferiores aos do bagaço *in natura*. Na Tabela 11, são relacionados  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_{\text{deg}}$  das amostras selecionadas.

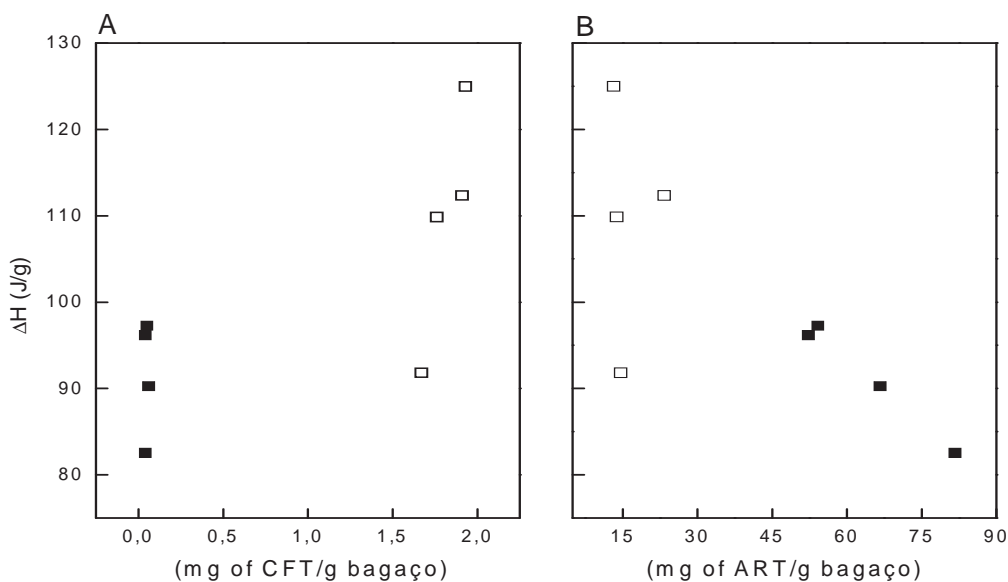
**Tabela 11. Valores de  $T_{\text{onset}}$  e  $\Delta H_{\text{deg}}$  do bagaço pré-tratado.**

Exp.	Solução	t irradiação (min)	O <sub>3</sub>	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$\Delta H_{\text{deg}}$ (J/g)
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	-	202 ± 9	83 ± 1
2	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	saturada	199 ± 10	90 ± 2
3	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	-	192 ± 4	96 ± 4
4	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	saturada	203 ± 22	98 ± 7
9	NaOH	5	-	204 ± 6	92 ± 7
10	NaOH	5	saturada	194 ± 4	112 ± 1
11	NaOH	10	-	198 ± 3	110 ± 6
12	NaOH	10	saturada	195 ± 5	125 ± 4
17	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	-	196 ± 4	103 ± 7
18	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	saturada	189 ± 4	147 ± 4
19	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	-	206 ± 4	84 ± 3
20	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10	saturada	190 ± 1	177 ± 1
25	NaOH	5	-	189 ± 10	109 ± 3
26	NaOH	5	saturada	200 ± 10	99 ± 5
27	NaOH	10	-	202 ± 9	108 ± 1
28	NaOH	10	saturada	193 ± 1	94 ± 1

Observa-se que para todos os tratamentos houve diminuição da  $T_{\text{onset}}$  e aumento do  $\Delta H_{\text{deg}}$  associado às alterações estruturais da fibra lignocelulósica. Extrapolando a associação feita entre tais grandezas e a recalcitrância dos componentes lignocelulósicos de referência utilizados como padrões, tem-se que os pré-tratamentos foram capazes de atuar no bagaço de forma a desestruturá-lo.

#### 5.4.2.1. Relação do $\Delta H_{deg}$ do bagaço de cana após os pré-tratamentos com US com os teores de CFT e ART

A variação na entalpia de degradação do bagaço por DSC é representado na Figura 12 em função dos teores de CFT na fração correspondente ao pré-hidrolisado e os teores de ART liberados após a hidrólise enzimática.

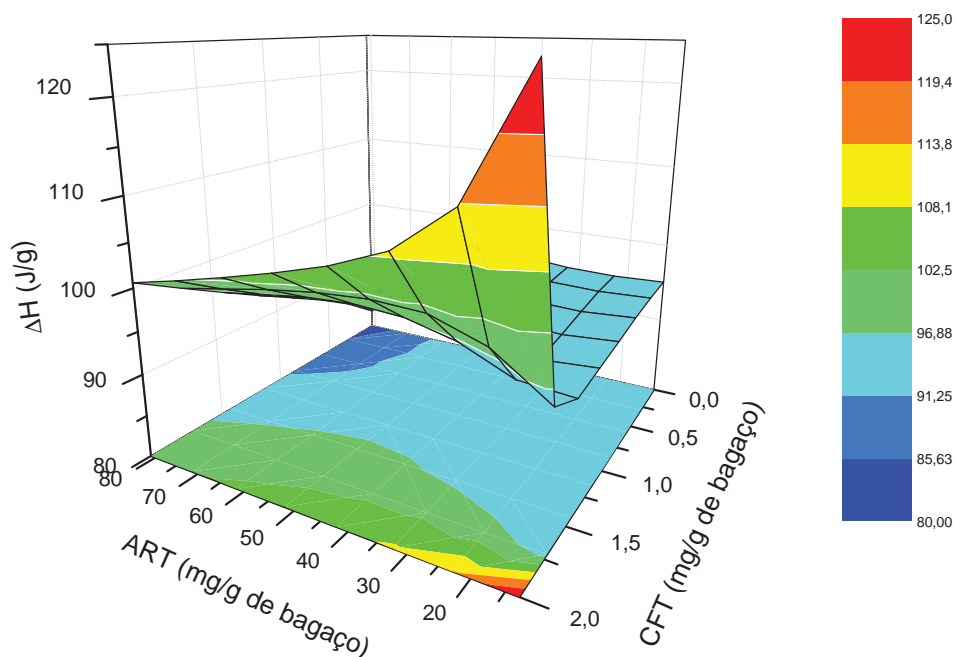


**Figura 12. Relação do  $\Delta H_{deg}$  com CFT solubilizado após os pré-tratamentos (A) e ART liberados após hidrólise enzimática (B) para as amostras de bagaço de cana tratados com US nas condições descritas na Tabela 11. Quadrados preenchidos representam amostras tratadas em meio ácido enquanto quadrados vazios representam amostras tratadas em meio alcalino.**

Nos experimentos envolvendo a utilização de ultrassom pode-se constatar que há grande variação no  $\Delta H_{deg}$  de degradação do bagaço para uma variação mínima do teor de CFT solubilizados pelos pré-tratamentos. Sabendo-se que tais compostos são provenientes da degradação da lignina podemos supor que o mecanismo de ação do ultrassom na fibra não envolveu remoção de lignina.

A relação entre  $\Delta H_{deg}$  e ART tende a uma proporcionalidade inversa, sendo que nos tratamentos que utilizaram ácido sulfúrico os valores de ART foram os maiores para menores valores no  $\Delta H_{deg}$ . A representação gráfica do  $\Delta H_{deg}$  de desestruturação do bagaço em função da liberação de ART e CFT é mostrada na Figura 13.



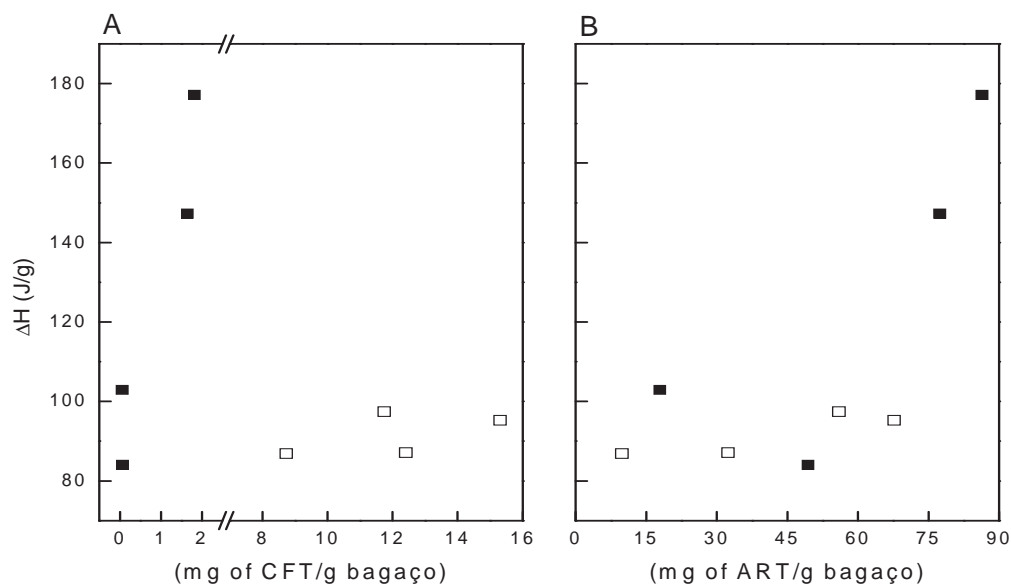


**Figura 13. Relação entre  $\Delta H_{deg}$ , ART após hidrólise enzimática e CFT das amostras de bagaço de cana pré-tratado conforme planejamento fatorial empregado para o US.**

Tais dados sugerem que a irradiação por ultrassom utilizada tem efeito acentuado sob o meio reacional ácido, principalmente sobre a fração polissacarídica das fibras com a diminuição da cristalinidade da celulose e o aumento da hidrólise da hemicelulose, destacando-se o último efeito, que causaria o aumento relativo da concentração de lignina e celulose no bagaço que, conforme discutido anteriormente, possuem maior estabilidade térmica, fazendo com que haja o decréscimo do  $\Delta H_{deg}$ . A remoção por hidrólise da hemicelulose é útil na sacarificação enzimática, pois ocorre a redução do impedimento estérico por ela causado para a ação das celulases.

#### **5.4.2.2. Relação do $\Delta H_{deg}$ do bagaço de cana após os pré-tratamentos com MO com os teores de CFT e ART**

Na Figura 14 são mostradas as relações entre o  $\Delta H_{deg}$  das amostras de bagaço de cana pré-tratadas com MO e seus respectivos teores de CFT após os pré-tratamentos e ART após hidrólise enzimática.

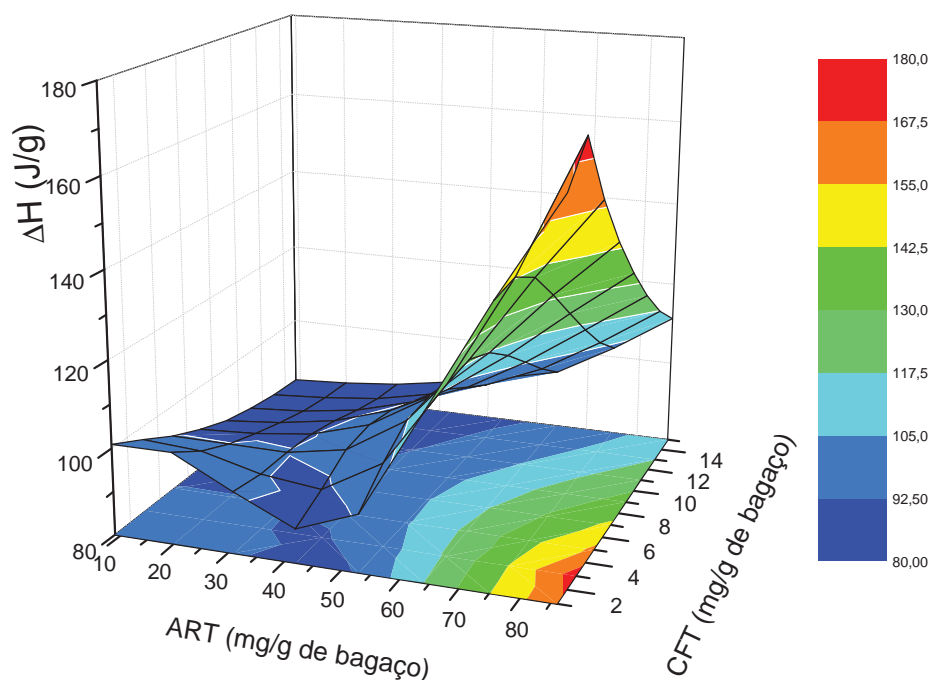


**Figura 14. Relação do  $\Delta H_{deg}$  com CFT solubilizado após os pré-tratamentos (A) e ART liberados após hidrólise enzimática (B) para as amostras de bagaçço de cana tratados com MO nas condições descritas na Tabela 11. Quadrados preenchidos representam amostras tratadas em meio ácido enquanto quadrados vazios representam amostras tratadas em meio alcalino.**

A utilização de radiação de micro-ondas, de maneira geral, foi capaz de atuar de maneira mais intensa na fibra do bagaçço de cana, o que pode ser observado pelos valores de  $\Delta H_{deg}$  obtidos serem mais elevados em relação aos experimentos com ultrassom.

De maneira análoga às amostras que foram submetidas à irradiação por ultrassom em meio ácido, os tratamentos que associaram micro-ondas e ácido sulfúrico apresentaram maior variação do  $\Delta H_{deg}$  associado à degradação térmica do bagaçço em DSC para uma menor variação no teor de solubilização de CFT, comportamento oposto ao observado aos tratamentos com NaOH e MO. Entretanto, observam-se dois pontos (amostras 18 e 20) cujos valores de  $\Delta H_{deg}$  são muito superiores a todos os demais com os correspondentes valores de CFT próximos aos maiores valores obtidos associando-se US e NaOH.

Os altos valores de  $\Delta H_{deg}$  obtidos para tais amostras sugerem que houve remoção da lignina da fibra, o que contrasta com os valores de CFT inferiores aos obtidos pelos tratamentos alcalinos. Cabe aqui ressaltar que tais amostras foram saturadas com ozônio em meio fortemente ácido e a associação de tais efeitos é conhecida por atacar a lignina reduzindo seu caráter aromático (diminuindo a concentração de CFT no meio). A representação gráfica do  $\Delta H$  de desestruturação do bagaçço em função da liberação de ART e CFT para os tratamentos envolvendo a utilização de micro-ondas é mostrada na Figura 15.

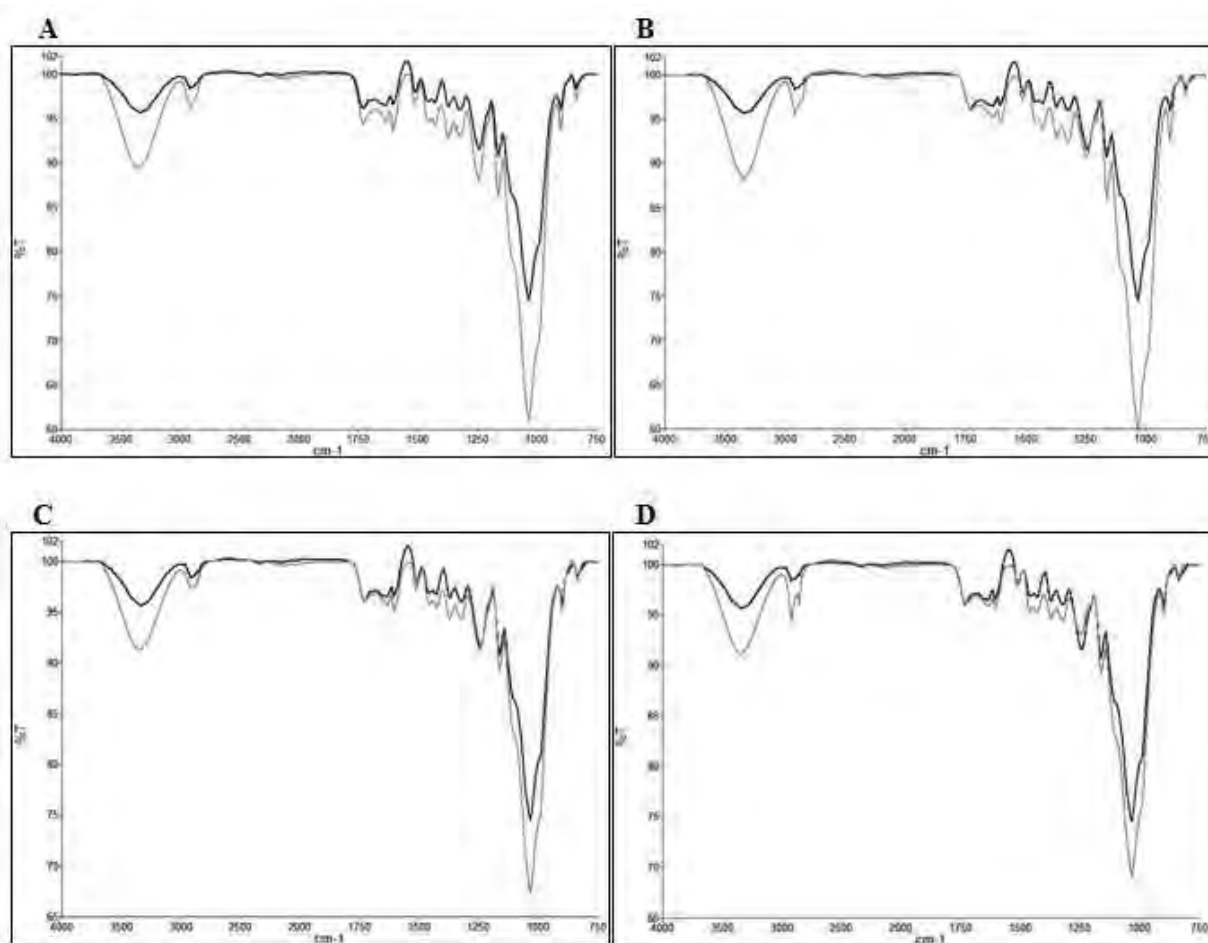


**Figura 15. Relação entre  $\Delta H_{deg}$ , ART após hidrólise enzimática e CFT das amostras de bagaço de cana pré-tratado conforme planejamento fatorial empregado para o MO.**

Os tratamentos baseados na irradiação de MO possibilitam o alcance de altas temperaturas, efeito que, combinado com a utilização de álcalis tem grande eficácia na remoção de lignina, tornando a concentração relativa de carboidratos maior na fibra e corroborando com os altos valores de  $\Delta H_{deg}$ . Entretanto, os tratamentos nos quais as maiores taxas de solubilização de CFT foram alcançadas ainda apresentam teores de ART após a hidrólise enzimática inferiores aos mensurados nas amostras 18 e 20.

### **5.5. Análise do bagaço de cana por espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada (FTIR-ATR)**

Ao comparar as diferenças no espectro de FTIR-ATR do bagaço de cana não tratado e das amostras que sofreram diferentes tratamentos, foi possível observar quais as modificações químicas ocorreram na estrutura da fibra lignocelulósica após cada pré-tratamento. Na Figura 16 são mostradas comparações entre o bagaço não tratado (linhas escuras) e bagaço submetido a diferentes pre-tratamentos (linhas claras): (A)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e 5 min. de US; (B)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e 5 min. de US; (C)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e 10 min. de US e (D)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e 10 min. de US.



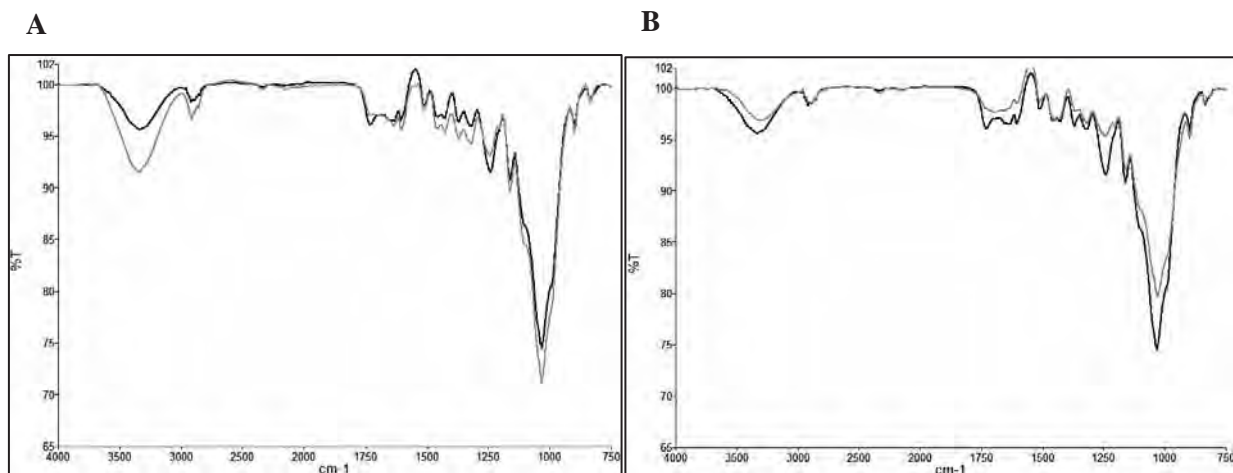
**Figura 16.** Comparação dos espectros de FTIR-ATR do bagaço in natura (linhas escuras) e bagaços pré-tratados (linhas claras): (A)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e US por 5 minutos; (B)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e US por 5 minutos; (C)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M e US por 10 minutos; (D)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e US por 10 minutos.

As mudanças mais significativas observadas foram: o aumento da banda em aproximadamente  $1030\text{ cm}^{-1}$  relacionada à alterações na estrutura da hemicelulose (Ju et al., 2011) e exposição da celulose (Zhang et al., 2011); e em aproximadamente  $3338\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser associada ao estiramento das ligações de hidrogênio da celulose, indicando que o

tratamento empregado foi capaz de tornar tais interações mais flexíveis (Sun et al., 2008, *apud* Sindhu et al., 2010). Tal efeito pode ser confirmado pelo aumento da intensidade das bandas em 1150 e 896  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento das ligações glicosídicas relacionado à diminuição da cristalinidade da celulose (Pappas et al., 2001). Um aumento na pequena banda próxima a 2950  $\text{cm}^{-1}$  é relacionada ao aumento da exposição das estruturas centrais da celulose e hemicelulose (Ju et al., 2011). As bandas entre 1250 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  e em 832  $\text{cm}^{-1}$  são relacionados à estrutura da lignina; e os em 1604 e 1512  $\text{cm}^{-1}$  correspondem a vibrações do anel aromático; em 1425  $\text{cm}^{-1}$ , vibração de anel aromático de esqueleto fenilpropânico; em 1372 e 1315  $\text{cm}^{-1}$ , vibração de anel aromático de grupamentos siringila; e em 1260  $\text{cm}^{-1}$  vibração de anel aromático de grupamentos guaiacila. O aumento da intensidade das bandas sugere que houve o afrouxamento da estrutura lignocelulósica como um todo.

É possível observar algumas diferenças entre os espectros A e B: próximo a 1750  $\text{cm}^{-1}$ , que pode ser relacionada com a remoção de grupos acetil da hemicelulose; diminuição de intensidade em 1250  $\text{cm}^{-1}$ , relacionada aos grupos guaiacila de ligninas, sendo que tal diminuição pode ser atribuída à ação oxidativa do ozônio sobre tal grupo; um maior aumento de intensidade em 896  $\text{cm}^{-1}$ , indicando que houve maior diminuição da cristalinidade da celulose com a utilização do ozônio.

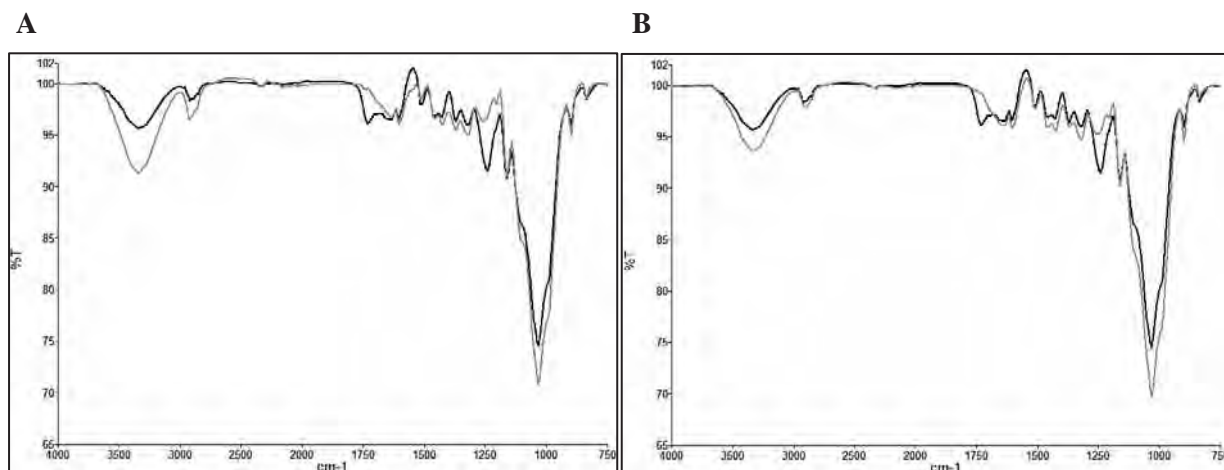
Apesar dos espectros C e D mostrarem que houve maior desacetilação (1750  $\text{cm}^{-1}$ ) e modificações na lignina (1250  $\text{cm}^{-1}$ ) quando comparados com os espectros A e B, tempos maiores de irradiação de ultrassom apresentaram um maior rendimento na etapa de hidrólise enzimática, que pode ser explicada pelas diminuições de intensidade em 3340  $\text{cm}^{-1}$ , 2950  $\text{cm}^{-1}$ , 1030  $\text{cm}^{-1}$ , 1150 e 896  $\text{cm}^{-1}$ , que indicam que houveram poucas modificações nas estruturas da hemicelulose, bem como menor exposição da celulose. Na Figura 17, os espectros de FTIR-ATR do bagaço tratado com: (A)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e 2 min. de MO; (B)  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M,  $\text{O}_3$  e 4 min. de MO são comparados com o do bagaço *in natura*.



**Figura 17. Comparação dos espectros de FTIR-ATR do bagaço in natura (linhas escuras) e bagaços pré-tratados (linhas claras): (A) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, O<sub>3</sub> e MO por 2 minutos; (B) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M, O<sub>3</sub> e MO por 4 minutos.**

Diferentemente dos espectros das amostras cujos tratamentos envolveram ultrassom, nos espectros das amostras tratadas com micro-ondas foi possível visualizar alterações mais profundas na estrutura da fibra. No espectro A, pode-se efeitos semelhantes aos tratamentos que utilizaram ultrassom (em 3338 e 2950 cm<sup>-1</sup>). No entanto, houve significativas diferenças em 1730 cm<sup>-1</sup>, banda relacionada a desacetilação da hemicelulose e em 1250 cm<sup>-1</sup>, banda relacionada à vibração de grupos guaiacila da lignina que apresenta uma diminuição de intensidade que pode ser relacionada à oxidação de tais grupos.

No espectro B, o bagaço in natura é comparado com o bagaço cujo pré-tratamento foi o responsável pela maior liberação de açúcares redutores totais após hidrólise enzimática e podem-se notar as mais profundas modificações na estrutura do bagaço de cana. Nota-se claramente a diminuição da intensidade nas bandas relacionadas à lignina: 1250 cm<sup>-1</sup>, correspondente aos grupamentos guaiacila; 1300 cm<sup>-1</sup>, correspondente aos grupamentos siringila e em 835 cm<sup>-1</sup>, banda correspondente às estruturas centrais da lignina. Tais modificações sugerem que houve grande remoção de lignina da fibra. Observou-se também grandes modificações entre 1750 e 1600 cm<sup>-1</sup>, bandas que podem ser relacionadas a grupamentos acetil da hemicelulose ou da lignina. A diminuição da intensidade de banda em 1030 cm<sup>-1</sup> pode indicar degradação da hemicelulose ou celulose. A Figura 18 compara os espectros FTIR-ATR dos tratamentos que associaram NaOH e diferentes tempos de irradiação de micro-ondas (A) 2 minutos e (B) 4 minutos (linhas claras) com o espectro do bagaço in natura (linhas escuras).



**Figura 18.** Comparação entre os espectros obtidos por FTIR-ATR do bagaço in natura, representado pela linha escura, e (A) bagaço tratado com NaOH 0,1 M e 2 min. de MO; (B) bagaço tratado com NaOH 0,1 M e 4 min. de MO, representados pelas linhas claras.

Pode-se observar no espectro A um aumento de intensidade em 3340, 2950 e 1030  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a modificações nas estruturas da celulose e hemicelulose. Em 1750 e 1250  $\text{cm}^{-1}$ , podem ser observadas diminuições nas intensidades, correspondentes a remoção de grupamentos acetil da estrutura da hemicelulose e remoção de grupamentos guaiacila da estrutura da lignina, respectivamente. Apesar de o bagaço correspondente ao espectro B ter sofrido um tratamento mais agressivo do que o mostrado no espectro A, observam-se as mesmas modificações em 3340, 2950, 1750 e 1250  $\text{cm}^{-1}$  porém menos acentuadas. O aumento de intensidade em 1030 e 896  $\text{cm}^{-1}$  podem justificar o maior teor de açúcares redutores totais liberados após a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado correspondente ao espectro B.

## 5.6. Quantificação de Glicose, Xilose, Celobiose, Arabinose e Galactose por HPLC-PAD

Os diferentes pré-tratamentos empregados atuaram de diferentes maneiras na estrutura do bagaço e, com isso, é de se esperar que a hidrólise enzimática libere diferentes perfis de açúcares em cada amostra. Os padrões que foram quantificados por esta técnica apresentaram os seguintes tempos de retenção, conforme Tabela 12.

**Tabela 12. Tempo de retenção dos sacarídeos quantificados por HPLC-PAD.**

Padrão	tempo de retenção (min.)
Arabinose	4,6
Galactose	5,5
Glicose	6,1
Xilose	7,4
Celobiose	25,5

Na Tabela 13, são mostrados as concentrações de Arabinose, Galactose, Glicose, Xilose e Celobiose para as amostras selecionadas.

**Tabela 13. Teores de arabinose, celobiose, galactose, glicose e xilose quantificados por HPLC-PAD.**

	ARA	CEL	GAL	GLI	XIL
Amostra 01	4,43 ± 0,48	0,22 ± 0,02	0,94 ± 0,08	9,31 ± 0,48	21,80 ± 1,10
Amostra 02	8,08 ± 0,86	0,22 ± 0,01	0,72 ± 0,05	17,89 ± 0,07	7,47 ± 0,30
Amostra 03	5,11 ± 0,68	0,19 ± 0,01	0,59 ± 0,08	13,77 ± 0,61	8,35 ± 0,07
Amostra 04	5,08 ± 0,44	0,19 ± 0,01	0,63 ± 0,05	11,12 ± 0,94	9,59 ± 0,23
Amostra 18	6,03 ± 1,25	0,25 ± 0,01	1,00 ± 0,09	2,50 ± 0,23	16,87 ± 1,33
Amostra 19	6,82 ± 0,55	0,28 ± 0,02	1,04 ± 0,07	2,77 ± 0,10	14,25 ± 0,09
Amostra 20	4,46 ± 0,36	0,34 ± 0,01	1,30 ± 0,05	3,43 ± 0,13	25,70 ± 0,63
Amostra 25	13,9 ± 0,5	0,30 ± 0,01	-	5,68 ± 0,11	14,79 ± 0,30
Amostra 27	16,1 ± 0,1	0,22 ± 0,01	-	11,76 ± 0,23	16,22 ± 0,14
Bagaço <i>in natura</i>	-	0,024 ± 0,004	0,03 ± 0,05	0,14 ± 0,03	0,61 ± 0,08

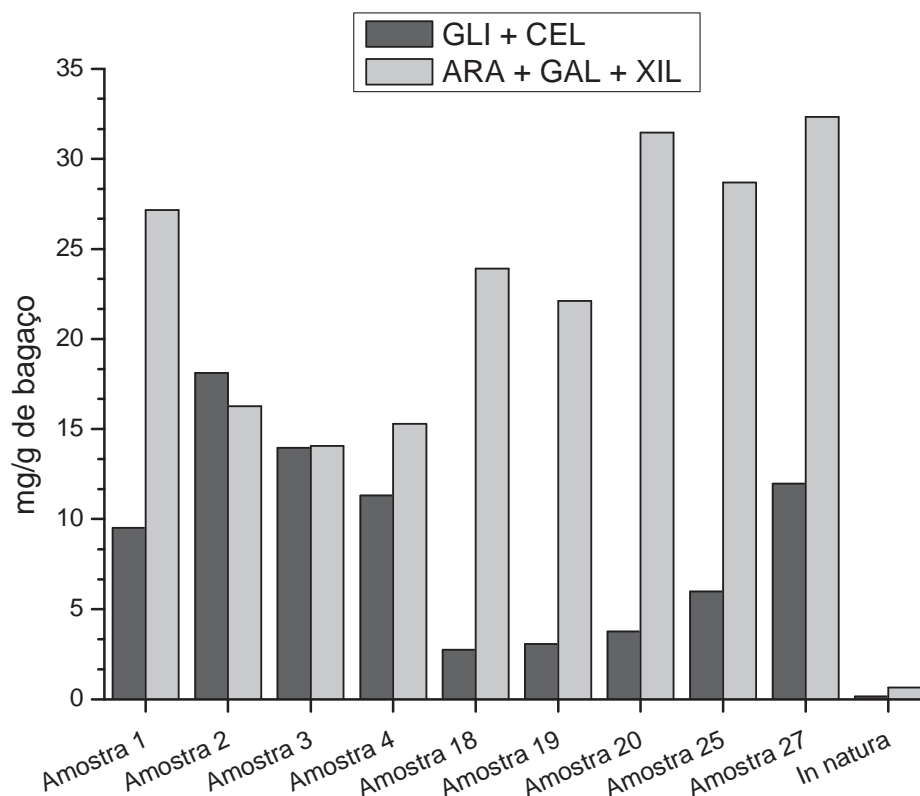
- valores não detectados

De maneira geral, pode-se constatar que os tratamentos baseados na utilização de ultrassom (amostras 01 a 04) apresentaram maiores teores de glicose em relação aos tratamentos com micro-ondas. Isto pode ser explicado pelo fato dos tratamentos com irradiação por ultrassom terem sido capazes de diminuir a cristalinidade da celulose em maior grau, (conforme visto nas análises por DSC e FTIR-ATR) aumentando o número de regiões amorfas disponíveis para a ação das endoglucanases. Por outro lado, os tratamentos com micro-ondas



apresentaram maiores teores de Xilose + Arabinose, e as concentrações de Galactose e Celobiose foram muito baixas para todos os tratamentos.

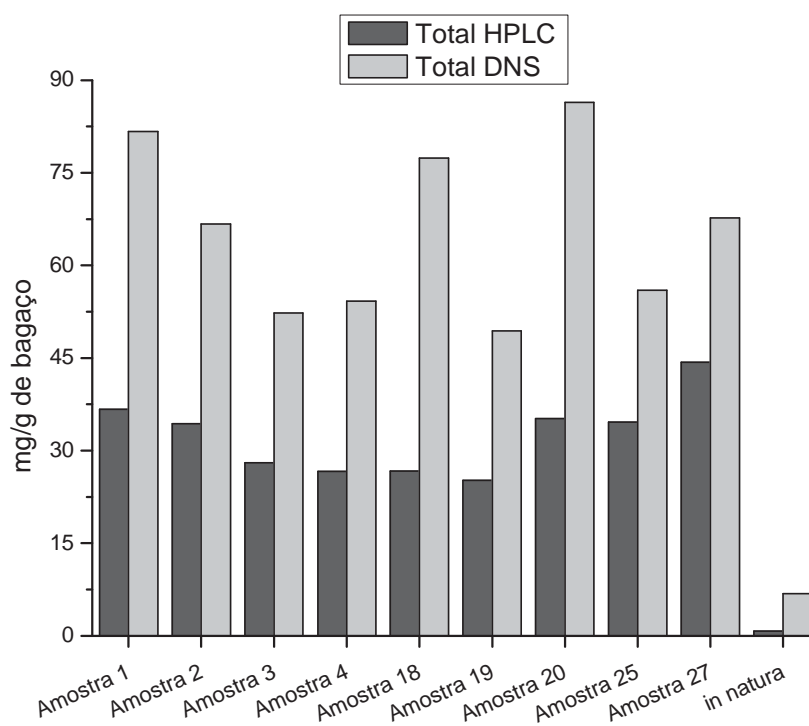
Ao considerar que a concentração de glicose liberada na hidrólise da celulose, é muito maior que na hidrólise da hemicelulose, podem-se agrupar os sacarídeos analisados conforme sua origem: glicose e celobiose (celulose); arabinose, galactose e xilose (hemicelulose), conforme Figura 19.



**Figura 19.** Comparação entre os teores dos açúcares redutores liberados pela hidrólise enzimática das frações celulósicas (GLI e CEL) e hemicelulósicas (ARA, GAL e XIL) do bagaço em função de cada pré-tratamento.

Nota-se, com esse agrupamento, uma tendência dos tratamentos com US em favorecer a hidrólise da celulose, liberando maiores quantidades de glicose e celobiose em comparação aos tratamentos com MO, que favorecem a hidrólise da hemicelulose liberando maiores quantidades de arabinose, galactose e xilose. Cabe aqui ressaltar que a xilose e a arabinose não são diretamente fermentescíveis por leveduras industriais e a fermentação da galactose exige linhagens de leveduras específicas (ROSSELL, 2007).

O que foi proposto com os dados obtidos por DSC e FTIR-ATR corrobora com os dados obtidos por HPLC-PAD: tratamentos com ultrassom em meio ácido foram capazes de modificar e/ou remover cadeias de hemicelulose, diminuindo sua concentração relativa da fibra além de causar a diminuição de cristalinidade das cadeias de celulose e, conseqüentemente, fazendo com que o  $\Delta H_{deg}$  para esses tratamentos não fossem tão elevados. Já os tratamentos baseados na utilização de MO em meio ácido possibilitaram a remoção de grupamentos acetil da hemicelulose, além de maior solubilização da lignina quando utilizado meio alcalino. A associação de MO, ácido sulfúrico e ozônio foi capaz de causar as maiores modificações na estrutura do bagaço de cana, destruindo o caráter aromático da lignina, fazendo com que os tratamentos com tal combinação obtivessem os maiores valores de  $\Delta H_{deg}$  na análise por DSC. Cabe salientar a diferença entre as concentrações de carboidratos obtidas pelos ensaios colorimétricos e cromatográficos (Figura 20).



**Figura 20.** Comparação do teor de AR obtidos pelo método colorimétrico (DNS) e cromatográfico (HPLC-PAD).

Tal diferença se deve ao fato do método de DNS ser um método inespecífico, visto que a reação por ele empregada envolve qualquer fragmento de celulose ou hemicelulose que tenha capacidade redutora. No ensaio cromatográfico, a quantificação foi limitada a cinco sacarídeos.

## 6. CONCLUSÕES

A utilização de ozônio mostrou efeito favorável à hidrólise apenas quando utilizado em meio ácido nos tratamentos com micro-ondas. Os tratamentos em meio ácido, de maneira geral, tornaram o bagaço mais suscetível à hidrólise enzimática, tanto nos tratamentos com ultrassom, nos quais houve favorecimento da hidrólise da celulose quanto nos tratamentos com micro-ondas, em comparação com os tratamentos em meio básico.

A variável mais significativa tanto para os experimentos com ultrassom quanto para os experimentos com micro-ondas foi a Concentração, visto que todos os experimentos nos quais foram utilizados  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{NaOH}$  0,1 mol/L mostraram maiores teores de açúcares redutores após a hidrólise em comparação aos experimentos correspondentes nos quais foram utilizados  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ou  $\text{NaOH}$  0,001 mol/L.

Foi possível estabelecer uma correlação entre o  $\Delta\text{H}_{\text{deg}}$  obtido pela análise do bagaço tratado em DSC com os teores de CFT no pré-hidrolisado e ART liberados após a hidrólise enzimática, sendo que, para os tratamentos com ultrassom as amostras que apresentavam maiores teores de ART apresentavam menores valores de  $\Delta\text{H}_{\text{deg}}$ . Nos tratamentos com micro-ondas, houveram maiores valores de  $\Delta\text{H}_{\text{deg}}$  para as amostras que apresentaram maiores rendimentos na hidrólise enzimática.

Os espectros obtidos pela espectroscopia de infravermelho (FTIR-ATR) permitiram identificar em qual fração da fibra lignocelulósica cada tratamento teve impacto: tratamentos com US em meio ácido foram capazes de diminuir a cristalinidade da celulose e remover parte da hemicelulose, enquanto tratamentos com MO em meio alcalino sem ozônio ou em meio ácido com ozônio foram capazes de promover desestruturações nas cadeias de lignina.

As condições nas quais maiores quantidades de ART foram liberados foram:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M, irradiado por ultrassom durante 5 minutos ( $81,7 \pm 0,2$  mg por grama de bagaço) e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 M saturado com ozônio, irradiado por micro-ondas por 5 minutos ( $86,0 \pm 0,2$  mg por grama de bagaço). Tais tratamentos proporcionaram um aumento significativo (cerca de 12 vezes ou 1.100%) na liberação de açúcares frente aos 6,8 mg de glicose por grama de bagaço não tratado, indicando desta forma, uma promissora rota para o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar visando a produção do bioetanol.

Apesar de alguns pré-tratamentos serem os que mais favoreceram a liberação de ART após a hidrólise enzimática, com teores acima de 80 mg por grama de bagaço, grande parte

destes açúcares não são fermentescíveis. Para o tratamento que propiciou o maior teor de ART após hidrólise enzimática, apenas 3,4 mg de glicose por grama de bagaço foi detectado por HPLC-PAD.

Os pré-tratamentos que utilizaram irradiação de ultrassom foram os que apresentaram os maiores teores de glicose após hidrólise enzimática, sendo que a associação de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1 mol/L saturado com ozônio e irradiação de ultrassom por 5 minutos foi o que apresentou maior teor de glicose após a etapa de hidrólise enzimática (17,9 mg de glicose por grama de bagaço), resultado cerca de 128 vezes superior ao obtido pela hidrólise enzimática do bagaço in natura (0,14 mg de glicose por grama de bagaço).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A.; Ultrassom (I): Influência do Ultrassom na Química. *Química Nova*, v. 15, n.4, 302-316, 1992.

BICCA, R.A. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro. Editora LTC, p. 387, 1994.

BODĚRLÁU, R.; TEACĂ, C. A.; SPIRIDON, I. Chemical Modification of Beech Wood: Effect on Thermal Stability. *Bioresources*, v. 3, Issue 3, p. 789-800, 2008.

BONELLI, P.R.; BUONOMO, E.L.; CUKIERMAN, A.L. Pyrolysis of sugarcane bagasse and copyrolysis with an argentinean subbituminous coal. *Energy Sources, Part A*. v. 29, p. 731-740, 2007.

CAMPBELL, M. K. Bioquímica. Ed. ArtMed, Ed. 3, cap. 12, p. 428-430, 2000.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The Xylanolytic Enzyme System from the Genus *Penicillium*. *Journal of Biotechnology*, v. 123, n. 4, p. 413-433, 2006.

CHEN, W. H.; TU, Y. J.; SHEEN, H. K. Disruption of sugarcane bagasse lignocellulosic structure by means of dilute sulfuric acid pretreatment with microwave-assisted heating. *Applied Energy*. v. 88, p. 2726-2734, 2011.

CULLINGFORD, T. E.; CLARK, T. B.; PHILLIPS, I. R. Characterization of cDNAs encoding the rat testis-specific E1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex: comparison of expression of the corresponding mRNA with that of the somatic E1 alpha subunit. *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1216, p. 149-153, 1993.

CUNICO, M. W. M.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; ZAWADZKI, S. F.; PERALTAZAMORA, P.; VOLPATO, N. Planejamento Fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.9, n.1, 2008.

DOMÍNGUEZ, J. M. O. Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. 2003. 160 f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidad Complutense. Madrid, 2003.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Biodegradação de lignina e tratamento de efluentes por fungos lignolíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L., ed. *Microbiologia Ambiental*, Embrapa- CNPMA, Jaguariúna, p. 269-292, 1997.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis*, v.28, p.83-99, 2000.

EUPHROSINEMOY, V.; LASRY, T.; BES, R.S.; MOLINIER, J.; MATHIEU, J. Degradation of poplar lignin with ozone. *Ozone: Science & Engineering*. v.13, p. 239-248, 1991.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 1927, 73, 627.

GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AVACA, L. A. Aplicação do ultrassom em sistemas eletroquímicos: considerações teóricas e experimentais. *Química Nova*, v. 31, n. 1, p. 123-133, 2008.

GEDDES, C. C.; PETERSON, J. J.; ROSLANDER, C.; ZACCHI, G.; MULLINNIX, M. T.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource Technology*, n. 101, p. 1851-1857, 2010.

GODSAY, M. P. Ozone-cellulose studies: Physico-chemical properties of ozone oxidized cellulosic and lignocellulosic materials. 1985. 239 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Polímeros). University Microfilms International - Polytechnic Institute of New York, New York, 1985.

GÔMEZ, C. H. R. J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. 1985. 122 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

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

IERSEL, M. M.; BENES, N. E.; KEURENTJES, J. T. F. Importance of acoustic shielding in sonochemistry. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 15, p. 294-300, 2008.

IGNOVA, M.; GLASSEY, J.; WARD, A. C. Multivariate statistical methods in bioprocess fault detection and performance forecasting. *Transactions of the Institute of Measurement and Control*. v. 19: p. 271-279, 1997.

JU, Y.; HUYNH, L.; KASIM, N. S.; GUO, T.; WANG, J. 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. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. v. 69, p. 141, 1997.

LIU, C.; SUNA, R.; QIN, M.; ZHANG, A.; RENA, J.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Industrial Crops and Products*, v. 26, p. 212–219, 2007.

LIU, Q.; WANG, S.; ZHENG, Y.; LUO, Z.; CEN, K. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. v. 82, p. 170-177, 2008.

LIU, Y.; URGONKAR, S.; VERKADE, J. G.; ARMSTRONG, D. W. Separation and characterization of underivatized oligosaccharides using liquid chromatography and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. v.1079, p.146-152, 2005.

LORA, E.E.S.; SOLER, P.B. Determination of kinetic parameters governing the process of bagasse thermal decomposition and combustion. *Ingeniera Energetica*. v. 9, p. 146-148, 1988.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426 - 428, 1959.

MIRANDA, I. C. Aproveitamento energético a partir de resíduos de biomassa: bagaço e palha de cana de açúcar. 2009. 175 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MVULA, E.; NAUMOV, S.; SONNTAG, C. V. Ozonolysis of lignin Models in Aqueous Solution: Anisole, 1,2-Dimethoxybenzene, 1,4-Dimethoxybenzene, and 1,3,5-Trimethoxybenzene. *Environmental Science & Technology*. n. 43, p. 6275–6282, 2009.

NASCIMENTO, E. A.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; PILÓ-VELOSO, D. Ozonólise das ligninas organossolve e Kraft eucalipto. Parte II: Cinética nos meios ácido e básico. *Química Nova*, v. 21, p. 578-583, 1998.

OVALLE, R.; SOLL, C. E.; LIM, F.; FLANAGAN C.; ROTHUNDA, T.; LIPKE, P. N. Systematic analysis of oxidative degradation of polysaccharides using PAGE and HPLC–MS. *Carbohydrate Research*, v.330, p. 131–139, 2001.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. v. 74, p. 69-80, 2000.

PAPPAS, C.; TARANTILIS, P. A.; DALIANI, I.; MAVROMOUSTAKOS, T.; POLISSIOU, M. Comparison of classical and ultrasound-assisted isolation procedures of cellulose from kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) and eucalyptus (*Eucalyptus rodustrus Sm.*). *Ultrasonics Sonochemistry*. V. 9, p. 19 – 23, 2002.

PÉTRIER, C.; LAMY, M.; FRANCONY, A.; ABDALLAH, B.; DAVID, B.; RENAUDIN, V.; GONDREXON, N. Sonochemical degradation of phenol in dilute aqueous solution: comparison of the reaction rates at 20 and 487 kHz. *Journal of Physical Chemistry*, v. 98, p. 10514 -10520, 1994.

QUESADA, J.; RUBIO, M.; GÓMEZ, D. Chemical characterization of ozonated lignin solutions from corn (*Zea mays*) stalk and poplar (*Populus deltoides*) wood by capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography*. v. 20, p. 565-568, 1997.

QUESADA, J.; RUBIO, M.; GOMEZ, D. Ozonation of Lignin Rich Solid Fractions from Corn Stalks. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. v.19, ed. 1 & 2, p. 115 – 137, 1999.

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

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



RIEDEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Letters*. v. 147, p. 239-243, 1997.

ROSSELL, C. E. V. Workshop Tecnológico sobre Hidrólise para Produção de Etanol. n. 3, Campinas, 2007, Seção 3: Fermentação do Hidrolisado.

SABA, J.A.; SHEN, X.D.; JAMIESON, J.C.; PERREAULT, H. Investigation of different combinations of derivatization, separation methods and electrospray ionization mass spectrometry for standard oligosaccharides and glycans from ovalbumin. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 36, p. 563-574, 2001.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em Síntese Orgânica. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA E. R. Produção de bioetanol de bagaço de cana de açúcar. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. v. 11, n. 1, p. 27-33, 2009.

SILVA, R. P. Vibrações ultrassônicas: uma alternativa tecnológica ao refino da celulose Kraft de eucaliptos. 2002, 88p. Tese (Mestrado em Ciência florestal) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, Minas Gerais.

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

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

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química orgânica. Rio de Janeiro. Editora LTC, 2001. 474p.

SUN, J.X.; XU, F.; SUN, X.F., WU, S.B. Comparative study of lignins from ultrasonic irradiated sugarcane bagasse. *Polymer International*. v. 53, p. 1711-1721, 2004.

SUNDARARAJAN, P. R.; RAO, V. S. R. Conformational studies of  $\beta$  - D-1,4'-xylan. *Biopolymers*. v. 8, p. 305–312, 1969.

SUN, Y.; LIN, L.; DENG, H. B.; LI, J. Z.; HE, B. H.; SUN, R. C. Structure of bamboo in formic acid. *Bioresources*. v. 3, p. 297–315, 2008.

TEJADO, A.; PEÑA, C.; LABIDI, J.; ECHEVERRIA, J. M.; MONDRAGON, I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*. v. 98, p. 1655–1663, 2007.

TEZCANLI-GÜYER, G.; INCE, N. H.; Individual and combined effects of ultrasound, ozone and UV irradiation: a case study with textile dyes. *Ultrasonics*, v. 42, p. 603 - 609, 2004.

TIAN, Q.G.; DING, X.L. Screening for limonoid glucosides in Citrus tangerina (Tanaka) Tseng by highperformance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 874, p. 13-19, 2000.

VARGAS, L. H. M.; PIÃO, A. C. S.; DOMINGOS, R. N.; CARMONA, E. C. Ultrasound effects on invertase from *Aspergillus niger*. *World Journals of Microbiology and Biotechnology*. v. 20, p. 137-142, 2004.

WHITE, J. E.; CATALLO, W. J.; LEGENDRE, B. L. Biomass pyrolysis kinetics: A comparative critical review with relevant agricultural residue case studies. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 91, p. 1-33, 2011.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 52, p. 305-317, 1988.

WOOD, B. E.; ALDRICH, H. C.; INGRAM L. O. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnology Progress*. v. 13, p. 232-237, 1997.

XIANG, Q.; KIM, J. S.; LEE, Y. Y. A comprehensive kinetic model for dilute-acid hydrolysis of cellulose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 105, p. 337 – 352, 2003.

YOSEF, E.; BEM-GHEDALIA, H.; MIRON, J.; HUTTERMANN, A.; MAJCHERCZYK, A.; MILSTEIN, O.; LUDEMANN, H. D.; FRUND, R. Characterization of Some Cell Wall Components of Untreated and Ozone-Treated Cotton Stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 42, p. 86-90, 1994.

ZHANG, J.; MA, X.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The effect of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4585 – 4589, 2011.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; CHEN, Q. M.; JIN, S. W.; WU, G. Dissolution of cellulose with ionic liquids and its application: a mini-review. *Green Chemistry*, v. 8, p. 325-327, 2006a.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z.; CHEN, Q. M.; WU, G.; WANG, C.; JIN, S. Microwave assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering*, v. 94, p. 437-442, 2006b.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z.; ZHANG, X.; WANG, C.; YU, F.; JIN, S. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 869- 873, 2006c.