



Lúcio Alexandre Lima Gonçalves

**PRÉ-TRATAMENTO OXIDATIVO DE BAGAÇO DE CANA COM
PERSULFATO DE SÓDIO PARA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

Lúcio Alexandre Lima Gonçalves

**PRÉ-TRATAMENTO OXIDATIVO DE BAGAÇO DE CANA COM
PERSULFATO DE SÓDIO PARA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

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. Maurício Boscolo

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Gonçalves, Lúcio Alexandre Lima.

Pré-tratamento oxidativo de bagaço de cana com persulfato de sódio para sacarificação enzimática e produção de etanol celulósico / Lúcio Alexandre Lima Gonçalves. -- São José do Rio Preto, 2013
102 f. : il., tabs.

Orientador: Maurício Boscolo

Coorientador: Roberto da Silva

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

1. Química. 2. Hidrólise. 3. Persulfatos. 4. Bagaço de cana. 5. Etanol celulósico. I. Boscolo, Maurício. II. Silva, Roberto da. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 577.15.03

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

Lúcio Alexandre Lima Gonçalves

**PRÉ-TRATAMENTO OXIDATIVO DE BAGAÇO DE CANA COM
PERSULFATO DE SÓDIO PARA SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA E
PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO**

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.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Boscolo
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha
UNICAMP – Campinas

São José do Rio Preto – SP
20 de Dezembro de 2013

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio constante.

À minha filha e esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus super-heróis (meus pais) por me darem o conforto e sabedoria emocional na condução dos meus estudos e na vida.

Agradeço a minha esposa Carolina por ser uma grande companheira.

Agradeço a minha pequena Laura pelos momentos de “delete” no computador e soneca no ar condicionado do laboratório. Agradeço também pelos momentos em que lia artigos em voz alta como se fossem histórias de ninar, que no fim a fazia adormecer.

Agradeço especialmente ao amigo **Olavo Micali Perrone**, pela contribuição essencial ao desenvolvimento do meu trabalho de mestrado.

Muito obrigado ao Professor Doutor Mauricio Boscolo por ser meu orientador e por topar este novo desafio que foi desenvolver este trabalho com limitada presença de sua pessoa.

Agradeço a todos os Docentes da UNESP, Campus de São José do Rio Preto, por difundirem e replicarem seus conhecimentos para minha formação acadêmica.

Agradeço a empresa Geoambiente por permitir o tempo mínimo necessário para o mestrado.

**“Eu não tenho ídolos. Tenho admiração por trabalho, dedicação e
competência.”**

Ayrton Senna

RESUMO

O presente trabalho foca o pré-tratamento oxidativo do bagaço de cana de açúcar tendo em vista o uso da hidrólise enzimática para a produção de etanol celulósico. Destina-se a fazer o estudo do pré-tratamento com persulfato de sódio no intuito de se obter um pré-hidrolisado eficiente para a sacarificação enzimática do bagaço. A despolimerização do bagaço pode gerar quantidade de açúcares fermentescíveis como a glicose e xilose, e assim aumentar substancialmente o volume de etanol produzido pela mesma área cultivada de cana de açúcar.

Os resultados indicaram que o pré-tratamento contendo somente oxidante persulfato de sódio poderia desestruturar o bagaço em temperatura branda atingida durante 0,5 min de irradiação com microondas, resultando no aumento na liberação de glicose (124%) e xilose (168%) após hidrólise enzimática em relação ao bagaço *in natura*. O resultado mais significativo de glicose (162%) e xilose (265%) em relação ao bagaço *in natura* foi obtido com 3,0 min de irradiação de microondas, em meio alcalino e na presença de persulfato de sódio. Ainda neste pré-tratamento, foi observada no espectro de IR significativa modificação estrutural na região da carbonila, além de modificação com menor intensidade na região da vibração das ligações aromáticas da lignina.

Os pré-tratamentos resultaram em baixa solubilização de inibidores fenólicos na maioria dos pré-tratamentos com persulfato. Também não foram detectadas concentrações de derivados furânicos provenientes da degradação térmica da hemicelulose (furfural) e celulose (HMF).

De maneira geral, os pré-tratamentos do bagaço de cana com persulfato de sódio em condições químicas distintas age sinergicamente na desestruturação da fibra do bagaço facilitando a hidrólise enzimática e na oxidação de fenólicos solubilizados a partir da oxidação da lignina.

Palavras-Chave: persulfato, pré-tratamento, bagaço de cana, hidrólise enzimática, etanol celulósico.

ABSTRACT

This thesis focuses on the oxidative pretreatment of sugarcane pulp in view of the enzymatic hydrolysis use for cellulosic ethanol production. It intends to study the sodium persulfate pretreatment in order to obtain an efficient pre-hydrolyzate for enzymatic saccharification of the pulp. The pulp depolymerization can generate fermentable sugar quantities such as glucose and xylose, and thus substantially increase the amount of ethanol produced by the same sugar cane growing area.

Preliminary results indicated that the pretreatment containing sodium persulfate alone can disrupt the pulp at mild temperatures reached during 0.5 min of microwave irradiation, resulting in an increased glucose (124%) and xylose (168%) after enzymatic hydrolysis. The most significant result of glucose (162%) and xylose (265%) was obtained with 3.0 min of microwave irradiation, in an alkaline medium with persulfate. In this pretreatment, an expressive structural modification in the carbonyl region was observed through IR spectrum, besides the less intensive modification in the lignin's aromatic rings vibration region.

The oxidative pretreatment minimized the phenolic inhibitors production, making it undetectable on most experiments. Also, concentrations of furanic derivate from thermal degradation of hemicellulose (furfural) and cellulose (HMF) carbohydrates weren't detected. Generally, the sodium persulfate pretreatment acts synergistically on the pulp fiber disruption and on the solubilized phenolic oxidation.

Keywords: persulfate, pretreatment, sugarcane pulp, enzymatic hydrolysis, ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da fração celulósica	19
Figura 2 – Representação esquemática da hemicelulose	20
Figura 3 – Precursores da lignina.....	22
Figura 4 – Modelo estrutural proposto para a lignina de madeiras	23
Figura 5 - Esquema da ação do complexo enzimático na celulose	24
Figura 6 – Estrutura molecular do persulfato de sódio.....	31
Figura 7 - Híbrido de ressonância do radical sulfato	33
Figura 8 – Exemplo de hidroxilação de estruturas aromáticas com ácido peracético.....	36
Figura 9 – Posição das leituras de FTIR-ATR nos discos do bagaço pré-tratado	45
Figura 10 - HMF e furfural detectados para 50 mg/L da curva padrão.....	48
Figura 11 - Curva padrão utilizada na análise de FT.....	52
Figura 12 - Curva padrão utilizada na análise de fenol	54
Figura 13 - Curva padrão utilizada na análise de ART do líquido do pré-tratado	58
Figura 14 - Curva padrão utilizada na análise de HMF	60
Figura 15 - Curva padrão utilizada na análise de furfural	60
Figura 16 - Espectros do IR de interesse do bagaço <i>in natura</i>	62
Figura 17 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 15 e 16.....	63
Figura 18 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 13 e 14.....	65
Figura 19 - Algumas estruturas que contêm carbonila na lignina.....	66
Figura 20 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 19 e 20.....	67
Figura 21 – Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 17 e 18.....	69
Figura 22 – Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 17 e 19.....	71
Figura 23 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 17 com 0,1 mol/L e 17 com 1,0 mol/L de persulfato	72
Figura 24 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 11 e 12.....	74
Figura 25 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 5 e 6.....	75

Figura 26 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 9 e 10.....	76
Figura 27 - Espectros do IR do bagaço <i>in natura</i> e dos pré-tratamentos 3 e 4.....	77
Figura 28 – Curva TGA e DTA do bagaço <i>in natura</i>	79
Figura 29 - Curva DTA do bagaço <i>in natura</i> e do bagaço do pré-tratamento 15.....	80
Figura 30 - Curva DTA do bagaço <i>in natura</i> e do bagaço do pré-tratamento 13.....	81
Figura 31 - Curva DTA do bagaço <i>in natura</i> e do bagaço do pré-tratamento 14.....	82
Figura 32 - Curva DTA do bagaço <i>in natura</i> e do bagaço do pré-tratamento 17 e 18	83
Figura 33 - Curva padrão utilizada na análise de ART do hidrolisado	85
Figura 34 - Curva padrão utilizada na análise de xilose	87
Figura 35 - Curva padrão utilizada na análise de glicose.....	87
Figura 36 - Perfil dos resultados do líquido resultante dos pré-tratamentos.....	90
Figura 37 - Perfil dos resultados do bagaço hidrolisado	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol	17
Tabela 2 - Comparativo de diversos métodos de pré-tratamento.....	27
Tabela 3 – Detalhamento das variáveis e níveis experimentais	41
Tabela 4 – Detalhamento das variáveis de cada experimento	42
Tabela 5 - pH final e variação de massa (VM) ao final dos pré-tratamentos.....	50
Tabela 6 - Resultados das análises de FT do líquido resultante do pré-tratamento.....	53
Tabela 7 - Resultados das análises de fenol do líquido resultante do pré-tratamento	55
Tabela 8 - Resultados de ART do líquido do pré-tratado	57
Tabela 9 - Resultados das análises de HMF e furfural no líquido do pré-tratado.....	59
Tabela 10 - Bandas do IR características da lignina.....	61
Tabela 11 – Resultados dos experimentos 13 e 14 em mg por g de bagaço tratado	64
Tabela 12 – Comparação dos resultados de ART, glicose e xilose	68
Tabela 13 – Resultados de ART da hidrólise enzimática	84
Tabela 14 - Resultados gerais dos pré-tratamentos 3, 4 e 17 em mg/g de bagaço.....	86
Tabela 15 - Resultados de glicose e xilose da hidrólise do bagaço	88

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Celulose	18
2.2. Hemicelulose	19
2.3. Lignina	21
2.4. Hidrólise enzimática da biomassa	23
2.5. Pré-tratamentos de biomassa	25
2.6. Utilização de microondas	28
2.7. Modificações no pH	28
2.8. Utilização de agentes oxidantes	29
2.9. Oxidação com persulfato de sódio	30
2.10. Derivados fenólicos	36
2.11. Derivados furânicos	38
2.12. Planejamento fatorial	39
3. OBJETIVO	40
4. MATERIAIS	41
4.1. Parte experimental	41
4.2. Detalhamento do planejamento fatorial	41
4.3. Preparo do bagaço para pré-tratamento	43
4.4. Aplicação de irradiação de microondas	43
4.5. Uso do bagaço após os pré-tratamentos	43
4.6. Hidrólise enzimática	44
4.7. Destinação dos resíduos	44
5. MÉTODOS	45
5.1. Variação de massa	45

5.2. Espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada	45
5.3. Termogravimetria.....	46
5.4. Análise de açúcares redutores totais	46
5.5. Análise de compostos fenólicos totais	46
5.6. Análise de fenol	47
5.7. Quantificação de glicose e xilose	47
5.8. Análise de furfural e hidroximetilfurfural	48
5.9. Determinação da atividade da enzima papel de filtro	49
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.1. Variação de massa do bagaço pré-tratado	50
6.2. Fenólicos totais liberados do pré-tratamento	52
6.3. Quantificação de fenol resultante do pré-tratamento	54
6.4. Açúcares redutores totais solubilizados no pré-tratamento	56
6.5. Determinação de hidroximetilfurfural e furfural	58
6.6. Análise estrutural por FTIR-ATR	60
6.6.1. Pré-tratamentos em meio alcalino.....	66
6.6.2. Pré-tratamentos em meio ácido	73
6.7. Análise termogravimétrica do bagaço pré-tratado.....	78
6.8. Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado.....	84
6.9. Quantificação de glicose e xilose	87
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8. CONCLUSÃO	93
9. REFERÊNCIAS	94

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui na matriz energética mais de 45,3% de sua produção proveniente de fontes como recursos hídricos, biomassa e etanol, energias eólicas e solares, sendo que as usinas hidrelétricas correspondem com mais de 75% da eletricidade (BRASIL, 2013).

A contribuição das usinas de cana de açúcar na matriz energética se dá por meio da produção de etanol e eletricidade, que de acordo a União da Indústria de Cana de Açúcar (Unica), o Brasil totalizou 11.250 MW de energia a partir da biomassa em termos de potência instalada (RICCI, 2013). No que tange ao etanol, a estimativa de produção é alcançar 37 bilhões de litros em 2015 (BRASIL, 2013).

Segundo o site da Raízen, a produção de etanol cresceu 3,9% na primeira quinzena de setembro de 2013, sendo que o acumulado da safra de 2013, a produção registra 17,24 bilhões de litros, crescimento de 25,93% em relação a igual período da safra anterior (RAÍZEN, 2013).

No que se refere à produção de açúcar, etanol e eletricidade a partir da cana de açúcar, o desenvolvimento do Brasil no setor sucroalcooleiro é considerado referência. No entanto, o setor pouco aperfeiçoa seus resíduos ao final do processo produtivo, no sentido de aumentar o desempenho do aproveitamento da matéria prima. O material residual mais abundante das usinas do Brasil é o bagaço de cana de açúcar, onde estudos apontam para a viabilidade de sua utilização para a produção de etanol de segunda geração ou etanol celulósico (GÓMEZ, 1985; REYES; PERALTA-ZAMORA; DURAN, 1998; SUN; CHENG, 2002; HAHN-HAGERDAL et al., 2006; PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007; ARRUDA et al., 2008; SANTOS; GOUVEIA, 2009; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010; HUBER; MAICHE, 2010; OGEDA; PETRI, 2010; CTBE, 2010; ZHANG et al., 2011; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

O etanol de primeira geração pode ser produzido pela fermentação alcoólica de açúcares extraídos principalmente da cana de açúcar, do milho, da beterraba, dentre outras. Outra via para a produção de etanol é pela hidrólise da biomassa celulósica possibilitando a liberação de açúcares fermentescíveis (OGEDA; PETRI, 2010).

A indústria Brasileira produziu em 2012 cerca de 580 milhões de toneladas de cana de açúcar e 174 milhões de toneladas de bagaço seco. Aproximadamente 90% do material foram queimados na geração de eletricidade e cerca de 16 milhões de toneladas de bagaço seco não teve uso direto. Considerando o elevado teor de carboidratos no bagaço, o material é uma matéria prima atraente para a produção de etanol celulósico, sendo potencialmente possível uma produção de 3,0 bilhões de litros ano (SOUZA, 2012).

Matérias primas lignocelulósicas como o bagaço são constituídas principalmente de três polímeros: celulose, hemicelulose e lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Os açúcares contidos nas frações celulósicas (glicose) e hemicelulósicas (xilose, arabinose, manose e galactose) podem ser utilizados na fermentação para a produção de etanol. (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010).

O Projeto Bioetanol (“Produção de Bioetanol através de Hidrólise Enzimática de Biomassa de Cana de Açúcar”), financiado pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) tem como meta viabilizar uma tecnologia para a conversão da celulose do bagaço a combustível etanol. O programa da FAPESP que também objetiva a produção de bioenergia no Brasil é o Programa BIOEN, o qual está voltado para aprimorar a produtividade do etanol brasileiro de 1ª e 2ª geração (OGEDA; PETRI, 2010).

Criado para contribuir com o Brasil na manutenção da liderança na produção de bioetanol, o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), vem buscando respostas nas pesquisas em desenvolvimento para concretizar o etanol celulósico (CTBE, 2010).

Dentre os estudos em andamento, a hidrólise enzimática da biomassa vem se destacando por minimizar problemas evidenciados pelas rotas químicas (produção de inibidores) (SUN; CHENG, 2002). O uso dos processos hidrolíticos, permitem ainda operações sustentáveis sob condições amenas de pH, temperatura, pressão e reaproveitamento da enzima (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010). Entretanto, para que a sacarificação enzimática seja eficiente, é preciso que as enzimas tenham acesso ao substrato, geralmente promovido por meio de um pré-tratamento da biomassa (PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007). Os processos por meio de hidrólise enzimática além de custosos, não são triviais devido às complexas interações entre lignina, hemicelulose e celulose presente na parede celular da biomassa vegetal (SANTOS; GOUVEIA, 2009). Devido à natureza cristalina de parte da celulose e à

barreira física formada por ligninas ao redor das fibras do bagaço, a hidrólise enzimática é um processo que pode ser inviabilizado se existir a formação de inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação (SANTOS; GOUVEIA, 2009; CAO et al., 2013).

Um dos aspectos importantes da rota hidrolítica, é a necessidade de remoção dos inibidores da enzima liberados durante o pré-tratamento, pois é essencial para que a produção do etanol de segunda geração se torne economicamente viável (ARRUDA et al., 2008; CAO et al., 2013).

Os produtos de degradação do bagaço que são potenciais inibidores da fermentação se agrupam em três categorias principais: derivados furânicos (furfural e hidroximetilfurfural (HMF)), ácidos orgânicos fracos (como ácido acético) e derivados fenólicos (SANTOS; GOUVEIA, 2009; CAO et al., 2013).

Pelo fato da hidrólise enzimática da biomassa não ser um processo trivial, o material sofre um pré-tratamento para separar a matriz de lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar a hemicelulose, obtendo um bagaço pré-tratado possível de ser hidrolisado enzimaticamente e obter açúcares fermentescíveis (GHOSE, 1987; OGEDA; PETRI, 2010). Os pré-tratamentos de biomassa não seletivos originam uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais tanto da hidrólise enzimática como da fermentação alcoólica (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos, podendo ser classificados de diferentes maneiras tais como pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes (GÓMEZ, 1985; GOULD, 1984; REYES; PERALTA-ZAMORA; DURAN, 1998; HOAREUA et al., 2004; MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006; ZHU et al., 2006, 2006; MARTIN et al; 2006; LIU et al., 2007; ZHANG, 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MIGUEL, 2009; HUBER; MAICHE, 2010; CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010; ZHANG et al., 2011; WHITE; CATALLO; LEGENDRE, 2011; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

Existem estudos de processos oxidativos avançados para o pré-tratamento da biomassa e produção de etanol de segunda geração. No entanto, se apresentam pouco viáveis, pois são considerados processos não seletivos para a biomassa, acarreta em altas taxas de produção de inibidores e perdas de carboidratos. Em sua grande maioria exigem ainda tratamento adequado do efluente gerado e do mosto que seguirá para a hidrólise enzimática (GOULD, 1984; GODSAY, 1985; BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001;

CHURSIN, 2007; ARRUDA et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; OGEDA; PETRI, 2010; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE 2012).

Deve-se destacar que são poucas as referências ao uso de persulfato de sódio nos processos de pré-tratamento de biomassa para sacarificação enzimática e produção de bioetanol. Boa parte da literatura aborda as reações oxidativas do persulfato voltadas para a área ambiental (BLOCK; BROWN; ROBINSON, 2004; LIUTTI, 2007; VORLOVÁ et al., 2006; LIU et al., 2012; SCOTT et al., 2013). Possivelmente a utilização do persulfato de sódio como oxidante poderia oxidar os compostos aromáticos da lignina e compostos fenólicos liberados, pois é muito utilizado para remediar, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), derivados de creosoto, cresóis, BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e fenol em sistemas ambientais (ITRC, 2005; LIUTTI, 2007; WILSON et al., 2013).

O conceito geral deste trabalho envolveu pré-tratar o bagaço integral de cana de açúcar e submetê-lo à hidrólise enzimática, dividindo-se em duas etapas gerais:

1. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com persulfato de sódio, utilizando radiação de microondas em meios químicos diferentes. Caracterização do pré-hidrolisado e avaliação estrutural do bagaço pré-tratado;
2. Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado com determinação da quantidade de carboidratos fermentescíveis liberados.

O bagaço de cana previamente homogeneizado foi submetido aos pré-tratamentos combinando a irradiação de microondas e persulfato de sódio, nas condições ácidas e alcalinas, na presença e ausência de ferro II (catalisador do oxidante).

Foi determinados o pH final da solução de pré-tratamento, a concentração de açúcares redutores totais (ART), compostos fenólicos totais (FT), fenol, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. No bagaço pré-tratado foram avaliadas as modificações estruturais por espectrometria no infravermelho (IR) e a estabilidade térmica por termogravimetria (TGA), além da variação de massa. Após a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, foram quantificados ART, glicose e xilose no hidrolisado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A biomassa vegetal para a produção de etanol pode ser obtida de diversas espécies pertencentes à família de angiospermas e gimnospermas. As angiospermas são plantas com sementes protegidas por uma estrutura denominada fruto e gimnospermas as sementes não inseridas em fruto. Contudo cada processo de produção deve ser adequado a cada tipo de biomassa, sua composição e disponibilidade (Tabela 1).

Muitas vezes a biomassa é chamada de material lignocelulósico, sendo composta de cadeias de celulose (polissacarídeo formado de glicose por ligações β -1,4-glicosídicas) unidas por ligações de hidrogênio, recobertas por hemiceluloses (polissacarídeos ramificados, formados principalmente por D-xilose) e ligninas (rede polifenólica polimérica interligada formada por unidades de fenilpropano).

O bagaço de cana é considerado uma biomassa lignocelulósica com teor reduzido de lignina e prontamente disponível na planta industrial para a produção de etanol (SANTOS; GOUVEIA, 2009; OGEDA; PETRI, 2010; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012). Além disso, os materiais lignocelulósicos de resíduos de culturas podem ser suficientemente abundantes para fornecer matéria prima para a produção de etanol celulósico (WYMAN; DALE; ELANDER, 2005).

Tabela 1 - Composição química de algumas biomassas lignocelulósicas com potencial para produção de bioetanol. Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	% CELULOSE	% HEMICELULOSE	% LIGNINA
Palha da cana	40	30	25
Bagaço de cana	48	24	23
Madeira dura	47	35	24
Madeira mole	44	29	25
Espiga de milho	45	35	15
Talo de milho	35	25	35
Forragem de milho	38	28	21

Pelo conceito de bagaço integral entende-se apenas o caule macerado, não incluindo a palha e os ponteiros, que representam 55% da energia acumulada no canavial. A energia contida em uma tonelada de bagaço, com 50% de umidade, corresponde a 2,85 GJ (DOS SANTOS et al., 2011).

O colmo da cana de açúcar constitui-se num sistema de duas fases: sólida e líquida, sendo a fase sólida um complexo composto de celulose, hemicelulose, lignina e pentose. Já a fase líquida (caldo), é uma solução aquosa contendo uma grande variedade de substâncias e aproximadamente mais de 90% são de sacarose. O bagaço recém-moído (bagaço integral) (varia com a qualidade da fibra) possui cerca de 50% de umidade, 45% de fibras lignocelulósicas e de 2 a 3% de sólidos solúveis (DOS SANTOS et al., 2011).

O bagaço de cana de açúcar não queimado em caldeiras pode ser fonte para a produção de bioetanol, polpa de papel, chapas aglutinadas, ração animal, furfural, compostos polifenólicos, resinas e afins. É importante também caracterizá-lo e conhecer as condições mais adequadas para a estocagem sem comprometer a reserva de carboidratos (DOS SANTOS et al., 2011).

O bagaço possui estrutura complexa que limita a eficiência da hidrólise enzimática e conversão a polissacarídeos fermentescíveis. Os pré-tratamentos devem além de economicamente viáveis, satisfazer a condição de ser possível a implantação em escala industrial sem demandar muitos investimentos para adequar a configuração da unidade produtora de etanol de primeira geração, que é onde se encontra de maneira imediata mais de 90% do bagaço de cana (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.1. Celulose

No caso da cana de açúcar a porcentagem de celulose devido às variedades é o que influencia diretamente nas propriedades de desintegração e moagem da cana, relacionados à qualidade da fibra.

A celulose é composta por subunidades de D-glicose unida por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ (Figura 1). Essas longas cadeias celulósicas são recobertas por hemicelulose, outros carboidratos e ácidos orgânicos, sendo este complexo ainda recoberto por lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; OGEDA; PETRI, 2010).

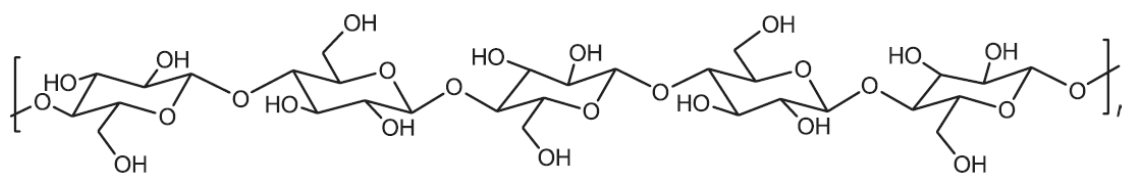


Figura 1 – Estrutura da fração celulósica. Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

As moléculas de celulose formam fibras elementares com características de regiões distintas que podem ser cristalinas ou amorfas, variando em características físico-químicas próprias. Microfibras cristalinas (mais ordenadas e resistentes) são compostas por cerca de 30 a 36 filamentos de celulose agregados lateralmente (unidirecional) através de forças de Van der Waal's e ligações de hidrogênio, que resulta em uma forte interação entre as moléculas. Já a microfibra amorfa é menos ordenada e mais susceptível a hidrólise enzimática (GÓMEZ, 1985).

As ligações de hidrogênio da região cristalina são responsáveis pela manutenção das regiões cristalinas e tornam a celulose altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática. É o principal fator que influencia as propriedades físicas da celulose, tais como solubilidade, reatividade e cristalinidade (SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

Estes agregados conferem elevada resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em um grande número de solventes, sendo que em condições normais a celulose é extremamente insolúvel em água (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010).

2.2. Hemicelulose

Ligadas a celulose e a lignina nos tecidos vegetais, a hemicelulose é o segundo componente mais abundante da parede celular composto basicamente por cinco açúcares da seguinte maneira:

- Hexoses: glicose, manose e galactose;
- Pentoses: xilose e arabinose.

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por um conjunto de xilose (D-xilose) e glicose, correspondente a 20% do total da parede celular (RUBIN, 2008). Esses polissacarídeos são formados por meio de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ e com ramificações de xilose sozinha (Figura 2), ou uma tríade de açúcares (HUBER; MAICHE, 2010).

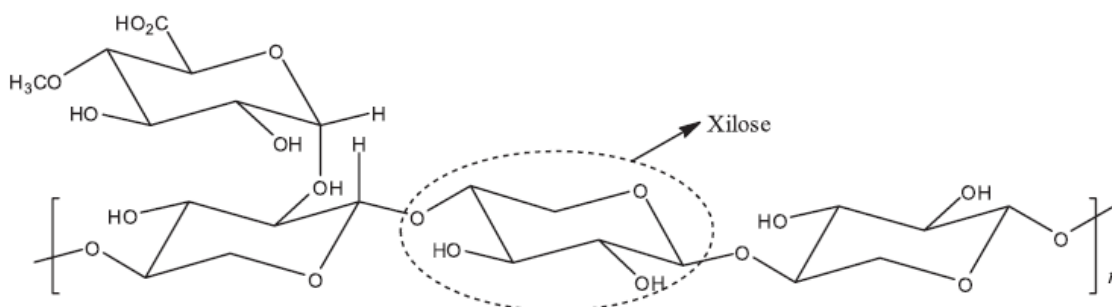


Figura 2 – Representação esquemática da hemicelulose. Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2012.

A camada de xilose ligada covalentemente com a lignina e a interação não covalente com a celulose é importante na manutenção da integridade da parede celular da planta, protegendo as fibras contra a degradação. Pelo menos dois tipos de ligações covalentes reticuladas foram identificados entre hemicelulose e lignina, conforme abaixo (ZHANG, 2008):

- Ligações de ácido ferúlico;
- Ligações ésteres.

A hemicelulose tem as ramificações das cadeias laterais curtas e constituídas de diferentes açúcares facilmente hidrolisáveis. Funciona como uma ligação entre a lignina e as fibras de celulose, dando mais rigidez a estrutura lignocelulósica sem comprometer a flexibilidade do tecido vegetal. A composição e a ligação das cadeias laterais determinam propriedades físicas e químicas, pois as interações entre a hemicelulose e a celulose são geralmente mais fortes do que as interações entre hemicelulose e lignina (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

O aumento da temperatura aumenta a solubilidade dos diferentes compostos de hemicelulose, sendo que a solubilidade em água segue a ordem decrescente: manose, xilose, glicose, arabinose e galactose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A solubilização dos componentes lignocelulósicos não só depende da temperatura, mas também de outros aspectos, como umidade e pH. Do material lignocelulósico, as hemiceluloses são os mais sensíveis a modificações térmicas e químicas. Durante o pré-tratamento térmico e químico os grupos laterais de hemicelulose reagem em primeiro momento, seguido pelas cadeias principais da hemicelulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A região de xilose da hemicelulose parece ser a parte que pode ser extraída mais facilmente em meio alcalino ou ácido, enquanto a região de glicose dificilmente pode ser extraída em meio ácido (SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

A hemicelulose é geralmente classificada de acordo com o resíduo de açúcar principal na estrutura, como por exemplo, xilana, manana e glucana (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A manana de xilose, por exemplo, representa um polímero linear com estrutura análoga a da celulose (OGEDA; PETRI, 2010).

Conhecendo as características físico-químicas do complexo hemicelulósico, é possível obter a partir desses polímeros vários compostos diferentes. A elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica do bagaço e a capacidade de sua assimilação por várias leveduras fomentam as pesquisas para seu aproveitamento em diferentes processos de bioconversão (ARRUDA et al., 2008).

2.3. Lignina

A lignina atribui revestimento e rigidez as fibras, sendo o único biopolímero aromático renovável. Trata-se de uma macromolécula polifenólica complexa, tridimensionalmente composta de unidades monoméricas que não se repetem de modo regular e não é homogênea (RUBIN, 2008). Possui regiões amorfas e estruturas globulares bem mais complexas que as frações de celulose e hemicelulose, sendo formada pela polimerização radicalar de unidades fenilpropano (álcool p-cumarílico, coniferílico e

sinapílico) (Figura 3) (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

Como a lignina está quimicamente ligada a hemicelulose, uma degradação parcial das hemiceluloses ocorre no processo de pré-tratamento químico (HUBER; MAICHE, 2010). A estrutura molecular da lignina é altamente resistente à hidrólise química e bioquímica e por ser um heteropolímero amorfo, não é solúvel em água, além de opticamente inativo.

A lignina assim como a hemicelulose, normalmente começa a se solubilizar na água em torno de 180 °C em condições neutras. A solubilidade da lignina em meio ácido, neutro ou alcalino depende do precursor da estrutura da lignina que varia conforme a espécie vegetal (Figura 3) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

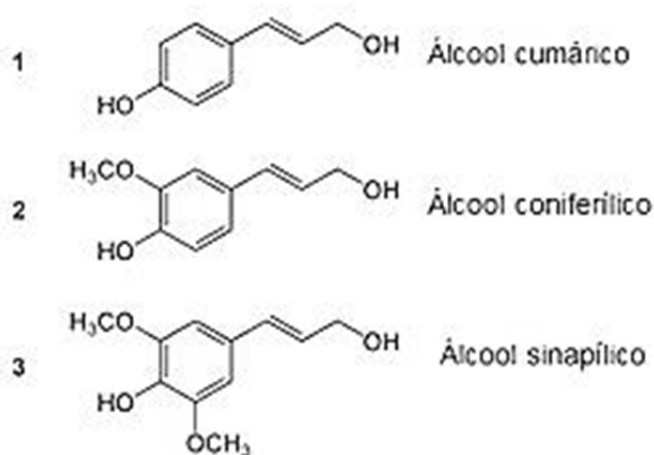


Figura 3 – Precursores da lignina.

Todos estes fatores fazem com que a degradação da lignina seja muito difícil, sendo que dentre suas funções principais está a proteção contra ação de microrganismos (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Existem vários modelos estruturais na literatura atribuídos à lignina, sendo que a constituição deste material pode variar de acordo com a localização no tecido vegetal e composição química, além de fatores relacionados ao manejo da cultura (Figura 4). Por exemplo, enquanto as paredes celulares de gramíneas apresentam menores teores de lignina, aquelas de madeiras de coníferas são as mais ricas em lignina (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010; SANTOS; DE QUEIRÓZ; COLODETTE, 2012).

A matriz aromática da lignina tende a ser suscetível a ataques por oxidantes fortes diretamente ou por mecanismos radiculares, muito embora os precursores aromáticos (anel aromático) não possam sofrer reações de oxidação direta e/ou adição (SOLOMONS; FRYHLE, 2001). Os oxidantes podem agir principalmente nas abstrações do hidrogênio periférico da estrutura exemplificada na Figura 4. Sendo assim as ligações de hidrogênio com a hemicelulose podem ser desestruturadas se o radical oxidante conseguir penetrar ainda ativo no interior do complexo.

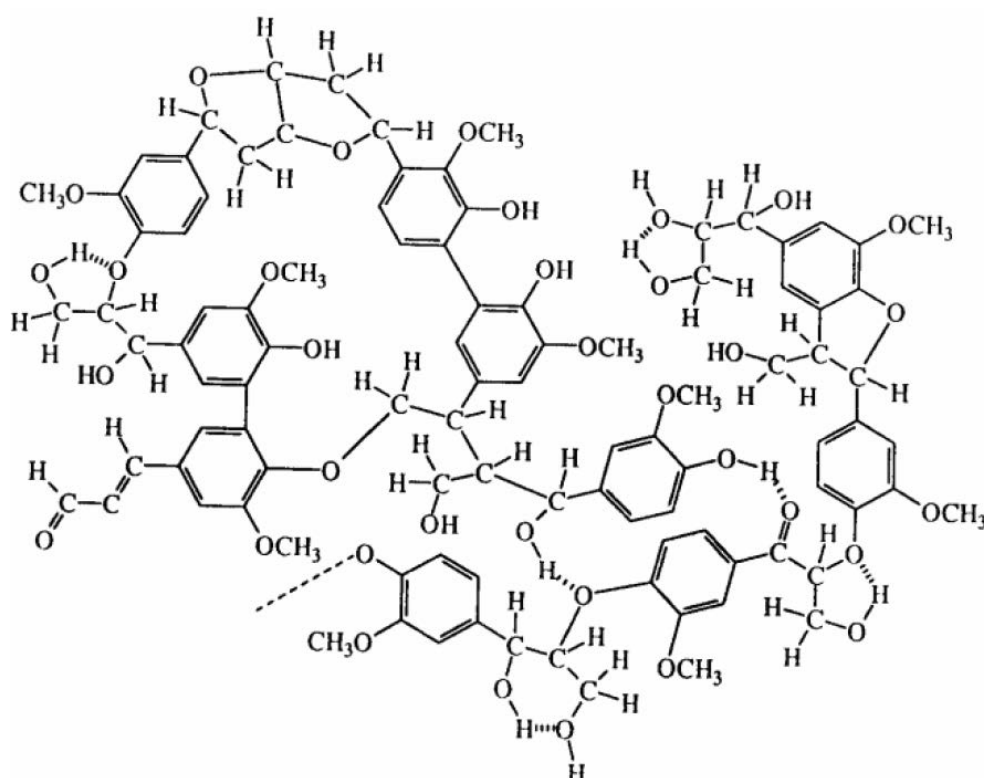


Figura 4 – Modelo estrutural proposto para a lignina de madeiras. Fonte: Adaptado de SOUZA, 2006.

2.4. Hidrólise enzimática da biomassa

A hidrólise enzimática da biomassa é realizada por enzimas celulasas, que são altamente específicas e comumente uma mistura de complexos enzimáticos que atuam de maneiras diferentes e em regiões distintas da celulose. As celulasas hidrolisam a celulose em celobiose (um dímero de glicose), que é subsequentemente clivado a glicose pela β -glicosidase (Figura 5).

As endoglucanases agem de forma aleatória clivando ligações betas dentro da molécula da celulose. As celobiohidrolases (exoglucanases) removem as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e a β -glicosidase cliva a celobiose em duas unidades de glicose (SANTOS; GOUVEIA, 2009). Por outro lado, a hidrólise enzimática não apropriada de lignina e hemicelulose pode levar a formação indesejável de compostos que tendem a reduzir a eficiência da fermentação alcoólica (OGEDA; PETRI, 2010).

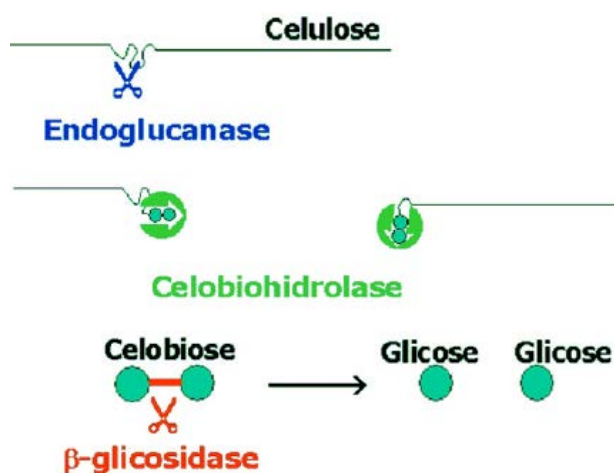


Figura 5 - Esquema da ação do complexo enzimático na celulose. Fonte: Adaptado de OGEDA et al., 2010.

A natureza cristalina da celulose e a barreira física formada por lignina ao redor das fibras celulósicas são obstáculos que podem ser transpostos por meio de processos de pré-tratamento para disponibilizar a celulose à sacarificação enzimática, que dependendo das condições empregadas é originada uma série de compostos indesejáveis (SANTOS; GOUVEIA, 2009). Dessa maneira é importante um pré-tratamento que possibilite rendimentos em açúcares fermentescíveis e concentrações baixas de inibidores (REYES; PERALTA-ZAMORA; DURAN, 1998).

Segundo a enzimologista Prof. Dra. Elba Bon (2010), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), um pré-tratamento eficiente é aquele que não geram resíduos e ainda mantém a estrutura orgânica da celulose, hemicelulose e lignina. Segundo ela ainda, quando se altera a composição destes materiais é possível que o rendimento nas etapas seguintes de hidrólise e fermentação seja inferior (CTBE, 2010).

A hidrólise enzimática do material lignocelulósico é limitada por vários fatores, sendo que a cristalinidade da celulose é apenas um dos fatores. Outros fatores são grau de polimerização (DP), teor de umidade, a área de superfície disponível e teor de lignina (SUN; CHENG, 2002).

O tamanho da partícula da superfície disponível afeta a taxa e extensão da hidrólise, sendo que a relação do tamanho dos poros do substrato em relação ao tamanho das enzimas é o principal fator limitante na hidrólise enzimática da biomassa. Diminuir o tamanho médio dos poros do substrato aumenta a remoção da hemicelulose e a probabilidade de se obter um hidrolisado de celulose mais apropriado. Já a secagem do material lignocelulósico pré-tratado pode causar um colapso na estrutura dos poros, resultando na diminuição da atividade enzimática das celulasas se a área interna for muito maior do que a área externa do material (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

2.5. Pré-tratamentos de biomassa

Embora possa ser conduzido por princípios bastante variados, tem por finalidades alterar ou remover a lignina e/ou hemicelulose, aumentar a área superficial e diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose. O que acarreta no aumento da ação efetiva da enzima e um aumento no rendimento da obtenção de açúcares fermentescíveis (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010).

Existem diversas opções para o processo de produção de etanol celulósico. Entretanto, tem que ser economicamente viável, além pré-requisitar investimentos moderados nas plantas atuais das indústrias, que independentemente de qual pré-tratamento seja escolhido, deve satisfazer algumas condições primordiais (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; ALVIRA et al., 2009):

- Reduzir operações de preparo da matéria prima lignocelulósica;
- Reduzir dependência de recursos hídricos;
- Reduzir perdas de substrato fermentescível;

- Promover eficiente polimerização da celulose e hemicelulose em açúcares solúveis;
- Baixa concentração de inibidores da hidrólise e da fermentação;
- Fermentação eficiente do hidrolisado misto de hexoses e pentoses;
- Permitir a integração avançada do processo de pré-tratamento e hidrólise enzimática;
- Ser um processo não dependente de reagentes sazonais;
- Minimizar a demanda de correção do meio submetido à hidrólise enzimática;
- Minimizar a demanda de energia no processo;
- Formação mínima de resíduos e efluentes.

As reações de oxidação com persulfato resultam basicamente em dióxido de carbono e água, sendo gerado ainda na mistura sulfato. Segundo o Anexo X da Portaria Nº 2914 de 12 de dezembro de 2011, do Ministério da Saúde, o valor máximo permitido de sulfato para o padrão de potabilidade da água é de 250 mg/L (MS, 2011).

Alguns pré-tratamentos da biomassa resultam em uma fibra pré-tratada mais apropriada para a sacarificação (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010). Porém, na grande maioria é necessário etapas de detoxificação dos compostos inibidores da hidrólise enzimática e da fermentação alcoólica, resultando em perdas de carboidratos de interesse (ARRUDA et al., 2008; CAO et al., 2013). Quando a estratégia é apenas a remoção dos inibidores do meio com transferência de fase apenas, implica no manejo adicional de disposição do resíduo, tais como os compostos fenólicos. De acordo com os Valores Orientadores para Solo e Água Subterrânea do Estado de São Paulo, o valor de intervenção para água subterrânea para fenol é 140 µg/L (CETESB, 2005).

Uma comparação dos métodos de pré-tratamentos conhecidos é difícil devido às variações de como os rendimentos são relatados e quais açúcares estão incluídos (GOULD, 1984; LIU et al., 2007; MIGUEL, 2009; CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010; ZHANG et al., 2011). A tabela a seguir apresenta as vantagens e desvantagens de alguns deles, sendo que os processos de pré-tratamento ácidos, alcalinos e por explosão a vapor são mais bem difundidos.

Tabela 2 - Comparativo de diversos métodos de pré-tratamento. Fonte: adaptado de OGEDA et al., 2010; SANTOS et al., 2012.

MÉTODO	CELULOSE	HEMICELULOSE	LIGNINA	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Ácido diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção ocorre mudança na estrutura	Alto rendimento de glicose e xilose	Formação de produtos de degradação e corrosão
Ácido concentrado	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca despolimerização	Alto rendimento de glicose e xilose, pouca formação de inibidores	Formação de produtos de degradação e corrosão
Hidróxido de sódio	Inchaço significativo	Considerável solubilidade	> 50% de solubilização	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro e recuperação complicada
Hidróxido de cálcio	Pouca despolimerização	Considerável solubilidade	Aproximadamente 40% de solubilização	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Pouca solubilidade da cal
Organosolv	Inchaço significativo	Significativa solubilização	Significativa solubilização	Efetiva remoção de lignina e alta produção de xilose	Reagente caro e recuperação complicada
Ozonólise	Não foi observada despolimerização	Pouca solubilização	> 70% de solubilização	Efetiva remoção de lignina em condições suaves	Reagente caro e recuperação complicada
Explosão a vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção ocorre mudança na estrutura	Energia eficiente, altos rendimentos de glicose e xilose	Formação de produtos de degradação e necessidade de etapa de remoção de lignina
Biológico	de 20% a 30% de despolimerização	> 80% de solubilização	Aproximadamente 40% de solubilização	Pré-tratamento brando e considerável remoção de lignina	Perda de celulose e baixa taxa de hidrólise
Oxidação úmida alcalina	Pouca despolimerização	Considerável solubilidade	> 80% de solubilização	Formação mínima de inibidores, remoção eficiente de lignina	Custo de oxigênio e catalisador (Na_2CO_3)

2.6. Utilização de microondas

O pré-tratamento pode ainda ser associado a energias de alta frequência como a irradiação de microondas, pois possibilitam rápido aquecimento do meio aquoso e das moléculas de água intrínsecas da biomassa (MARTIN et al., 2006; LIU et al., 2007; MIGUEL, 2009).

O aquecimento do material por irradiação com microondas se dá devido à interação da onda eletromagnética com o dipolo elétrico da molécula de água. A irradiação de microondas atua provocando um intenso movimento rotacional e calor térmico sem degradação aparente da matriz de carboidratos, essencial para a sacarificação enzimática do complexo lignohemicelulósico (SANSEVERINO, 2002; SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006; ZHU et al., 2006).

2.7. Modificações no pH

Frequentemente são utilizados ácidos e bases associados a outras técnicas nas etapas de pré-tratamento do bagaço (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010). Bons resultados com pré-tratamentos ácidos são mais bem conhecidos, e geram inibidores provenientes da degradação de carboidratos (HMF e furfural) e da lignina (compostos fenólicos). Exige ainda correção química do pré-hidrolisado, detoxificação dos produtos inibidores, além de tratamento dos efluentes (CAO et al.; 2013).

Alguns estudos apontaram que o uso alcalino inicialmente causaria o inchaço da biomassa que poderia facilitar o acesso das enzimas ao substrato e consequentemente aumentar a solubilização da lignina e parcialmente a hemicelulose, bem como modificações estruturais da cristalinidade da celulose (GOULD, 1984; MARTIN et al., 2006; MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006; ZHU et al. 2006, 2006).

2.8. Utilização de agentes oxidantes

A ação de agentes oxidantes em meio aquoso como o cloro, hipoclorito e dióxido de cloro, consistem basicamente na reação com a lignina formando compostos solúveis (WILSON et al., 2013). O bagaço é bastante reativo frente a agentes oxidantes fortes como o permanganato de potássio, ácido crômico, peróxido de hidrogênio, peróxido de sódio e ácido nítrico concentrado. Estes agentes não dissolvem somente a lignina, mas também parte dos carboidratos, com formação de grupos carbonílicos e carboxílicos (GOULD, 1984; GODSAY, 1985). A ação do ácido periódico, por exemplo, diferem dos demais agentes oxidantes, pois dissolve os polissacarídeos deixando como resíduo a lignina (periodato de lignina) (KLOCK, 2003).

A oxidação da lignina com nitrobenzeno e óxido de cobre, em soluções alcalinas, permite obter vanilina a partir de coníferas e siringialdeído a partir de folhosas, que são considerados inibidores da hidrólise enzimática (CAO et al., 2013). Soluções aquosas de xilenosulfonato de sódio, salicilato de sódio e benzoato de sódio dissolvem a maior parte da lignina de folhosas, mas em menor quantidade quando se trata materiais provenientes de coníferas (KLOCK, 2003).

Dois sais são particularmente interessantes devido a sua utilização comercial na produção de celulose, o sulfeto de sódio e o sulfito de sódio, além dos radicais HS^- e HSO_3^- que são efetivos agentes deslignificantes (QUESADA; RUBIO; GÓMEZ, 1997; BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001; SILVA; SILVA, 2002).

Durante o pré-tratamento oxidativo várias reações podem ocorrer como substituição eletrofílica, o deslocamento de cadeias laterais, a clivagem de ligações éter de alquilo ou arilo, ou a clivagem oxidativa de núcleos aromáticos. Em muitos casos o oxidante utilizado não é seletivo e ocasiona perdas de celulose e hemicelulose, existindo ainda um alto risco de formação de inibidores (MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006).

Estudos utilizando ácido peracético à temperatura ambiente demonstraram oxidação seletiva da lignina e sem perdas significativas de carboidratos. A hidrólise enzimática da celulose variou de 7% (bagaço sem pré-tratamento) até 98% (bagaço pré-tratado). Resultados similares para a digestibilidade em usar uma sequência de NaOH e

ácido peracético à temperatura ambiente foram superiores em comparação com temperaturas altas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Utilizando ácido peracético ainda, alguns estudos apontaram possíveis reações com a lignina residual por meio de dois mecanismos principais: reações de substituição/adição eletrofílica e reações nucleofílicas. O ácido peracético, em meio ácido, é considerado um agente deslignificante altamente seletivo por oxidar estruturas ricas em elétrons (anéis aromáticos da lignina) formando estruturas mais reativas do que as estruturas iniciais (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001).

As cadeias laterais da lignina reagem com os perácidos por reações eletrofílicas, como a quebra de ligações éter β -arila, responsáveis pela conexão das unidades arilpropanóides da lignina em sua estrutura macromolecular (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001).

Já em estudos com H_2O_2 não ocorreram deslignificação substancial com o pH abaixo de 10 e não resultou em eficácia real sobre a digestibilidade enzimática a um pH de 12,5 ou superior, sendo o máximo observado em pH 11,5. Ainda de acordo com GOULD (1984), a deslignificação é provavelmente causada pelo radical hidroxila, que é um produto da decomposição do peróxido de hidrogênio na faixa de pH 11,5-11,6, sendo metade da lignina solubilizada desta maneira na temperatura de cerca de 25 °C e com duração de 18-24h (GOULD, 1984).

2.9. Oxidação com persulfato de sódio

O persulfato pode ser uma alternativa interessante para o pré-tratamento do bagaço, pois é facilmente comercializado e não existem restrições legais de controle relacionadas à comercialização e transporte por parte da Polícia Civil ou Federal.

Segundo informações das empresas ArcSul e Multichemie que comercializam o persulfato, dependendo da origem do produto o preço pode variar de U\$ 1,78 à U\$ 2,68 por kg. De uma maneira geral, as importações da China e em seguida a dos EUA são mais baratas do que o produto nacional. As importações em Euro do oxidante proveniente da Alemanha, Itália e Rússia não são economicamente atrativas.

O persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) é um dos reagentes mais utilizados para oxidação química em remediação de sistemas ambientais, sendo muito utilizado também na área cosmética, têxtil e tintas, ou ainda como iniciador de polimerização. Para tratamentos ambientais e/ou indústria alimentícia, o persulfato de potássio e o persulfato de amônia não são utilizados devido à baixa solubilidade em água e a liberação NH_3 durante as reações. O sal é um sólido branco na temperatura e pressão ambiente, e com solubilidade dependente da temperatura (Figura 6).

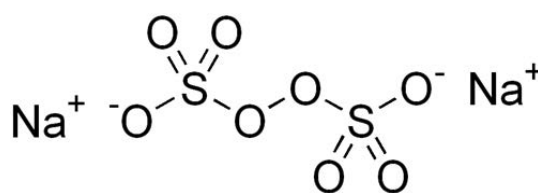


Figura 6 – Estrutura molecular do persulfato de sódio. Fonte: Adaptado de WILSON et al., 2013.

A oxidação de compostos orgânicos com persulfato é muito complexa devido a uma série de reações envolvidas, sendo que cada um delas sofre a influenciada de vários fatores como o pH, temperatura, matriz que se pretende oxidar, dentre outros fatores. Reações de oxidação conhecidas relacionadas com persulfato incluem tanto a oxidação direta quanto as reações de oxidação por radicais. A dissociação do sal de persulfato em meio aquoso libera ânions de persulfato, que por si só possui significativo potencial de oxidação, embora a cinética de reação de oxidação com os compostos de interesse seja mais lenta se compararmos com o peróxido de hidrogênio (SCOTT et al., 2013; WILSON et al., 2013).



O persulfato reage diretamente com muitos materiais orgânicos por meio de uma transferência de elétrons num processo conhecido como oxidação direta. O persulfato é considerado um poderoso oxidante direto, uma vez que tem um potencial padrão de oxidação teórico de 2,0 V (reação 01), semelhante ao do ozônio (2,1 V) e maior do que a do peróxido de hidrogênio (1,8 V), percarbonato de sódio (1,8 V) e permanganato (1,7 V) (WILSON et al., 2013).

Este forte potencial oxidante do persulfato faz com que a oxidação de muitos orgânicos seja termodinamicamente favorável. Na verdade, a oxidação direta de compostos orgânicos com persulfato, na qual dois elétrons são transferidos simultaneamente (reação 01), tem sido demonstrado que se processa a taxas cineticamente lentas (BLOCK; BROWN; ROBINSON, 2004; WILSON et al., 2013).

Além da oxidação direta, o persulfato de sódio pode ser induzido para formar radicais sulfatos, reagindo por mecanismos radicalares similares ao mecanismo do radical hidroxila gerado pela química Fenton. A geração de radicais sulfatos pode ser representada genericamente pela seguinte reação:



O persulfato torna-se uma espécie paramagnética ao reagir com outro composto. Esta espécie é muito reativa frente a outros compostos, além de serem instáveis e de difícil detecção (WILSON et al., 2013).

Espécies de radicais dentro de uma série de propagação podem ser inorgânicos ou radicais orgânicos gerados por transferência de elétrons (WILSON et al., 2013). Muito do entendimento da formação de radicais está relacionado à propagação e ao tempo de meia vida, sendo que os radicais mais comuns gerados por persulfato em condições específicas são o radical sulfato e o hidroxila conforme reações 03 e 04.



O radical sulfato é uma das espécies oxidantes mais potentes em meio aquoso com um potencial de oxidação estimado em 2,6 V, similar ao do radical hidroxila (2,7 V). Os radicais sulfatos têm várias vantagens em relação a outros sistemas oxidantes, pois além de cineticamente mais rápido em relação a oxidação direta, é mais estável que a radical hidroxila devido ao híbrido de ressonância formado (Figura 7) (BLOCK; BROWN; ROBINSON, 2004; WILSON et al., 2013). Consequentemente é capaz de prolongar a propagação radicalar e permitir a distribuição mais efetiva do oxidante pelos poros do material do bagaço, possibilitando a melhor eficácia da oxidação dos grupamentos aromáticos da lignina.

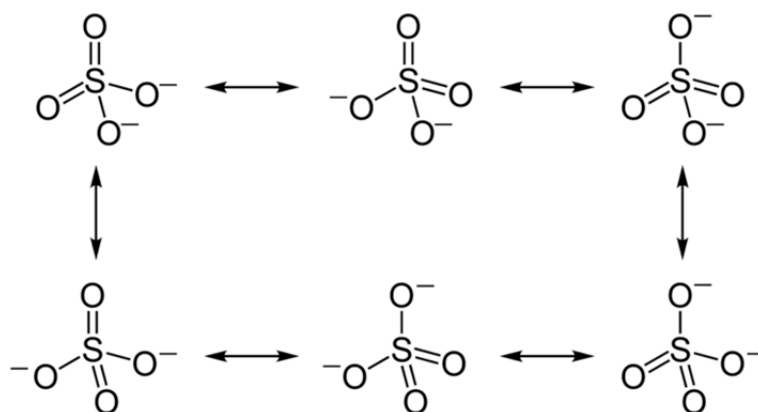


Figura 7 - Híbrido de ressonância do radical sulfato.

As pesquisas realizadas na área ambiental sobre os radicais a partir do persulfato centrou-se sobre o impacto do radical sulfato e hidroxila sobre as espécies poliaromáticas. Contudo, outras espécies de radicais também parecem desempenhar um papel importante, por teoricamente estarem presentes no meio reacional, como perhidroxil ($\text{HO}_2^\bullet$), e na presença de oxigênio dissolvido o superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Estes radicais primários reagem com outros compostos muito rapidamente por meio de uma variedade de mecanismos, que incluem a transferência de elétrons da reação direta, adição de elétrons a ligações duplas e subtração de hidrogênio (WILSON et al., 2013).

O persulfato de sódio reduz o pH do meio ($\text{pK}_a = 6,0$ (solução 1%)), sendo que não é ideal que o meio final do pré-tratamento seja extremamente ácido, pois o pH pode ser determinante para o processo de sacarificação enzimático. O pH final dos pré-tratamentos não pode possibilitar a formação de compostos inibidores da atividade enzimática e da fermentação alcoólica, pois é sabido que o caminho de pré-tratamento com oxidantes possibilita a formação de tais inibidores.

Dependendo do pH do meio, algumas reações predominantes com o persulfato podem ocorrer, como as que seguem:

1. Reação em função do pH neutro:



2. Em função do meio levemente ácido (ácido diluído de pH 5-7):



3. Em função do meio alcalino (pH>11):



4. As reações esperadas para o meio à medida que tornar-se levemente ácido:



O ânion persulfato em meio ácido forte se transforma em radicais sulfatos conforme as reações abaixo:



Os agentes utilizados para ativação de persulfato incluem-se o uso de ferro II, calor, peróxido de hidrogênio e álcalis. A forma mais simples ativação do persulfato consiste em se trabalhar acima de 20°C, sendo que na faixa de 40 a 99°C a probabilidade da formação de radicais é maior, as quais podem facilmente ser atingíveis em um curto intervalo de tempo com o uso da irradiação de microondas no meio aquoso (WILSON et al., 2013). A ativação térmica prossegue por meio da seguinte reação, onde o calor decompõe o persulfato em dois radicais sulfatos por meio de uma cisão homolítica.



Para a ativação por catalisadores de metal de transição, o íon ferro II é o ativador mais comum. A adição de ferro II em excesso, pode levar a uma rápida decomposição do persulfato e perda de desempenho. Contudo, cabe ressaltar que o ferro II é consequentemente oxidado pelo persulfato a ferro III, que em pH acima de 4,0 é insolúvel conforme as reações abaixo (BLOCK; BROWN; ROBINSON, 2004) (ITRC, 2005):



O ferro II quando misturados com persulfato pode doar elétrons para a formação do radical sulfato, embora os mecanismos de reação não sejam bem compreendidos (WILSON et al., 2013). Para manter a ativação de ferro II da solução de persulfato deve-se manter o pH menor que três.

Em $\text{pH} > 11$ o persulfato forma radical sulfato sem ser uma consequência de um efeito catalítico conforme reação 04. A propagação radicalar continua por meio da formação de radicais hidroxilas. E nestas condições a ativação alcalina é muito funcional para gerar o sulfato primário e radical hidroxila, sendo que a própria hidrólise alcalina pode auxiliar na quebra de alguns compostos orgânicos (WILSON et al., 2013).

A ativação alcalina parece ser possível com várias bases diferentes, porém cada base tem relação estequiométrica com a massa de oxidante própria necessário para oxidar o composto orgânico alvo. Como há uma grande estabilidade energética associada aos compostos aromáticos da lignina, o anel aromático perde hidrogênios da molécula na presença de agente oxidante forte e a aromaticidade é restaurada. O resultado é a substituição de um hidrogênio do anel por um eletrófilo¹ e não a quebra da cadeia aromática (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

A reação dos núcleos aromáticos da lignina para formar um derivado de substituição tem uma ΔG_o ² muito próxima a zero, ou seja, termodinamicamente mais favorável. Já para formar um derivado de adição não aromático e quebra da cadeia, a reação é endergônica, necessitando de bastante energia no sistema para obter tal reação de adição ao anel. Consequentemente, compostos aromáticos sofrem preferencialmente reações de substituição eletrofílica.

Os possíveis ligantes das reações de substituição eletrofílica dos anéis aromáticos da biomassa na presença de persulfato podem ser sulfato ou hidroxila, sendo que a detecção de compostos fenólicos como resultante do pré-tratamento pode estar relacionado à formação de destes compostos em presença de um excesso de hidroxilas e não ser necessariamente proveniente da oxidação não seletiva da matriz de lignina (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001; LIUTTI, 2007; LIU, 2012).

¹ Um eletrófilo é um reativo químico atraído até zonas ricas em elétrons que participa em uma reação química aceitando um par de elétrons, formando uma ligação com um nucleófilo.

² Energia Livre de Gibbs.

Como exemplo, estudos sugerem que as reações do ácido peracético com a lignina envolvem a hidroxilação eletrofílica de posições ativadas do anel aromático (*orto* e *para* aos grupos oxigenados), muito provavelmente sendo a etapa determinante da velocidade da reação oxidativa (Figura 8). Outros estudos ainda propõem que a hidroxilação ocorre efetivamente por transferência do grupo OH^+ do perácido e não por meio de radicais hidroxilas (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001; LIU, 2012).

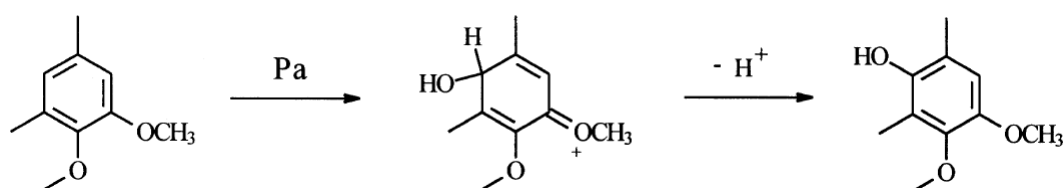


Figura 8 – Exemplo de hidroxilação de estruturas aromáticas com ácido peracético. Fonte: Adaptado de Brasileiro et al., 2001.

Na substituição eletrofílica dos anéis aromáticos da lignina, novos grupos hidroxílicos são formados, aumentando a reatividade da lignina residual para as reações posteriores com os perácidos e outros oxidantes. As reações propostas podem levar à despolimerização da molécula de lignina, acompanhada da formação de hidroxilas fenólicas e de grupos carbonílicos (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Existe a possibilidade da reação do persulfato com os centros aromáticos da lignina gerar moléculas fenólicas, que podem ser possíveis intermediários das reações com os radicais sulfatos, principalmente na disponibilidade de hidroxilas (LIU, 2012). Todavia, não são esperadas concentrações elevadas de compostos fenólicos no meio reacional que contém persulfato de sódio, nem mesmo concentração propriamente de fenol, visto que o composto é muito utilizado para a degradação destes em sistemas ambientais (LIUTTI, 2007).

2.10. Derivados fenólicos

As concentrações de compostos fenólicos podem ser consideradas um indicador positivo do grau de severidade do pré-tratamento químico na remoção da lignina. Porém,

também se considera um indicador negativo, pois é sabido de seu efeito inibidor (HAHN-HAGERDAL et al., 2006; XIMENES et al., 2010).

O efeito inibitório da hidrólise enzimática foi observado por Kim et al. (2011), quando se aumenta a concentração de biomassa pré-tratada e resulta na diminuição da conversão de celulose em glicose, mesmo mantida constante a proporção de enzima. Segundo o estudo, a atividade máxima da enzima ocorreu quando os fenólicos foram removidos. Sendo assim, a remoção de fenólicos pode reduzir o consumo de enzima e reduzir os custos (XIMENES et al.; 2010; KIM et al., 2011).

O efeito inibitório dos fenólicos nas fermentações de hidrolisados está relacionado à perda da integridade da membrana biológica dos microrganismos com consequente diminuição do papel de barreira seletiva, sendo atenuada a inibição da fermentação alcoólica quando monômeros fenólicos são removidos do hidrolisado proveniente de um pré-tratamento de hidrólise química. Os compostos fenólicos foram mencionados, por exemplo, como inibidores da bioconversão da xilose a xilitol, por meio da ação individual do derivado fenólico ou pela interação sinérgica entre ele e outros compostos presentes nos hidrolisados como o furfural, (HMF) e o ácido acético (KLINKE et al., 2002; ARRUDA et al., 2008).

Arruda et al. (2008) avaliou dois procedimentos de detoxificação do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar: ajuste de pH combinado à adsorção em carvão ativo e floculação por polímero de origem vegetal, sendo que ambos os tratamentos resultaram em redução da concentração de fenólicos totais para 1,11 g/L (ajuste de pH) e 2,62 g/L (floculação), ainda bem superiores à considerada inibitória, uma vez que a presença de somente 50 mg/L de fenólicos no meio semissintético inibiu drasticamente a fermentabilidade do hidrolisado com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 (ARRUDA et al., 2008; SINGH; SINGH; CHANDRA, 2009; KIM et al., 2011).

Mesmo em baixas concentrações os compostos fenólicos solubilizados são fortemente inibidores da celulase, podendo ainda precipitar e/ou desativar a β -glicosidase, reduzir tanto a taxa quanto os rendimentos da hidrólise enzimática da celulose (KIM et al., 2011).

Vale lembrar que os compostos fenólicos incluem também alguns álcoois, aldeídos, cetonas e ácidos, sendo que não são produtos finais de alguns pré-tratamentos,

como oxidação úmida, pois eles são posteriormente degradados a ácidos carboxílicos (ALVIRA et al., 2009).

2.11. Derivados furânicos

A hidrólise ácida de pentoses e de celulose pode produzir furfural e hidroxitilfurfural (HMF) respectivamente (RIBEIRO; CARVALHO; GERIS, 2012).

O furfural é um aldeído heterocíclico e aromático e um importante inibidor a partir do hidrolisado de hemicelulose, que mesmo a baixas concentrações (3-15 mmol/L), pode afetar severamente a taxa de produção de etanol. Várias bactérias e leveduras foram relatadas para converter parcialmente o furfural a álcool furfurílico, ácido furóico, ou uma combinação de ambos (PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007).

O HMF normalmente é um indicador de qualidade de alimentos que contêm carboidratos, sendo que sua presença em alimentos é resultante de temperaturas inadequadas durante o processamento térmico e armazenamento inadequado de longo prazo (VORLOVÁ et al., 2006). Este aldeído cíclico é formado como resultado das reações de Maillard, sendo que em meio ácidos, HMF decompõe-se parcialmente a ácido levulínico e ácido fórmico (VORLOVÁ et al., 2006). Tanto no meio ácido quanto alcalino, o açúcar redutor se isomeriza e enoliza. Numa segunda etapa em meio ácido, desidrata e forma o HMF ou no meio alcalino se fragmenta em compostos lábeis. Estas reações dependem da presença do açúcar redutor que fornece o grupamento carbonila C=O proveniente de um aldeído ou de uma cetona do carboidrato liberado pelos pré-tratamentos (VORLOVÁ et al., 2006; ALVIRA et al., 2009).

A formação de HMF não está limitada a produtos alimentares de elevado teor de carboidratos redutores ou proteínas, pode ser encontrado nos pré-hidrolisados de pré-tratamentos ácidos de bagaço de cana ou em hidrolisados proveniente de hidrólise química (VORLOVÁ et al., 2006; CAO et al., 2013). Entretanto, a produção de furfural e HMF é menor dependendo do pré-tratamento empregado, tais como a oxidação úmida quando se compara com vapor explosão ou *liquid hot water* (LHW) (ALVIRA et al., 2009; XIMENES et al., 2010).

Para este estudo não era esperada a ocorrência da formação destes compostos por desidratação, pois os pré-tratamentos foram conduzidos no forno de microondas em meio aquoso, acoplado a um sistema de refluxo para evitar evaporação da água.

2.12. Planejamento fatorial

O uso dos procedimentos multivariados de planejamento experimental, como o planejamento fatorial, permite avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um reduzido do número de experimentos (LOPES et al., 2005; CUNICO et al., 2008). O planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em réplica todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável serão investigadas.

Os níveis são normalmente codificados com os sinais **(+)** e **(-)**, sendo que a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados (LOPES et al., 2005). Cabe ressaltar que é necessário um conhecimento prévio do sistema em estudo para estabelecer a seleção das variáveis empregadas no estudo, assim como dos níveis ensaiados e a resposta esperada (CUNICO et al., 2008).

3. OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi estudar os pré-tratamento de bagaço de cana com persulfato de sódio e irradiação de microondas, no meio ácido, alcalino e catalisado com cloreto ferroso, para obtenção de substrato para a hidrólise enzimática como etapa da obtenção de etanol celulósico. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Experimentar pré-tratamentos para bagaço de cana
- Quantificar açúcares redutores totais no líquido do pré-tratado.
- Quantificar compostos fenólicos totais no líquido do pré-tratado.
- Quantificar a presença de fenol no líquido do pré-tratado.
- Quantificar furânicos derivados da degradação de carboidratos no líquido do pré-tratado.
- Avaliar o impacto do pré-tratamento sobre a estrutura química do bagaço de cana de açúcar em relação ao *in natura*.
- Avaliar termicamente o impacto do pré-tratamento sobre a estrutura do bagaço de cana de açúcar em relação ao *in natura*.
- Avaliar a ação de enzima ligno-hemicelulolítica comercial sobre o bagaço de cana pré-tratado de acordo com o teor de ART liberados, glicose e xilose em relação ao bagaço *in natura*.

4. MATERIAIS

Para o preparo das soluções teste adicionadas nos pré-tratamentos do bagaço de cana, foram utilizados reagentes P.A. com 99% de pureza. As soluções destes reagentes tiveram o pH inicial aferido, pois determinavam o pH inicial de cada pré-tratamento.

4.1. Parte experimental

A parte experimental foi desenvolvida com base em um planejamento fatorial estruturado de maneira a avaliar as combinações das variáveis propostas, sendo considerada para a definição dos níveis a presença e ausência dos reagentes testados nos pré-tratamentos do bagaço. Ressalva-se que apenas a variável tempo de irradiação microondas esteve presente nos dois níveis planejados para os experimentos.

4.2. Detalhamento do planejamento fatorial

O planejamento fatorial foi do tipo 2K, com dois níveis para cada fator, um inferior (-) e um superior (+). Para cada variável foi atribuído um código (ID), conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Detalhamento das variáveis e níveis experimentais.

VARIÁVEL	UNIDADE NÍVEL	VOLUME ADICIONADO	ID*	pH	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)	mol/L	10 mL	A	0,53	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)	mol/L	10 mL	B	10,89	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)	mol/L	10 mL	Fe II	1,14	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)	mol/L	20 mL	OX	1,01	0	0,1
Tempo de microondas	min	NA**	M	NA	0,5	3,0

*Código de identificação de cada variável.

** NA = Não se aplica.

Cabe ressaltar que a combinação da variável **(B)** não poderá ser testada com a variável concentração **(Fe II)**, pois na presença de persulfato, o ferro II se oxidaria a ferro III, que consequentemente precipitaria em pH alcalino, sendo indesejável esta reação. Logo foram realizados dois planejamentos diferentes:

- Para o meio ácido (experimentos de 1 a 16): $2^4 = 16$
- Para o meio alcalino (experimentos de 13 a 20): $2^3 = 8$

Os experimentos foram realizados em duplicatas. A

Tabela 4 apresenta o detalhamento do planejamento dos experimentos para a melhor compreensão das condições experimentais, na qual é possível verificar que os experimentos 13, 14, 15 e 16 são comuns ao meio ácido e alcalino, pois os experimentos 13 e 14 correspondem à avaliação da resposta provocada apenas pela presença do oxidante e os experimentos 15 e 16 corresponde à avaliação da resposta provocada apenas pela variação do tempo de irradiação de microondas.

Tabela 4 – Detalhamento das variáveis de cada experimento.

	EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M
Meio ácido - Experimento de 1 a 16	1	+	-	+	+	+
	2	+	-	+	+	-
	3	+	-	+	-	+
	4	+	-	+	-	-
	5	+	-	-	+	+
	6	+	-	-	+	-
	7	+	-	-	-	+
	8	+	-	-	-	-
	9	-	-	+	+	+
	10	-	-	+	+	-
	11	-	-	+	-	+
	12	-	-	+	-	-
	13	-	-	-	+	+
	14	-	-	-	+	-
	15	-	-	-	-	+
	16	-	-	-	-	-
Meio alcalino Experimento de 13 a 20	17	-	+	-	+	+
	18	-	+	-	+	-
	19	-	+	-	-	+
	20	-	+	-	-	-

+ Nível superior

- Nível inferior

4.3. Preparo do bagaço para pré-tratamento

O bagaço integral utilizado foi coletado nas usinas de cana de açúcar da região de São José do Rio Preto – SP durante a safra de 2012 e não teve a composição química previamente determinada. Após o processo de lavagem e homogeneização, o bagaço foi seco em estufa a 60 °C por 72 h e armazenado em ambiente apropriado. Alíquotas de 2,0 g de bagaço de cana foram colocadas em balões de fundo redondo de 250 mL com boca esmerilhada, onde foram adicionadas as soluções detalhadas na

Tabela 3 e água destilada para igualar a 40 mL de embebição em todos os experimentos. Os balões permaneceram em rotação constante dentro do forno de microondas para uma exposição homogênea e conectados a um sistema de refluxo para reduzir a evaporação da solução.

4.4. Aplicação de irradiação de microondas

As amostras em temperatura e pressão ambiente foram submetidas à irradiação de microondas durante 0,5 min como nível baixo (-) atingindo temperaturas de cerca de 80 $\pm$ 8 °C a 27 RPM medidas pelo termômetro, sendo que não foi utilizado nenhum controlador de temperatura (DA SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006). Como nível alto (+) foi utilizado 3,0 min atingindo temperaturas de cerca de 110 $\pm$ 8 °C, também a 27 RPM. Foi utilizado para os pré-tratamentos o microondas *Electrolux* ME21S de 2450 MHz adaptado de acordo com a proposta de da Silva et al. (2006).

4.5. Uso do bagaço após os pré-tratamentos

O bagaço pré-tratado foi lavado quatro vezes com água destilada (400 mL), filtrado em papel filtro e seco por 48 h a 60°C em placas de Petri taradas. Após a secagem foi determinada a variação de massa do material lignocelulósico para avaliação da solubilização e não foi caracterizada a composição do bagaço pré-tratado. Posteriormente o bagaço pré-tratado foi submetido à hidrólise enzimática para a sacarificação dos carboidratos fermentescíveis e uma alíquota analisada por infravermelho (IR),

termogravimetria (TGA). A solução remanescente do pré-tratamento foi recolhida e resfriada para posterior quantificação de ART, FT, fenol, HMF e furfural.

4.6. Hidrólise enzimática

A solução enzimática foi preparada na concentração 3,0 g/L que correspondeu a análise 32 FPU/g de atividade de papel filtro. Amostras do bagaço pré-tratado foram submetidas à ação do complexo enzimático comercial da Prozyn® em tubos de 50 mL, adicionando-se 0,25 g de bagaço de cana, 1,0 mL do extrato enzimático e 9,0 mL de água destilada, em banho a 60 °C com agitação (150 RPM) conforme orientação do fabricante. Após 24h as amostras foram centrifugadas, filtradas e as concentrações de ART, glicose e xilose determinadas. Os controles da hidrólise foram bagaço *in natura* e enzima, bagaço *in natura* com água destilada e enzima.

4.7. Destinação dos resíduos

Para o gerenciamento dos resíduos gerados durante as etapas do trabalho, foi seguido o Manual para Gerenciamento de Resíduos Perigosos. Este manual é utilizado nas unidades da Universidade Estadual Paulista (UNESP) como direcionador das atividades que gerem resíduos perigosos (DA FONSECA, 2009).

5. MÉTODOS

5.1. Variação de massa

Ao final de cada pré-tratamento foi verificado o pH da solução para avaliar a necessidade de correção do pH para a hidrólise enzimática e poder relacionar a solubilização do material lignocelulósico com a variação de massa (VM).

5.2. Espectrofotometria no infravermelho por reflectância total atenuada

Para a avaliação do impacto do pré-tratamento por espectrometria no infravermelho (FTIR), devido ao fato do bagaço de cana não ser translúcido, utilizou-se a detecção por reflectância total atenuada (ATR), por meio do *Perkin Elmer Spectrum Two*, programado para 04 *scans* por leitura com força de compressão no cristal do ATR de 75 N.

As amostras secas de bagaço pré-tratado (aproximadamente 100 mg) foram prensadas com 9,0 t resultando em discos de 12 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura aproximadamente, utilizando-se uma prensa hidráulica. Em cada disco da duplicata foi lido o espectro em cinco posições diferentes devido à heterogeneidade do bagaço, obtendo o espectro médio de 10 medidas, conforme Figura 9.

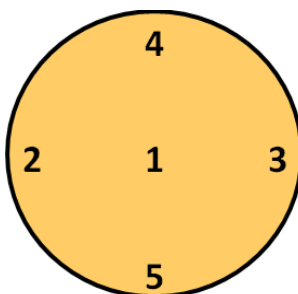


Figura 9 – Posição das leituras de FTIR-ATR nos discos do bagaço pré-tratado.

5.3. Termogravimetria

Para verificar a termo estabilidade da fibra após os pré-tratamentos foi utilizado na termogravimetria (TGA) o equipamento *Perkin Elmer* (TG 4000). Aproximadamente 10 mg de bagaço foram aquecidas de 50 a 700 °C com taxa de aquecimento de 50 °C/min sob atmosfera de N₂ (20 mL/min).

5.4. Análise de açúcares redutores totais

Os ART solúveis do líquido do pré-tratamento e do hidrolisado foram determinados pelo método de Miller (MILLER, 1959). As medições de absorbâncias foram realizadas em 540 nm utilizando-se o espectrofotômetro *UV-VIS Gold Spectrumbab 53*. Foi utilizado como referência das análises água destilada e o reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), além de uma referência contendo persulfato de sódio com ADNS para verificar possível interferência do sal no método.

A reação foi conduzida adicionando-se 0,5 mL da amostra filtrada, juntamente com 0,5 mL do reagente ADNS em tubos que foram colocados em banho de ebulição por 10 min. Os tubos foram então resfriados em banho de gelo por 5 min e em cada tubo adicionado 4,0 mL de água destilada.

Foram determinadas duas curvas padrão utilizando-se glicose *Sigma-Aldrich*® e os resultados foram expressos em miligramas de ART por grama de bagaço. Uma curva foi utilizada para a determinação de ART do líquido resultante do pré-tratamento e outra para o líquido resultante da hidrólise enzimática.

5.5. Análise de compostos fenólicos totais

O teor de FT solúveis no pré-hidrolisado foi avaliado pelo método Folin-Ciocalteu (FOLIN; CICALTEAU, 1927). A reação foi conduzida adicionando-se 3,0 mL da amostra filtrada, diluída e 0,2 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em tubos, aos quais após 5 min

na ausência de luz foram adicionados 0,8 mL de solução de Na_2CO_3 (150 g/L). Após 30 min em repouso as absorbâncias em 760 nm foram lidas.

Foi determinada a curva padrão utilizando-se ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de FT por grama de bagaço pré-tratado. Utilizou-se como referência água destilada e os demais reagentes, além da solução de carbonato.

5.6. Análise de fenol

A quantificação na solução resultante do pré-tratamento foi realizada utilizando-se o cromatógrafo gasoso *Perkin Elmer* (Clarus 680) acoplado a espectrômetro de massas *Perkin Elmer* (Clarus 600T) e software *Turbo Mass*. Foi utilizada coluna capilar *Perkin Elmer* Elite-5MS com comprimento de 30 m, 0,25 mm de diâmetros interno e 1 μm de espessura de filme. A temperatura inicial do forno foi de 70-90 °C (1,0 °C/min) e 20 °C/min até 250 °C (mantido por 5,0 min). 1,0 μL das amostras foram injetadas com um injetor *splitless* 1:50 a 250 °C com o amostrador automático *Perkin Elmer* (Autosystem XL) e o *delay* de solvente foi de 5,0 min. A temperatura programada da fonte e da linha de transferência foram 220 e 250,0 °C respectivamente. O detector foi operado no modo *full scan* (60-250 m/z) e no modo SIR (94 m/z e 66 m/z) de 14 a 15,50 min com tempo de retenção (TR) 14,6 min.

5.7. Quantificação de glicose e xilose

A quantificação da glicose e xilose foi realizada por cromatografia de troca iônica com detecção por amperometria pulsada (HPAEC-PAD) da *Thermo Scientific Dionex* (ICS-5000), utilizando-se coluna de troca aniônica *CarboPac*® mantida a 25°C e detector a 30°C, com diluentes preparados com água deionizada ultra pura 18 M Ω e desgaseificada com N_2 . A forma de onda utilizada no detector foi a “quadrupolo padrão” cujos pulsos foram configurados com os seguintes potenciais e durações: E1 = 0,10 V, 0,40 s; E2 = -2,00 V, 0,02 s; E3 = 0,60 V, 0,01 s; E4 = 0,10 V, 0,06 s. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min com fase móvel A (200 mM de NaOH), B (água ultra pura) e C (500 mM de NaOH), utilizou-se eluição isocrática de 0 a 12 minutos com 6% de A, 94% de B, e 0% de C, de 12 minutos a

16 minutos foi utilizado 100% de C para a limpeza da coluna, e por fim dos 16 minutos aos 30 minutos 4,8% de A, 95,2% de B, e 0% de C para o condicionamento da coluna. As amostras foram devidamente filtradas e diluídas, sendo utilizado na curva padrão glicose e xilose *Sigma-Aldrich*®, cujo tempos de retenção 12,68 min e 14,02 min respectivamente.

5.8. Análise de furfural e hidroximetilfurfural

A determinação cromatográfica foi realizada por meio do HPLC Uv-Vis com forno *Dionex* (HPLC 3000) a 35 °C, bomba P680 e programação isocrática de água e metanol (90:10) a 1,0 mL/min. Foi utilizada coluna de fase reversa *C-18* (EC 250/4.6 *NUCLEOSIL* 100-5 CN). As amostras foram devidamente filtradas em 45 µm e diluídas com água deionizada ultra pura 18 MΩ sendo injetadas 20 µL com detecção em 276 nm com o detector *Dionex* (UVD 340v). A área relativa do pico de HMF e furfural foi comparada com a curva padrão de HMF e furfural *Sigma-Aldrich*® com TR de 7,0 min e 8,4 min respectivamente (Figura 10).

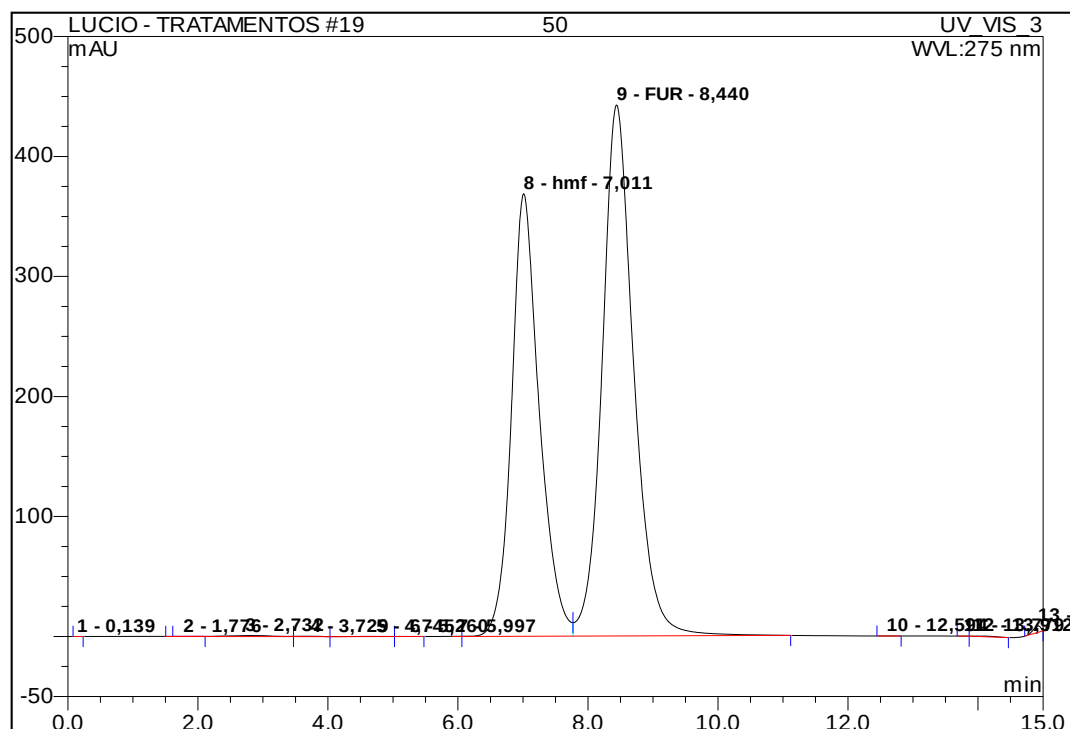


Figura 10 - HMF e furfural detectados para 50 mg/L da curva padrão.

5.9. Determinação da atividade da enzima papel de filtro

A proposta de Ghose (1987) corresponde à atividade celulolítica em termos de unidade de enzima por mL da solução (GHOSE, 1987; SANTOS; GOUVEIA, 2009). A atividade de papel filtro (FPA) foi quantificada de acordo com Miller (1959) e determinada a liberação de ART na reação contendo como substrato papel filtro *Whatman* nº 1 cortado em tiras 1x6 cm (50 mg), imerso em 0,9 mL de tampão ácido acético/NaOH 0,1 mol/L pH 5,0; e 0,1 mL de extrato enzimático bruto, sendo paralisada por adição 1,0 mL de ADNS. A solução resultante foi colocada em banho de fervura por 10 min e em seguida adicionou-se 8,0 mL de água destilada. Uma unidade (U) de atividade FPA corresponde a 1,0 μ mol de ART liberado por minuto de reação sob as condições de ensaio, quantificado de acordo com a curva padrão de glicose utilizada para análise de ART do hidrolisado.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Variação de massa do bagaço pré-tratado

A influência da irradiação de microondas (experimentos 15 e 16) diminuiu o pH em relação ao inicial (pH 7,5) devido à solubilização de ácidos fracos do bagaço (Tabela 5). O pH inicial dos experimentos 13 e 14 (pH 1,01) estão relacionados à hidrólise da água pelo persulfato e o pH final do pré-tratamento a capacidade tamponante da biomassa (Tabela 5).

Tabela 5 - pH final e variação de massa (VM) ao final dos pré-tratamentos.

VARIÁVEL	UNIDADE	ID*	pH	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)	mol/L	A	0,53	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)	mol/L	B	10,89	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)	mol/L	Fe II	1,14	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)	mol/L	OX	1,01	0	0,1
Tempo de microondas	min	M	NA**	0,5	3,0

EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	pH FINAL	DESVIO	VM MÉDIA	DESVIO
1	+	-	+	+	+	1,65	0,04	8,00%	0,03
2	+	-	+	+	-	1,83	0,02	5,50%	0,01
3	+	-	+	-	+	1,80	0,01	8,25%	0,02
4	+	-	+	-	-	1,83	0,05	7,50%	0,01
5	+	-	-	+	+	1,87	0,06	9,25%	0,02
6	+	-	-	+	-	1,94	0,09	7,75%	0,05
7	+	-	-	-	+	2,28	0,16	7,00%	0,01
8	+	-	-	-	-	2,25	0,05	6,75%	0,01
9	-	-	+	+	+	1,91	0,01	3,75%	0,01
10	-	-	+	+	-	2,37	0,04	4,25%	0,01
11	-	-	+	-	+	3,09	0,01	5,50%	0,07
12	-	-	+	-	-	3,14	0,04	7,25%	0,02
13	-	-	-	+	+	2,37	0,00	5,25%	0,02
14	-	-	-	+	-	3,35	0,06	7,75%	0,02
15	-	-	-	-	+	4,91	1,04	7,00%	0,03
16	-	-	-	-	-	5,07	0,91	9,00%	0,03
17	-	+	-	+	+	4,56	0,00	10,00%	0,06
18	-	+	-	+	-	5,40	0,06	12,50%	0,00
19	-	+	-	-	+	9,98	0,74	20,25%	0,18
20	-	+	-	-	-	10,38	0,20	10,25%	0,08

*Código de identificação de cada variável.

** NA = Não se aplica.

O pH dos experimentos de 1 a 14 permaneceram ácidos devido à presença de **(A)**, **OX** e **Fe II** dos pré-tratamentos. Para os experimentos com a presença de ácido sulfúrico ou Fe II notou-se baixa variação de massa (VM).

Nos experimentos alcalinos de 17 a 20 foi possível verificar que o persulfato diminuiu o pH no pré-tratamentos 17 e 18 (Tabela 5). Isto demonstra que este pré-tratamento oxidativo pH alcalino resulta em uma melhor faixa de pH para a hidrólise enzimática dependendo da dosagem dos reagentes NaOH e persulfato (WYMAN; DALE; ELANDER, 2005; ALVIRA et al., 2009; CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010).

A VM pode ser um indicador de severidade do pré-tratamento testado e estar relacionado aos compostos liberados nesta etapa que influenciam a hidrólise enzimática. Os experimentos alcalinos de 17 a 20 sofreram as maiores VM de todos os pré-tratamentos, sendo detectados fenólicos totais (FT). As amostras dos experimentos 19 e 20 (ausência de persulfato) foram os pré-tratamentos alcalinos que mais resultaram em liberação de FT (Tabela 6). De fato, era de se esperar a presença de FT nos processos de deslignificação conduzidos em condições alcalinas e baixo FT na presença de persulfato, pois o composto oxidaria os FT (MARTIN; KLINKE; THOMSEN, 2006; ZHU et al., 2006; LIUTTI, 2007).

No que tange a solubilizar uma parte do bagaço, é possível notar que a reação do persulfato e a irradiação de microondas (experimentos 13 e 14) produzem um efeito mais brando do que o provocado apenas pela irradiação de microondas (experimentos 15 e 16) (Tabela 5). Verificaram-se ainda nos pré-tratamentos 13 e 14 que 3,0 min de exposição à irradiação de microondas não resultou em VM maior (Tabela 5).

Nota-se também que nas condições dos pré-tratamentos 17 e 18 (pH alcalino), a adição do persulfato de sódio diminuiu VM quando se compara as variações obtidas dos experimentos 19 e 20 (somente pH alcalino). Novamente verificou-se que na presença de persulfato 3,0 min de irradiação do experimento 17 não implicou em VM maior em relação a 0,5 min do experimento 18.

6.2. Fenólicos totais liberados do pré-tratamento

Na Figura 11 é apresentada a curva padrão utilizada nas análises de FT, demonstrando na equação da reta boa correlação linear.

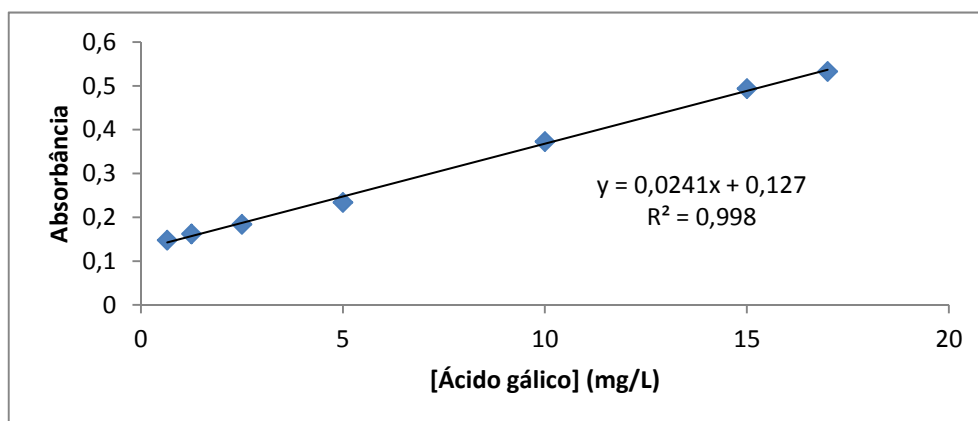


Figura 11 - Curva padrão utilizada na análise de FT.

Nos pré-tratamentos ácidos 1, 2, 5, 6, 9 e 10 não foram detectados FT, que podem ser considerados resultados bons (Tabela 6). No experimento 10 foi detectado FT abaixo da faixa de quantificação da curva padrão, que está relacionado à temperatura menor obtida em 0,5 min do que 3,0 min do experimento 9. Todos estes pré-tratamentos contiveram a presença do oxidante que possivelmente teria oxidados os compostos fenólicos. No entanto, de maneira geral estes pré-tratamentos não resultaram necessariamente em bons rendimentos de conversão de glicose e xilose.

Nos experimentos 13 e 14 foi observada a influência da variação do tempo de exposição da irradiação de microondas na presença de persulfato. Possivelmente a exposição de 0,5 min (pré-tratamento 14) não foi suficiente para formar quantidades significativas de radicais, visto que foram detectados FT abaixo do limite inferior de quantificação da curva padrão (Tabela 6). Como é sabido que a ativação térmica do persulfato é possível, e como o resultado de obtenção de glicose e xilose foi melhor no pré-tratamento 14, muito provavelmente foi devido a combinação da oxidação direta da lignina e por via radicalar gerada nesta condição, pois a variação de massa foi maior que no pré-tratamento 13 (Tabela 5).

A eficácia do persulfato de sódio em oxidar FT pode ser observada, pois quase todos os pré-tratamentos conduzidos na presença de persulfato tiveram concentração de

FT abaixo do LQ. Entretanto, foram detectados FT nos pré-tratamentos alcalinos 17 e 18 com persulfato que pode estar relacionado à formação de hidroxilas fenólicas nos poliaromáticos liberados a partir da lignina ou pelo fato do processo de ativação por álcalis não ser um processo catalítico (BRASILEIRO; COLODETTE; PILÓ-VELOSO, 2001; ZHU et al., 2006; ALVIRA et al., 2009; WILSON et al., 2013). A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos em mg de FT por g de bagaço pré-tratado.

Tabela 6 - Resultados das análises de FT do líquido resultante do pré-tratamento.

VARIÁVEL						UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)						mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)						mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)						mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)						mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas						min	M	0,5	3,0
EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	FT DO PRÉ-TRATAMENTO (mg/g)		DESVIO	
1	+	-	+	+	+	ND		0,01	
2	+	-	+	+	-	ND		0,00	
3	+	-	+	-	+	0,83		0,04	
4	+	-	+	-	-	0,91		0,10	
5	+	-	-	+	+	ND		0,00	
6	+	-	-	+	-	ND		0,01	
7	+	-	-	-	+	0,12		0,01	
8	+	-	-	-	-	0,02		0,08	
9	-	-	+	+	+	ND		0,00	
10	-	-	+	+	-	< LQ		0,14	
11	-	-	+	-	+	0,36		0,03	
12	-	-	+	-	-	0,17		0,01	
13	-	-	-	+	+	ND		0,00	
14	-	-	-	+	-	< LQ		0,01	
15	-	-	-	-	+	0,04		0,02	
16	-	-	-	-	-	0,03		0,06	
17	-	+	-	+	+	0,01		0,07	
18	-	+	-	+	-	0,03		0,10	
19	-	+	-	-	+	0,76		0,11	
20	-	+	-	-	-	0,76		0,02	

*Código de identificação de cada variável.

ND = Não detectado.

< LQ = Abaixo do limite inferior da curva padrão (0,65 mg/L).

No caso do experimento 18, a exposição de 0,5 min a irradiação de microondas no meio alcalino com persulfato não foi suficiente para gerar radicais sulfatos necessários para oxidar os fenólicos, pois se sabe que a ativação do persulfato com álcalis não é considerado um efeito catalítico (WILSON et al., 2013). Tais pré-tratamentos alcalinos na

presença de persulfato (experimentos 17 e 18) estão sujeitos também à formação do ânion fenolato se as espécies radicalares não forem eficientemente geradas e alimentar a propagação.

As maiores concentrações de FT de todos os pré-tratamentos foram detectadas nos experimentos 3, 4 e 19, 20. Embora as variações de massa dos pré-tratamentos 3 e 4 tenha sido menor até do que os pré-tratamentos 19 e 20, foi possível verificar a ocorrência de solubilização seletiva de uma fração maior da lignina nos experimentos 3 e 4 conforme quantificação de FT maior do que os experimentos 19 e 20 (Tabela 6), relacionada à presença o ácido de Lewis (Fe^{2+}) nos pré-tratamentos 3 e 4.

6.3. Quantificação de fenol resultante do pré-tratamento

Na Figura 12 é apresentada a curva padrão utilizada nas análises de fenol, sendo possível observar na equação da reta boa correlação linear das análises.

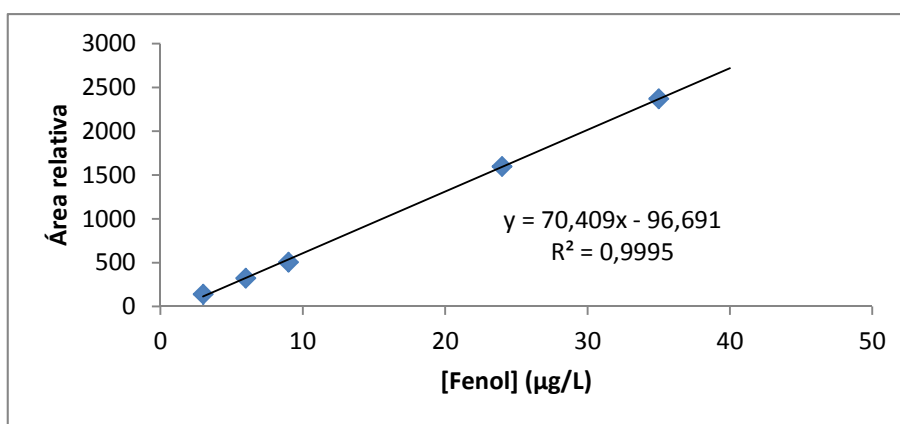


Figura 12 - Curva padrão utilizada na análise de fenol.

O pré-tratamento com persulfato de sódio é um método oxidativo que também utiliza oxigênio como oxidante, que segundo Hendriks e Zeeman (2009) monômeros fenólicos poderiam ser produzidos ao final da oxidação úmida, mas que segundo Klinke et al. (2002) seriam degradados a ácidos carboxílicos.

No estudo de oxidação da lignina Ninomiya et al. (2013) mencionou a formação de radicais $\text{OH}^\cdot$ sonocataliticamente ativados na presença de Fe II por mecanismos semelhantes aos da química Fenton (LIU et al., 2007). Segundo Brasileiro et al. (2001)

centros aromáticos da lignina em estados mais reativos pela presença de perácidos, poderiam sofrer reações de substituição/adição eletrofílica e reações nucleofílicas. De acordo Liu et al. (2013) estaria presente fenol como intermediário de oxidação de compostos orgânicos aromáticos com persulfato de sódio ativado e peróxido de hidrogênio. Segundo ele ainda, a concentração de fenol poderia ser um indicativo da eficiência de ativação do persulfato para formar radicais sulfatos necessários para a oxidação dos poliaromáticos (LIUTTI, 2007; LIU et al., 2012).

Na Tabela 7 são apresentados os resultados das análises quantitativas de fenol na solução remanescente dos pré-tratamentos.

Tabela 7 - Resultados das análises de fenol do líquido resultante do pré-tratamento.

VARIÁVEL		UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)		mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)		mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)		mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)		mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas		min	M	0,5	3,0

EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	FENOL DO PRÉ-TRATAMENTO (µg/L)	DESVIO
1	+	-	+	+	+	ND	0,0
2	+	-	+	+	-	4,5	0,1
3	+	-	+	-	+	36,4	6,9
4	+	-	+	-	-	18,0	4,2
5	+	-	-	+	+	20,3	5,4
6	+	-	-	+	-	27,3	9,7
7	+	-	-	-	+	6,7	0,3
8	+	-	-	-	-	6,1	0,6
9	-	-	+	+	+	10,7	0,6
10	-	-	+	+	-	6,8	2,6
11	-	-	+	-	+	4,0	3,1
12	-	-	+	-	-	ND	0,0
13	-	-	-	+	+	ND	0,0
14	-	-	-	+	-	ND	0,0
15	-	-	-	-	+	< LQ	0,9
16	-	-	-	-	-	ND	0,0
17	-	+	-	+	+	ND	0,0
18	-	+	-	+	-	ND	0,0
19	-	+	-	-	+	ND	0,0
20	-	+	-	-	-	ND	0,0

*Código de identificação de cada variável.

ND = Não detectado.

< LQ = Abaixo do limite inferior da curva padrão (3 µg/L).

De acordo com a Tabela 7 é possível observar que os pré-tratamentos 3 e 4 resultaram em maiores concentrações de fenóis. Como o persulfato estava ausente nestes pré-tratamentos, é possível que a irradiação de microondas na presença de um ácido de Lewis tenha levado a formação de radicais $\text{OH}^\cdot$ que teriam oxidado a lignina por mecanismos semelhantes à química Fenton, justificando as maiores concentrações de fenol, FT e ART detectadas na etapa de pré-tratamento (NINOMIYA et al.; 2013).

O resultado observado de fenol para o pré-tratamento 2 pode estar relacionado ao menor tempo de exposição à irradiação de microondas (0,5 min), quando comparado ao resultado de fenol obtido do pré-tratamento 1 (3,0 min). Já os resultados de fenol dos pré-tratamentos 5 e 6 demonstraram baixa eficiência de formação de radicais sulfatos nesta condição empregada, visto que ao adicionar o Fe II (experimentos 9 e 10) a concentração de fenol foi menor.

6.4. Açúcares redutores totais solubilizados no pré-tratamento

De maneira geral, todos os pré-tratamentos possibilitaram a solubilização de carboidratos, sendo que concentrações altas durante o pré-tratamento podem representar perdas do substrato fermentescível (Tabela 8). Todavia, se o pré-tratamento químico acarretar em um pré-hidrolisado com alto rendimento de ART e baixa concentração de inibidores, a ponto de ser desnecessário o uso de enzimas, este se tornaria uma rota interessante devido ao custo das enzimas.

É importante ressaltar que se o pré-tratamento resultar em uma hidrólise enzimática mais eficiente, pode ser que a quantidade de ART solubilizada durante o esta etapa seja desprezível. De maneira geral os resultados demonstraram que não houve uma grande solubilização de carboidratos para o meio (Tabela 8).

Tendo em vista o uso do persulfato, os melhores resultados foram os pré-tratamentos 13 e 14, muito próximos dos experimentos 15 e 16 (somente irradiação de microondas). É importante notar que 3,0 min de irradiação de microondas não influenciou significativamente a liberação ART do bagaço (pré-tratamentos de 13 a 16). Outro ponto importante é o fato de o persulfato aparentemente não ter consumido diretamente a matriz de carboidratos do bagaço.

Tabela 8 - Resultados de ART do líquido do pré-tratado.

VARIÁVEL		UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)		mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)		mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)		mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)		mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas		min	M	0,5	3,0

EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	ART DO PRÉ-TRATAMENTO (mg/g)	DESVIO
1	+	-	+	+	+	0,08	0,02
2	+	-	+	+	-	0,08	0,00
3	+	-	+	-	+	0,27	0,22
4	+	-	+	-	-	0,35	0,01
5	+	-	-	+	+	0,03	0,01
6	+	-	-	+	-	0,03	0,00
7	+	-	-	-	+	0,02	0,00
8	+	-	-	-	-	< LQ	0,00
9	-	-	+	+	+	0,09	0,01
10	-	-	+	+	-	0,11	0,00
11	-	-	+	-	+	0,51	0,05
12	-	-	+	-	-	0,30	0,09
13	-	-	-	+	+	0,02	0,00
14	-	-	-	+	-	0,02	0,00
15	-	-	-	-	+	0,02	0,00
16	-	-	-	-	-	0,02	0,00
17	-	+	-	+	+	0,03	0,01
18	-	+	-	+	-	0,03	0,00
19	-	+	-	-	+	0,02	0,00
20	-	+	-	-	-	0,08	0,02

*Código de identificação de cada variável.

ND = Não detectado.

< LQ = Abaixo do limite inferior da curva padrão (0,1 mg/mL).

Segundo Chursin et al. (2007) a oxidação de hidroxietil celulose com periodato de sódio, peróxido de hidrogênio, persulfato de potássio foi acompanhada por abertura da estrutura cíclica do sacarídeo e a formação de aldeídos (furfural) e grupos carboxílicos. Existe a possibilidade de ocorrer a oxidação de ART solubilizados, explicando em parte as concentrações baixas nos pré-tratamentos conduzidos na presença de persulfato. Entretanto, nestes pré-tratamentos não foram observadas significativas VM que justificassem solubilização de carboidratos seguida da oxidação deles (Tabela 8). A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos em miligramas de ART por grama de bagaço pré-tratado, onde o experimento 8 foi o único com leitura abaixo do LQ.

A Figura 13 apresenta a curva padrão utilizada na determinação de ART do líquido do pré-tratado.

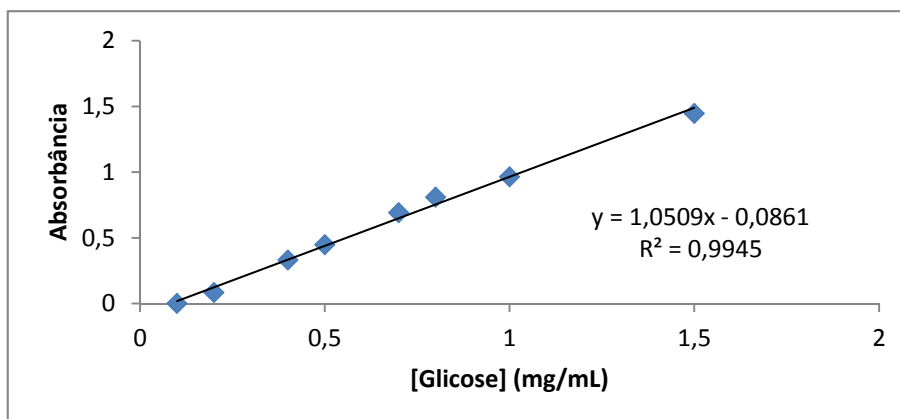


Figura 13 - Curva padrão utilizada na análise de ART do líquido do pré-tratado.

6.5. Determinação de hidroximetilfurfural e furfural

De maneira geral os resultados estiveram abaixo do LQ para HMF e furfural. Estes resultados estão em desacordo com os obtidos por Chursin (2007), pois as concentrações de ART liberados do pré-tratamento supostamente poderia levar a formação destes compostos (CHURSIN, 2007). Ainda de acordo com Chursin (2007) esperava-se que a acidez e temperaturas acima da ambiente contribuíssem para o aumento da velocidade de formação do HMF, que não foi observado nos experimentos com 3,0 min de irradiação de microondas, não existindo ainda uma relação com o pH final de cada pré-tratamento conforme Tabela 5 e Tabela 9.

Analizando os resultados de HMF e comparando os resultados de ART dos pré-tratamentos, a teores de glicose a partir não foram suficientes para a formação de HMF. Seguindo a recíproca, se ocorresse significativa solubilização de xilose, poderia ter ocasionado na formação do furfural durante o aquecimento em meio ácido. A Tabela 9 apresenta os resultados das análises de HMF e furfural.

Tabela 9 - Resultados das análises de HMF e furfural no líquido do pré-tratado.

VARIÁVEL						UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)						mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)						mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)						mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)						mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas						min	M	0,5	3,0

EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	HMF (mg/g)	DESVIO	FURFURAL (mg/g)	DESVIO
1	+	-	+	+	+	ND	0,00	ND	0,00
2	+	-	+	+	-	ND	0,00	ND	0,00
3	+	-	+	-	+	< LQ	0,00	ND	0,00
4	+	-	+	-	-	ND	0,00	< LQ	0,03
5	+	-	-	+	+	ND	0,00	ND	0,00
6	+	-	-	+	-	< LQ	0,00	< LQ	0,11
7	+	-	-	-	+	< LQ	0,00	< LQ	0,00
8	+	-	-	-	-	< LQ	0,00	ND	0,00
9	-	-	+	+	+	ND	0,00	ND	0,00
10	-	-	+	+	-	< LQ	0,03	ND	0,00
11	-	-	+	-	+	ND	0,00	< LQ	0,11
12	-	-	+	-	-	< LQ	0,01	ND	0,00
13	-	-	-	+	+	ND	0,00	< LQ	0,05
14	-	-	-	+	-	ND	0,00	< LQ	0,00
15	-	-	-	-	+	ND	0,00	ND	0,00
16	-	-	-	-	-	ND	0,00	ND	0,00
17	-	+	-	+	+	< LQ	0,02	< LQ	0,02
18	-	+	-	+	-	ND	0,00	ND	0,00
19	-	+	-	-	+	ND	0,00	ND	0,00
20	-	+	-	-	-	ND	0,00	ND	0,00

*Código de identificação de cada variável.

ND = Não detectado.

< LQ = Abaixo do limite inferior da curva padrão (0,5 mg/L para HMF e 0,05 mg/L para furfural).

Com base nos resultados das análises de HMF e furfural, não se pode relacionar de maneira conclusiva a formação destes compostos ao pH e tempo de exposição à irradiação de microondas. Entretanto, comparando-se a pequena fração de ART solubilizada e a variação de massa, entende-se que não ocorreu no pré-tratamento a liberação considerável de glicose e/ou xilose que contribuisse para a formação destes inibidores.

As Figura 14 e Figura 15 apresentam as curvas padrões utilizadas para a determinação de HMF e furfural respectivamente.

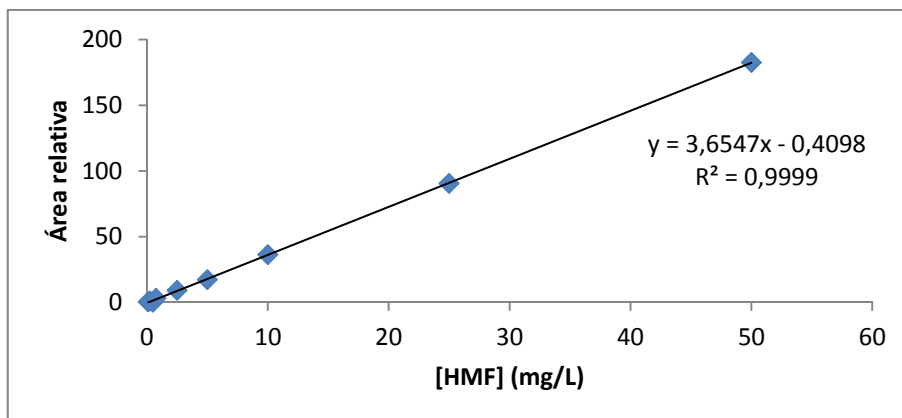


Figura 14 - Curva padrão utilizada na análise de HMF.

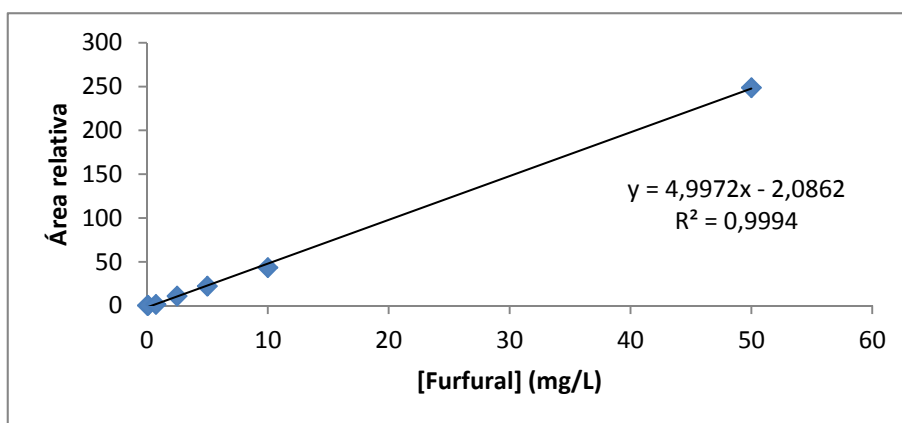


Figura 15 - Curva padrão utilizada na análise de furfural.

6.6. Análise estrutural por FTIR-ATR

Algumas bandas no IR podem ser utilizadas como referência para avaliar o impacto dos pré-tratamentos na estrutura química da fibra. As bandas localizadas na região de 1600, 1510 e 1440 cm^{-1} do espectro de IR são relacionadas à absorção de grupamentos característicos presentes na lignina (XU; SUN; LU, 2006). A banda observada em 833 cm^{-1} está relacionada a p-hidroxifenil, que é um dos precursores da lignina (HOAREUA et al., 2004).

A banda que se observa em 897 cm^{-1} é relacionada às ligações $\beta(1-4)$ entre unidades de glicose (ADEBAJO; FROST, 2004). Já a observado em 1158 cm^{-1} é proveniente do estiramento do grupo C-O-C de ligações glicosídicas, que pode ajudar a interpretar

possíveis alterações na estrutura química da celulose durante os pré-tratamentos (ZHANG et al., 2011). A região entre 3500 e 3000 cm^{-1} para todas as amostras é atribuída às vibrações de estiramento das OH de álcoois e fenóis (ERNESTO et al.; 2009). Já a região 1030 cm^{-1} representa as deformações das ligações C-H e C-O. A Tabela 10 apresenta algumas bandas de absorção no IR característicos da lignina propostas por Hoareau et al., 2004.

Tabela 10 - Bandas do IR características da lignina. Fonte: Adaptado de HOAREAU et al., 2004.

Nº DE ONDA (cm^{-1})	ORIGEM DA BANDA
3450-3400	Estiramento O-H
3050-2840	Estiramento C-H (alifático + aromático)
1740-1710	Estiramento C=O (cetona não conjugadas, éster ou carboxílicos)
1675-1660	Estiramento C=O em anel aromático conjugado
1605-1600	Vibração do anel aromático
1515-1505	Vibração do anel aromático
1470-1460	Deformações C-H
1430-1425	Vibração do anel aromático
1370-1365	Deformações C-H
1330-1325	Anel sirigil
1275-1270	Anel guaiacil
1230-1220	Estiramento C-C, C-O
1172	Estiramento C-O de grupos éster conjugados de ligninas de gramíneas
1085-1030	Deformações C-H, C-O
835	C-H fora de plano de unidades <i>p</i> -hidroxifenil

A Figura 16 apresenta algumas bandas de maior interesse observadas na estrutura do bagaço *in natura*. Por sua vez, pode ser observada na Figura 21 a influência da irradiação de microondas em meio aquoso na estrutura do bagaço em comparação ao bagaço *in natura*.

Para o melhor entendimento, os espectros em vermelho representam os pré-tratamentos com 3,0 min de exposição à irradiação de microondas, os espectros em verde representam 0,5 min e o espectro em preto representa o bagaço *in natura*.

De maneira geral, a variação no tempo de exposição à irradiação de microondas não afetou significativamente a estrutura do material lignocelulósico (Figura 17). Porém, o pré-tratamento 16 aumentou o rendimento de ART (266%) e de glicose (133%), como observado pelo aumento geral da absorbância do espectro do experimento 16, demonstrando que tais grupamentos foram removidos (Figura 17).

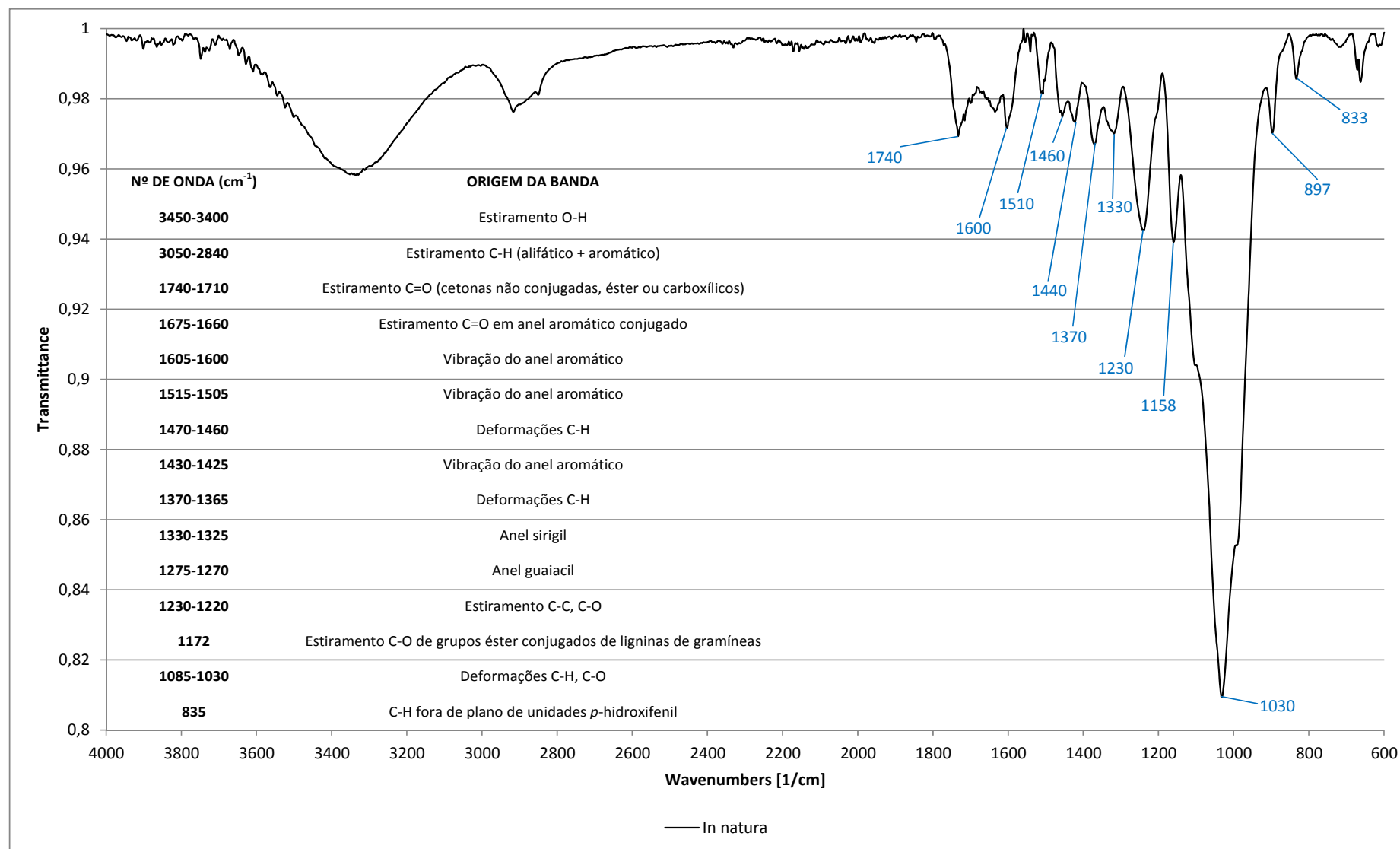


Figura 16 - Espectros do IR de interesse do bagaço *in natura*.

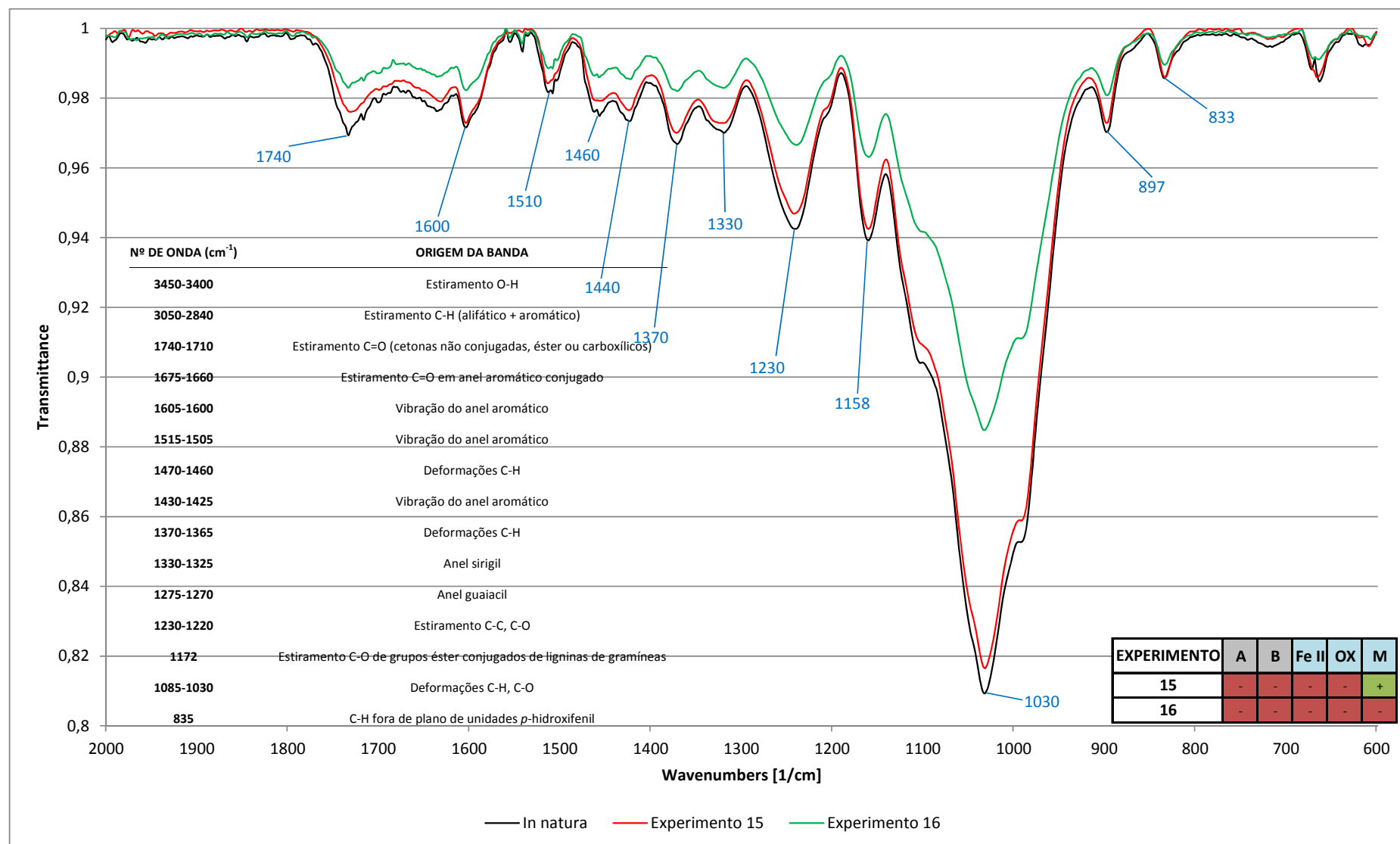


Figura 17 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 15 e 16.

É possível observar a influência do persulfato de sódio na estrutura do bagaço quando se compara os espectros dos experimentos 13 e 14 com o bagaço *in natura* (Figura 18). Foi observado o aumento geral da transmitância tanto para 0,5 min quanto 3,0 min de irradiação de microondas. A diferença mais evidente entre os pré-tratamentos 13 e 14 foi na região das bandas em 1230 e 1158 cm^{-1} , indicando que tais grupamentos foram alterados mais significativamente no pré-tratamento 13.

Contudo, o resultado do experimento 14 influenciou bem mais na liberação de glicose a partir do bagaço pré-tratado, ressaltando que grandes modificações nestas regiões não são acompanhadas necessariamente de uma melhoria da sacarificação enzimática. Vale lembrar que a região de 1158 cm^{-1} é proveniente do estiramento do grupo C-O-C de ligações glicosídicas $\beta(1-4)$, muito embora as concentrações de ART no líquido de pré-tratamento tenha sido igual para ambos os pré-tratamentos.

No pré-tratamento 13 não foram detectados FT, enquanto que no pré-tratamento 14 esteve abaixo do LQ (Tabela 11). Desse modo, é possível inferir que a presença de concentrações traço de fenólicos no experimento 14 está relacionada à baixa eficiência de formação de radicais sulfatos nesta condição, visto que não foi detectado fenol conforme menciona Liu et al. (2012). A Tabela 11 apresenta a comparação entre os resultados obtidos dos pré-tratamentos somente na presença de persulfato, submetidos à irradiação de microondas.

Tabela 11 – Resultados dos experimentos 13 e 14 em mg por g de bagaço tratado.

EXPERIMENTO	VM (%)	ART PRÉ-TRAT.*	FT PRÉ-TRAT.	ART HIDRÓLISE	GLICOSE	XILOSE
13	5,2%	0,02	ND	18,23	12	4,9
14	7,7%	0,02	< LQ	73,79	41	6,9

* Pré-tratamento

É importante evidenciar que a variação de massa do pré-tratamento 14 foi cerca de 2% maior do que o pré-tratamento 13, possivelmente contribuindo para a concentração traço de fenólicos mesmo na presença de persulfato, demonstrando que a ação de oxidante em temperatura branda foi mais eficiente para a hidrólise enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN 2009).

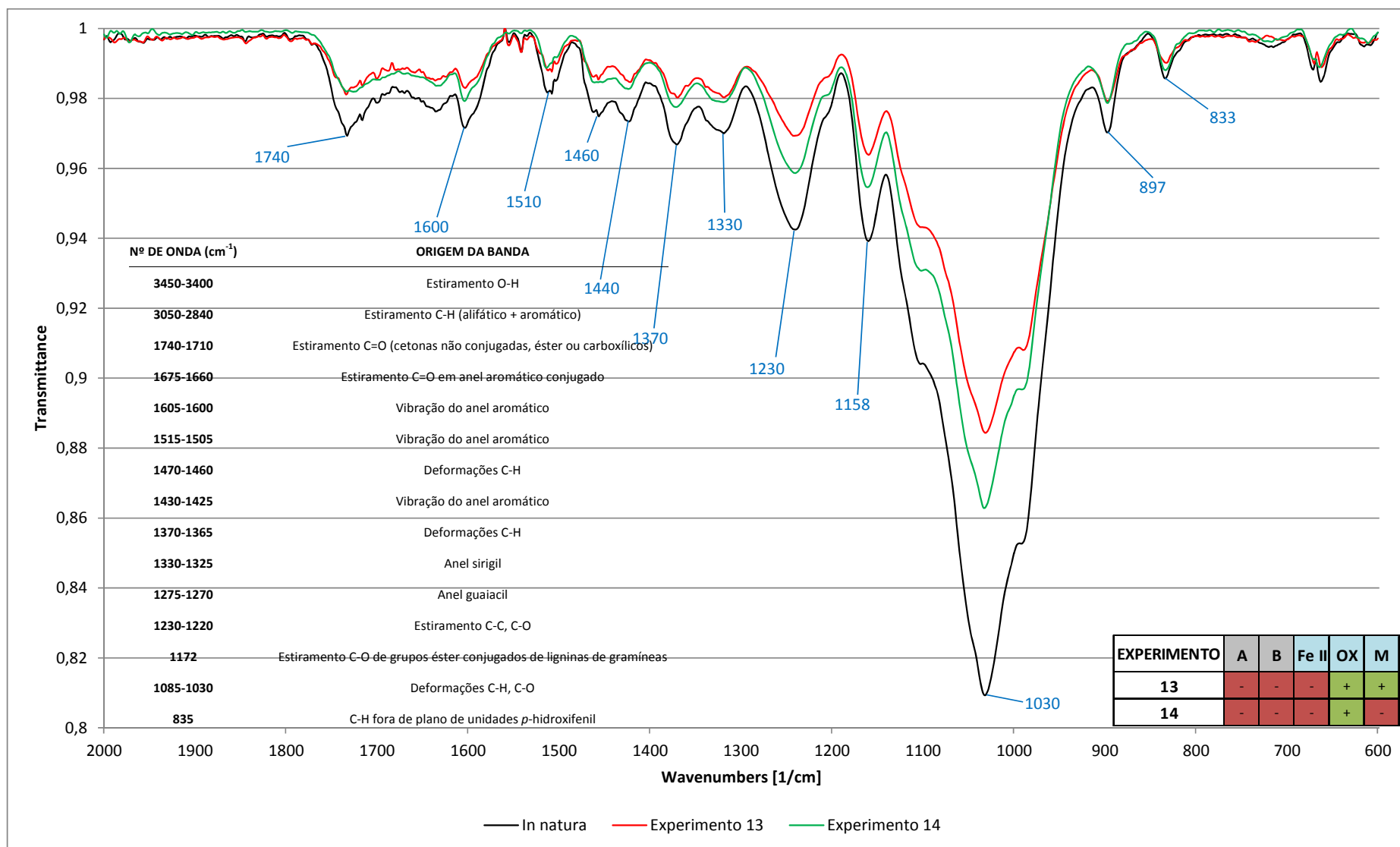


Figura 18 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 13 e 14.

6.6.1. Pré-tratamentos em meio alcalino

As modificações mais significativas observadas nos pré-tratamentos de 17 a 20 foram na região da carbonila (1720 cm^{-1}) (Figura 20 e Figura 21). O observado foi devido à ação do pré-tratamento alcalino, pois se sabe que os pré-tratamentos químicos promovem uma remoção efetiva de ésteres (Figura 19). Vale lembrar que a presença somente de álcalis e água não se traduziu em ART após a hidrólise enzimática.

Segundo Clóvis et al. (2009), as bandas em 1740 , 1620 , 1450 e 1510 cm^{-1} correspondem ao estiramento $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático da lignina. Conforme Hoareau et al. (2004) os espectros de hidrólise ácida e alcalina indicaram bandas em 1595 , 1510 e 1422 cm^{-1} características do esqueleto aromático da lignina.

As modificações na estrutura do bagaço com uso de álcalis estão relacionadas às reações de substituição eletrofílica dos anéis aromáticos da lignina que facilitam a sua solubilização, conforme observado na região da banda de 1510 cm^{-1} (vibração dos anéis aromáticos) e concentrações altas de FT detectadas (Tabela 6).

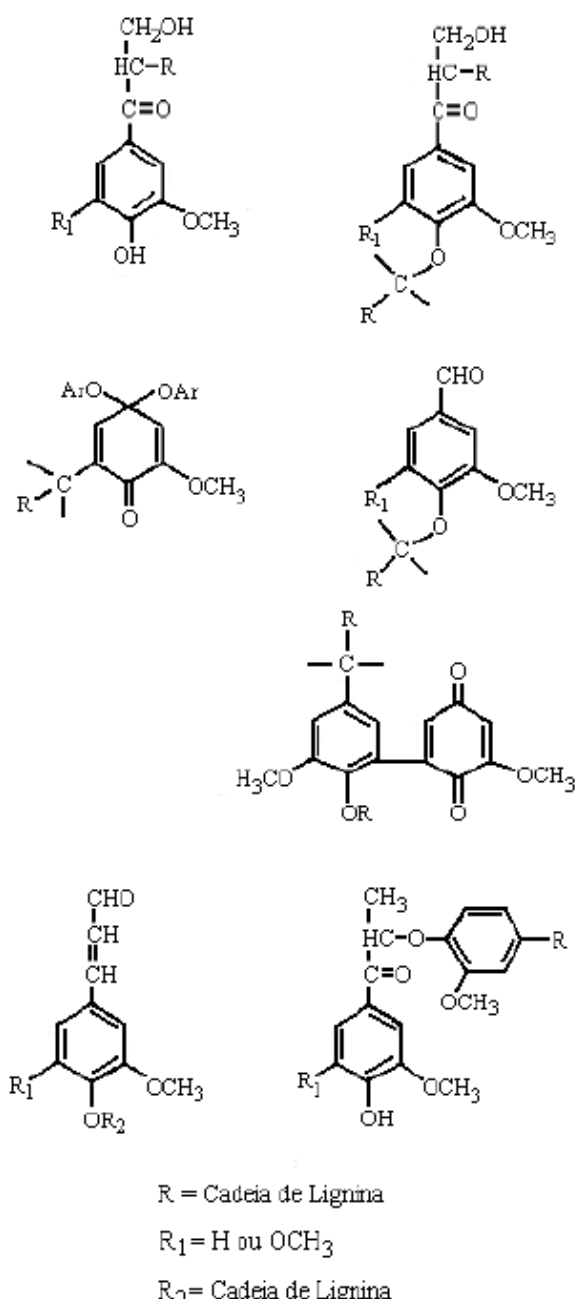


Figura 19 - Algumas estruturas que contêm carbonila na lignina.

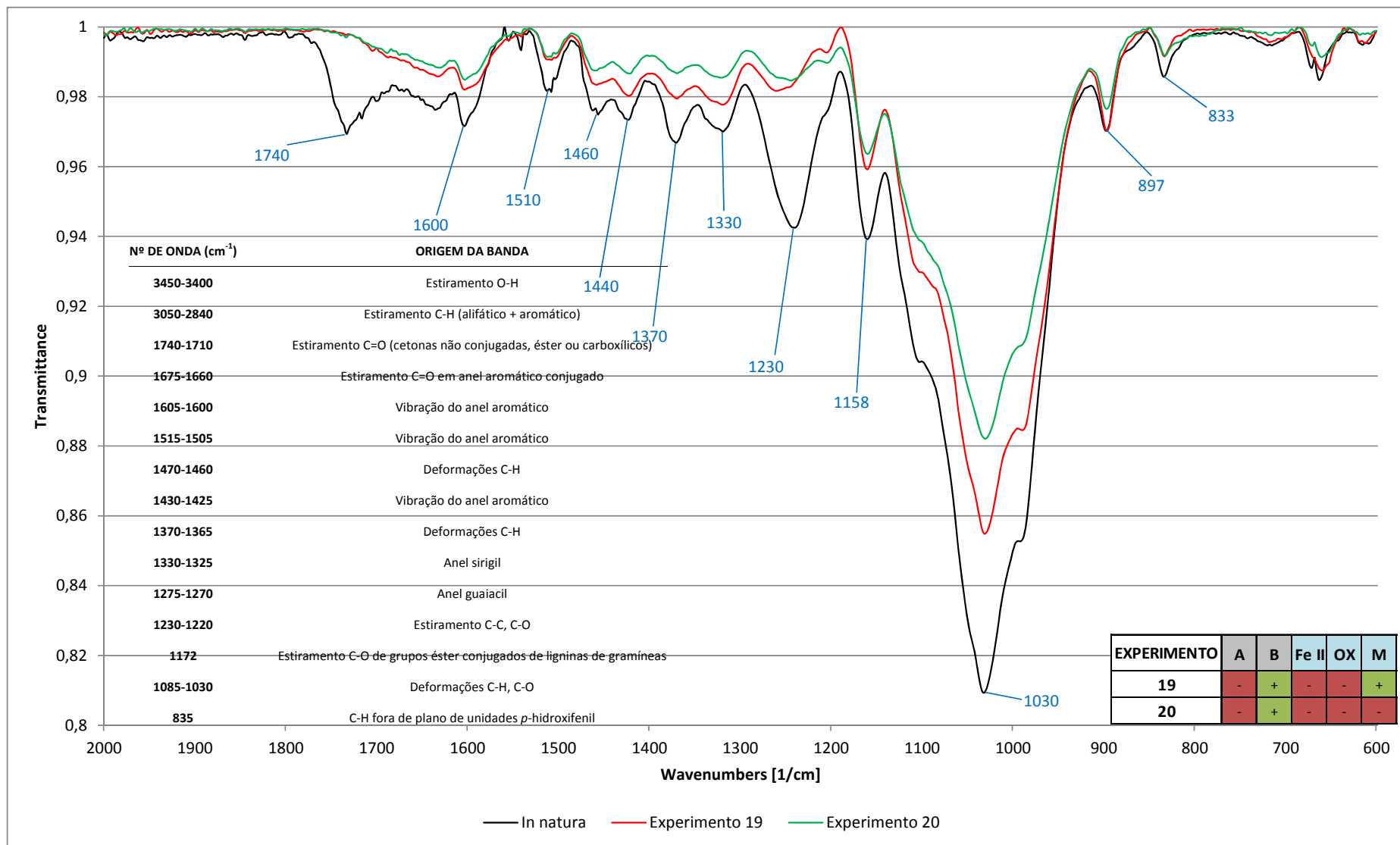


Figura 20 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 19 e 20.

Os espectros dos pré-tratamentos 17 e 18 (Figura 21) são semelhantes aos dos experimentos 19 e 20 (Figura 20). Contudo, os melhores resultados da hidrólise do bagaço tratado em meio alcalino foram obtidos no pré-tratamento 17, sendo consideravelmente acima do resultado dos pré-tratamentos 18, 19 e 20 (Tabela 12).

Foi possível observar que as maiores modificações na estrutura do bagaço provocado pelos pré-tratamentos 17 e 18 foram em 1740 e 1230 cm^{-1} proveniente do uso de álcalis, e com menor intensidade em 1510 e 1370 cm^{-1} . Todavia, o grande diferencial do pré-tratamento 17 em relação ao pré-tratamento 18 pode ser observado na região de banda em 1158 cm^{-1} , relacionadas às ligações glicosídicas. O afrouxamento das ligações nesta região pode ter contribuído substancialmente para o acesso das diferentes proteínas celulolíticas presentes no complexo enzimático clivando tais ligações, exemplificando que grandes modificações estruturais no material lignocelulósico possuem um limiar determinante para a eficiência da enzima, visto que as grandes modificações observadas e o uso somente de álcalis não resultaram em glicose (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação dos resultados de ART, glicose e xilose.

EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	ART DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (mg/g)	GLICOSE (mg/g)	XILOSE (mg/g)
13	-	-	-	+	+	18,23	12	4,9
14	-	-	-	+	-	73,79	41	6,9
15	-	-	-	-	+	88,40	39	5,7
16	-	-	-	-	-	81,72	44	6,9
17	-	+	-	+	+	100,93	54	10,9
18	-	+	-	+	-	9,61	2	0,2
19	-	+	-	-	+	7,34	3	0,3
20	-	+	-	-	-	8,98	1	0,1
Bagaço <i>in natura</i>						32,72	33	4,1

É possível verificar que o tempo de 3,0 min de irradiação de microondas (experimento 17) foi determinante para a liberação de glicose e xilose na presença de persulfato de sódio, pois tal resultado não foi observado nos experimentos 13 e 14 ou 19 e 20 conforme apresentado na Tabela 12.

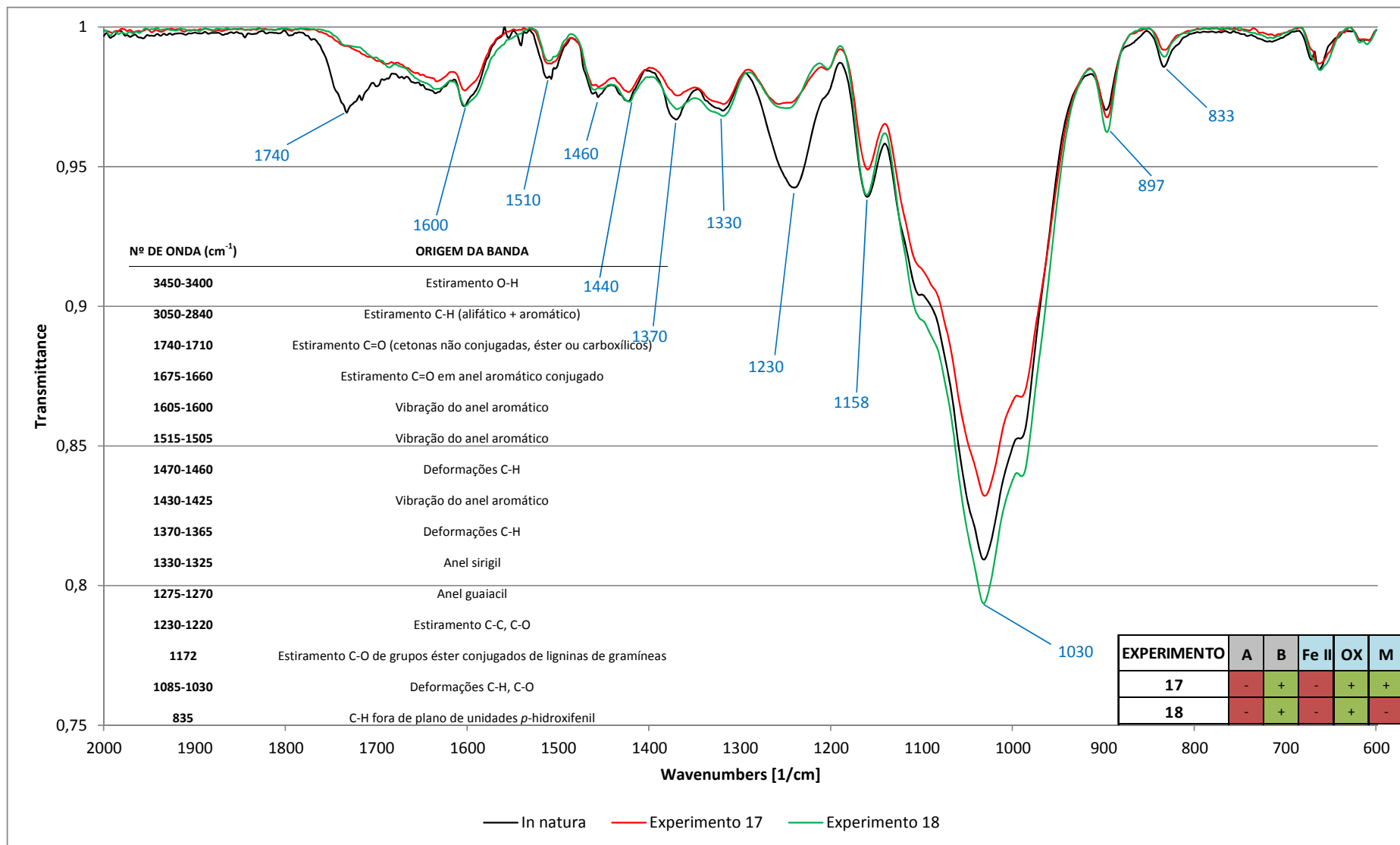


Figura 21 – Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 17 e 18.

Comparando-se os espectros dos pré-tratamentos 17 com 19, verifica-se que a degradação dos centros aromáticos da lignina foi muito semelhante e de certo modo até maior no pré-tratamento 19, confirmado pela VM da Tabela 5 (Figura 22).

A ausência de persulfato (experimento 19 e 20) pode ter contribuído para a formação de compostos fenólicos em concentração que possivelmente inibiria a eficiência catalítica da enzima. Contudo, após cada pré-tratamento o bagaço foi lavado e seco para evitar a comprovada interferência de FT inibidores da hidrólise enzimática (CAO et al., 2013). Entende-se que o persulfato em meio alcalino (pH 10,89 inicial) poderia contribuir para a hidrólise no sentido de tratar o meio com fenólicos liberados para o meio e simultaneamente facilitar a desconstrução do bagaço, agindo pela oxidação direta no bagaço e por meio de radicais sulfatos. No entanto, a hidrólise enzimática não foi realizada com o mesmo líquido de embebição dos pré-tratamentos para descartarmos a ação inibitória.

Por fim, o persulfato em meio alcalino e em maior tempo de exposição à irradiação de microondas (maior temperatura), contribuiu substancialmente para a hidrólise enzimática, visto que não se observou tal rendimento nos experimentos conduzidos somente em meio alcalino ou somente na presença de persulfato, sendo que a concentração de FT detectada no pré-tratamento 17 não inibiu a atividade enzimática conforme dito acima. De acordo com o observado ainda, é possível utilizar a mesma solução do pré-tratamento 17 (pH final 4,56) e em seguida adicionar a enzima, pois o meio supostamente poderia se auto tamponar conforme se modifica as dosagens de persulfato e hidróxido de sódio.

É importante salientar que o aumento da concentração de persulfato de 0,1 mol/L para 1,0 mol/L no meio alcalino mantido a 0,1 mol/L, não resultou em maiores remoções de grupos da estrutura química do bagaço pré-tratado e não se reproduziram as mesmas reduções dos grupos presentes na região de 1740 e 1230 cm^{-1} , conforme observados na Figura 22 e 23. No teste do pré-tratamento alcalino com persulfato a 1,0 mol/L, quantificou-se 0,5 mg de ART por grama de bagaço, resultado pouco acima de 0,3 mg/g quando usado 0,1 mol/L. Estas observações demonstram em parte que é possível utilizar o reagente persulfato de sódio em concentrações mais baixas.

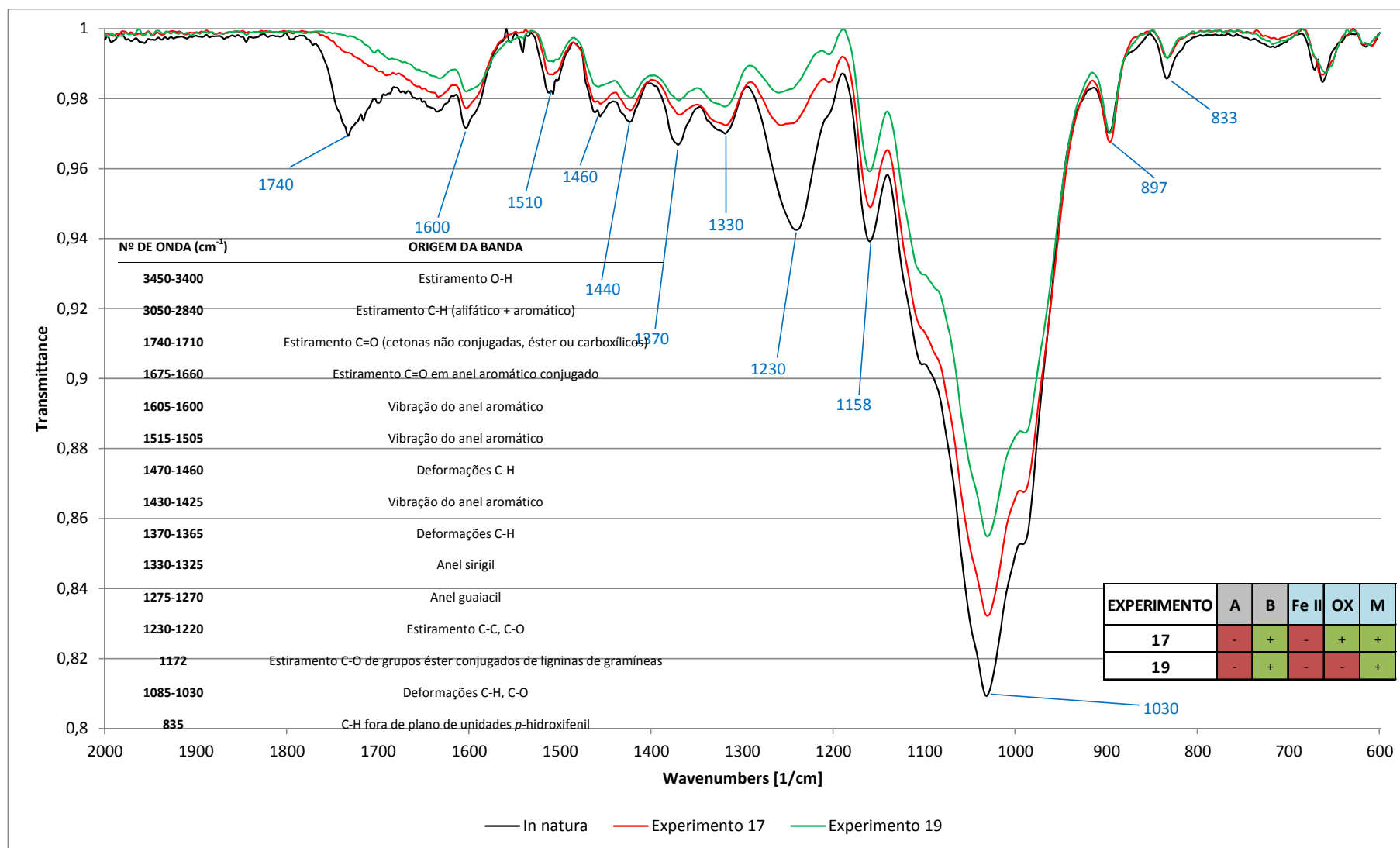


Figura 22 – Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 17 e 19.

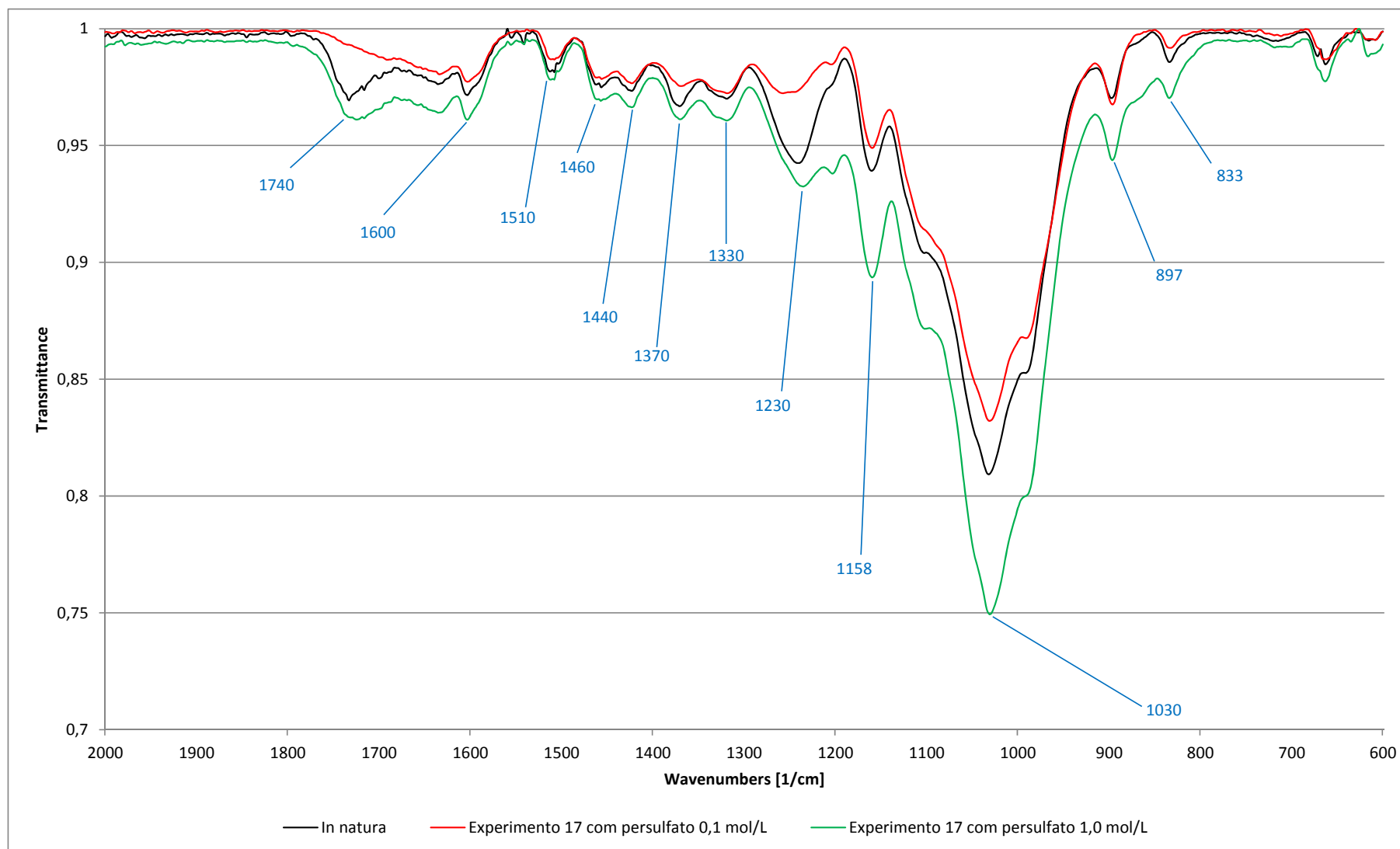


Figura 23 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 17 com 0,1 mol/L e 17 com 1,0 mol/L de persulfato.

6.6.2. *Pré-tratamentos em meio ácido*

O uso apenas do pré-tratamento em meio ácido, não resultou em grandes modificações estruturais e nem em maiores liberações de açúcar na hidrólise enzimática. Os pré-tratamentos 11 e 12 (somente na presença de ferro II e água), não apresentaram significativa mudança na estrutura em relação ao bagaço *in natura*, sendo que de uma maneira mais ampla ocorreu um relaxamento das ligações, mas que não resultou em benefício para a hidrólise (Figura 24).

Os espectros dos experimentos 5 e 6 comparados com o espectro do bagaço *in natura*, demonstraram que a ação do persulfato na presença do meio ácido muda drasticamente em relação ao tempo de exposição à irradiação de microondas (Figura 25). O aumento da intensidade de todas as bandas (pré-tratamento 5) sugere um enrijecimento da estrutura lignocelulósica como um todo, ocasionado pela maior temperatura e persulfato presente, uma vez que o persulfato pode provocar uma maior polimerização do material, já que é muitas vezes utilizado como iniciador. Entretanto, o espectro para o pré-tratamento 6 teve as bandas reduzidas em 0,5 min de exposição à irradiação de microondas. Este comportamento também foi observado para os espectros dos pré-tratamento 9 e 10 (ferro II e persulfato), pois a acidez da solução de ferro II pode ter contribuído de maneira semelhante ao ácido dos pré-tratamentos 5 e 6.

Os espectros dos pré-tratamentos 3 e 4 indicaram que pouco se altera na estrutura do bagaço na presença de ferro II em meio ácido, ou mesmo a variação do tempo de exposição da irradiação de microondas. Ocorreram apenas ligeiras modificações em 1720, 1600 e 1230 cm^{-1} , sendo todas regiões relacionadas às ligações presentes nos anéis aromáticos da lignina, que pode ter contribuído para a significativa solubilização de compostos fenólicos na ausência de persulfato. Vale lembrar que os pré-tratamentos 3 e 4 foram os pré-tratamentos com melhores resultados de ART no hidrolisado, mas que não resultou em glicose e xilose liberadas na hidrólise enzimática. Estes pré-tratamentos também foram os que mais contribuíram para a formação de FT e fenol, revelando certa eficiência em degradar a lignina.

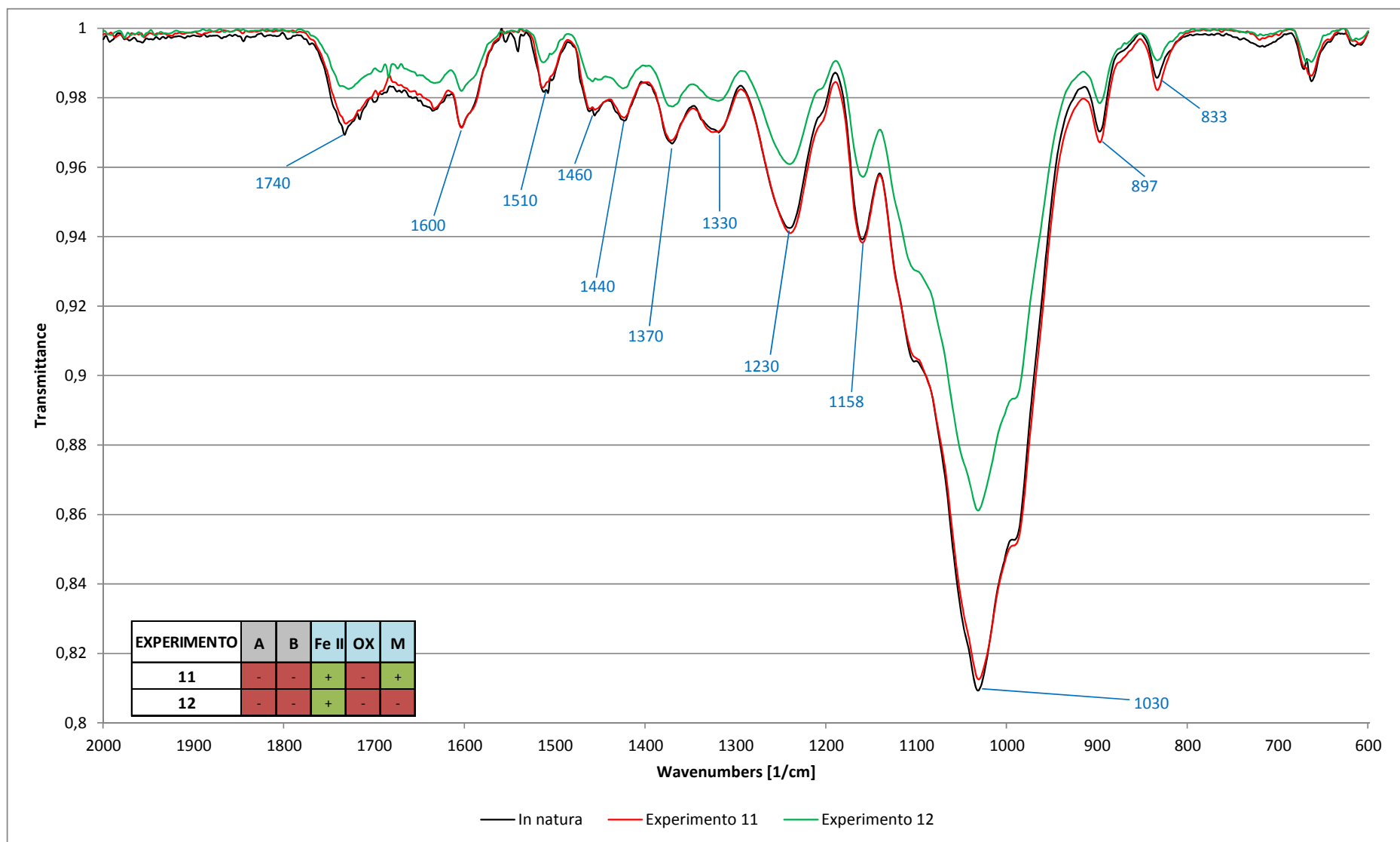


Figura 24 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 11 e 12.

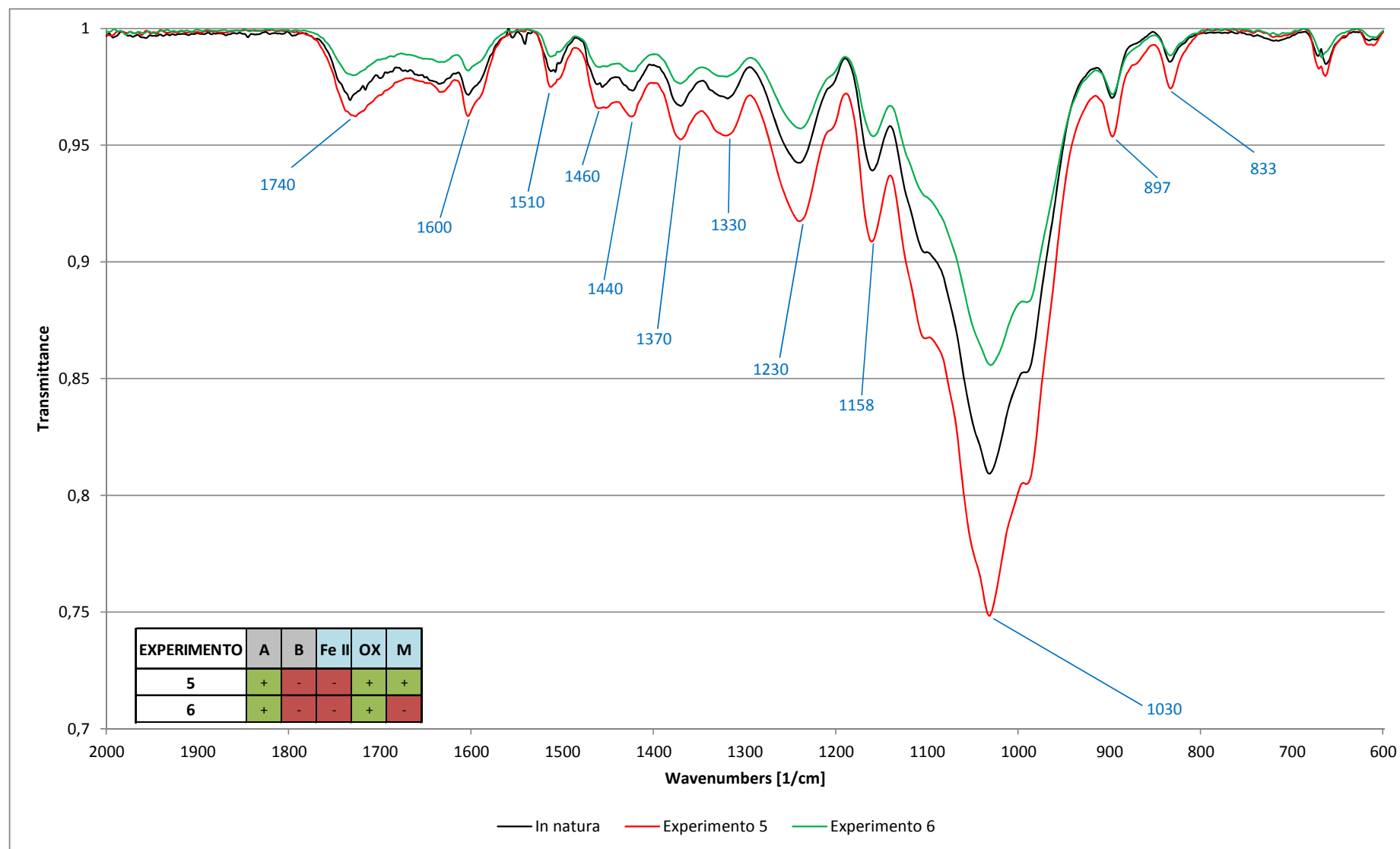


Figura 25 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 5 e 6.

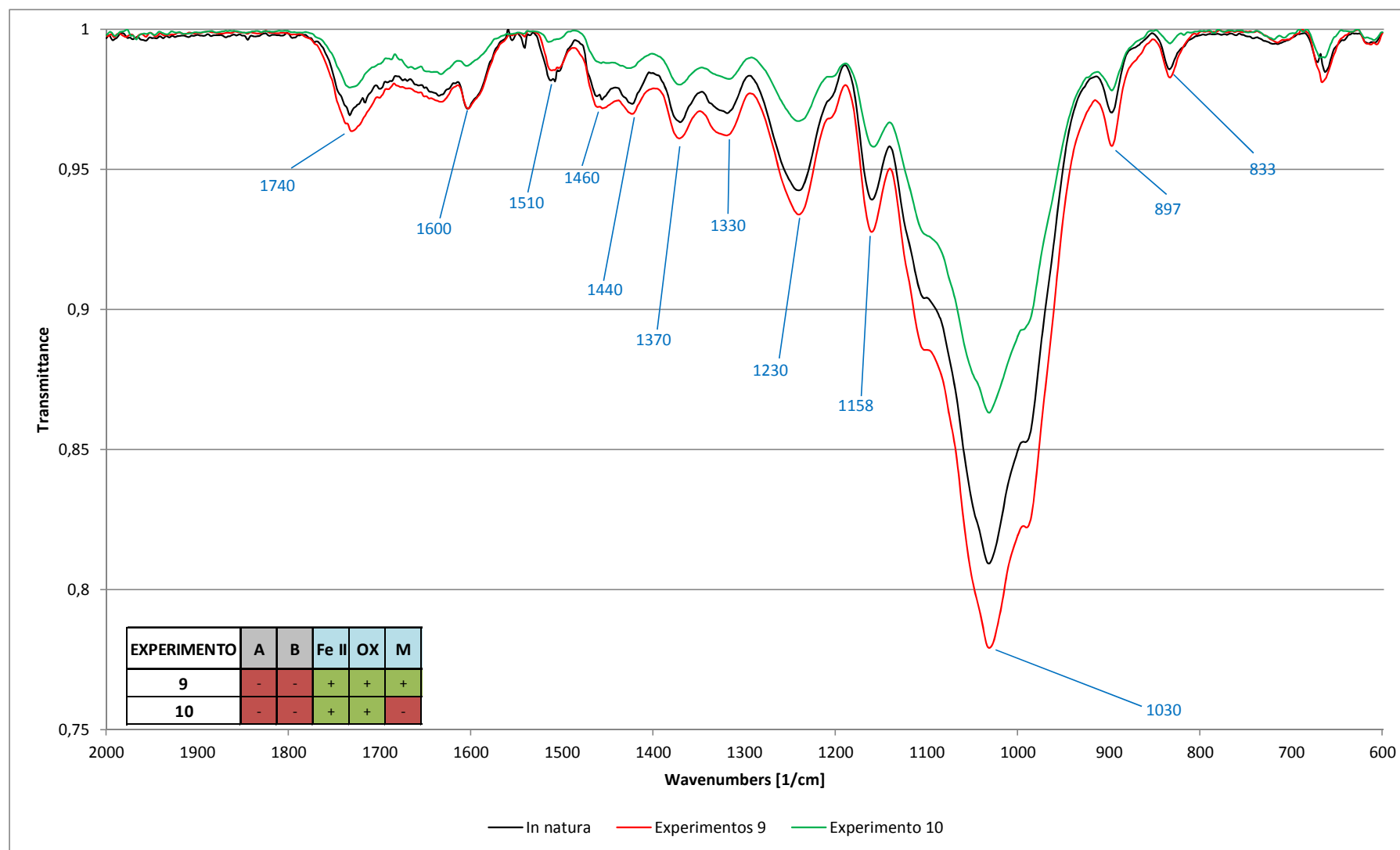


Figura 26 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 9 e 10.

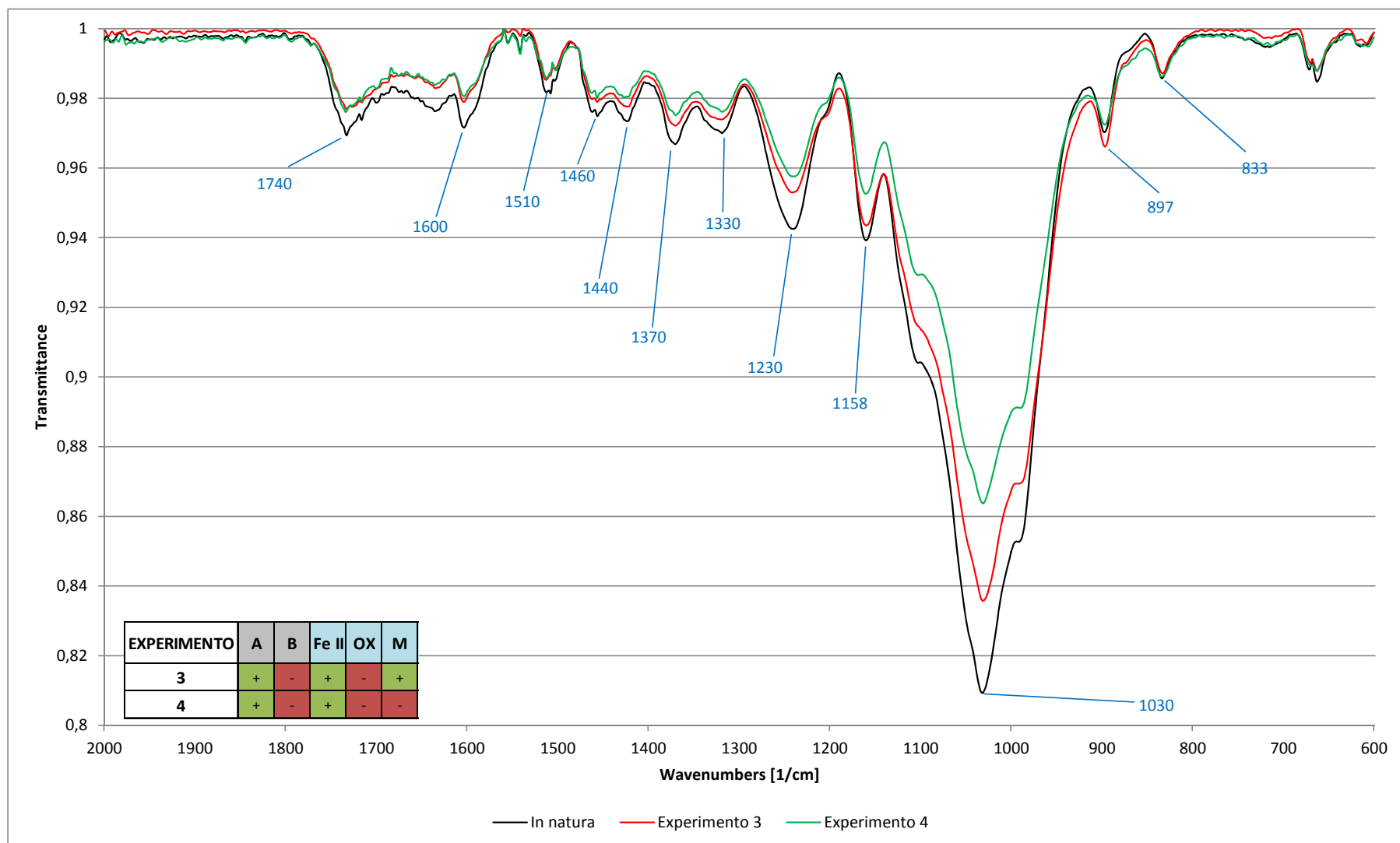


Figura 27 - Espectros do IR do bagaço *in natura* e dos pré-tratamentos 3 e 4.

6.7. Análise termogravimétrica do bagaço pré-tratado

De acordo com Ernesto et al. (2009) a variação de massa observada de 25-145 °C foi atribuída à remoção da humidade absorvida da atmosfera presente no bagaço de cana. Segundo ele ainda, a perda de massa no intervalo de 120-550 °C variou de 90-97%.

Na Figura 28 são apresentadas as curvas termogravimétricas (TGA) e a respectiva derivada (DTA) do bagaço *in natura*, submetido aos pré-tratamentos. Foi possível observar as temperaturas *onset* (367,5 °C) e *end* (417 °C) de maior variação de massa (70, 6 %/min), com perda de massa maior de 66,5 % em 400 °C.

Na Figura 29 são apresentadas a DTA do bagaço proveniente do pré-tratamento 15 e a DTA do bagaço *in natura*, sendo possível observar a influência de 3,0 min de irradiação de microondas na termo estabilidade do bagaço, mas ainda sim com comportamento semelhante ao do bagaço *in natura*, conforme espectros da Figura 17.

A estabilidade térmica do bagaço resultante dos pré-tratamentos 13 e 14 pode ser comparada pelas Figuras 30 e 31, demonstrando maior estabilidade térmica do bagaço do pré-tratamento 14 que resultou em ART, glicose e xilose maior do que o pré-tratamento 13. Entretanto, a termo estabilidade observada no bagaço do pré-tratamento 18 não resultou em melhores resultados da hidrólise enzimática, ocorrendo modificações na estrutura deixando o material até mais estável termicamente conforme Figura 32.

As mudanças observadas por FTIR-ATR em alguns grupamentos característicos da lignina e de acordo com as curvas de DTA dos bagaços pré-tratados, é possível que as modificações ocorridas na lignina residual que permaneceu no bagaço tenham aumentado a razão intumescimento/hidrofilicidade devido à diminuição da propriedade hidrofílica da lignina, aumentando a acessibilidade à celulose e o rendimento da hidrólise enzimática em alguns tratamentos.

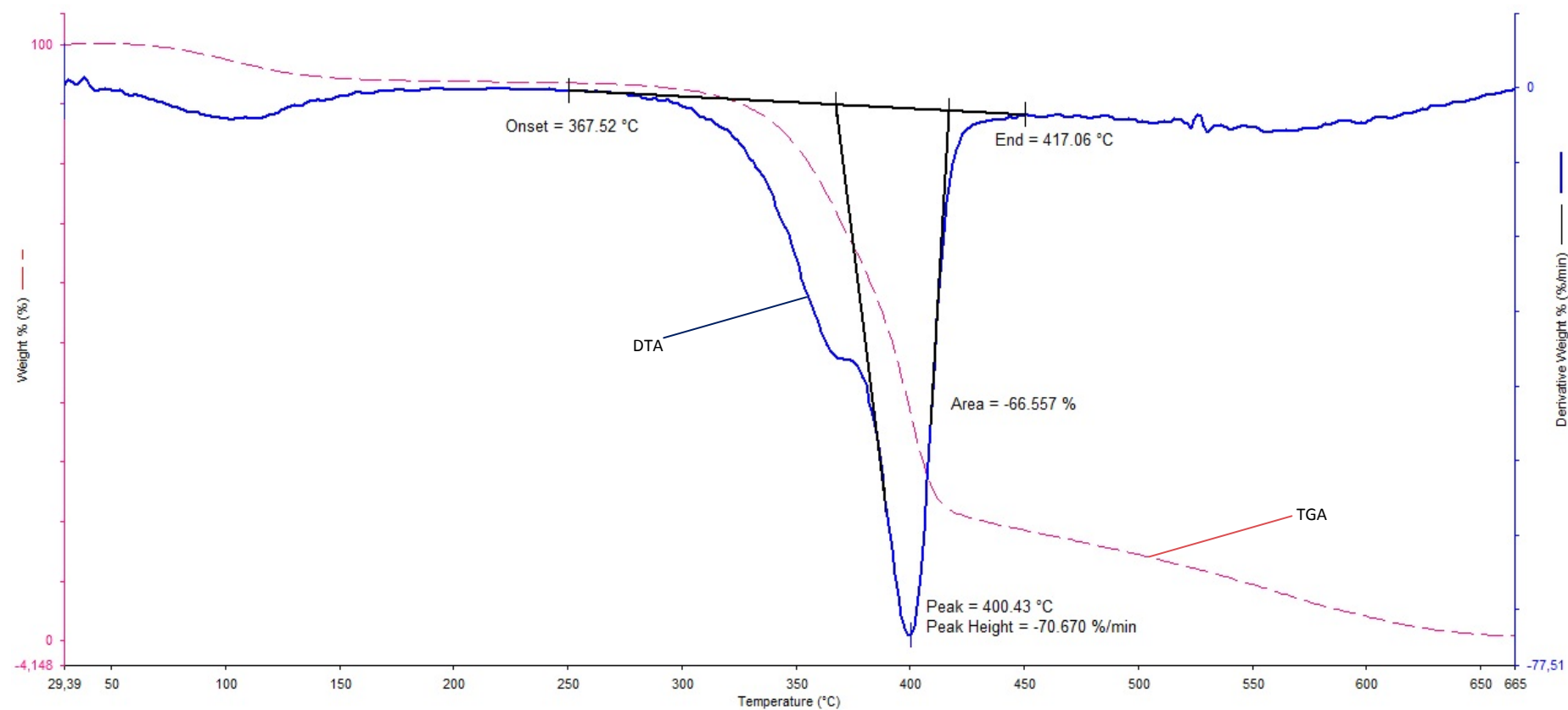


Figura 28 – Curva TGA e DTA do bagaço *in natura*.

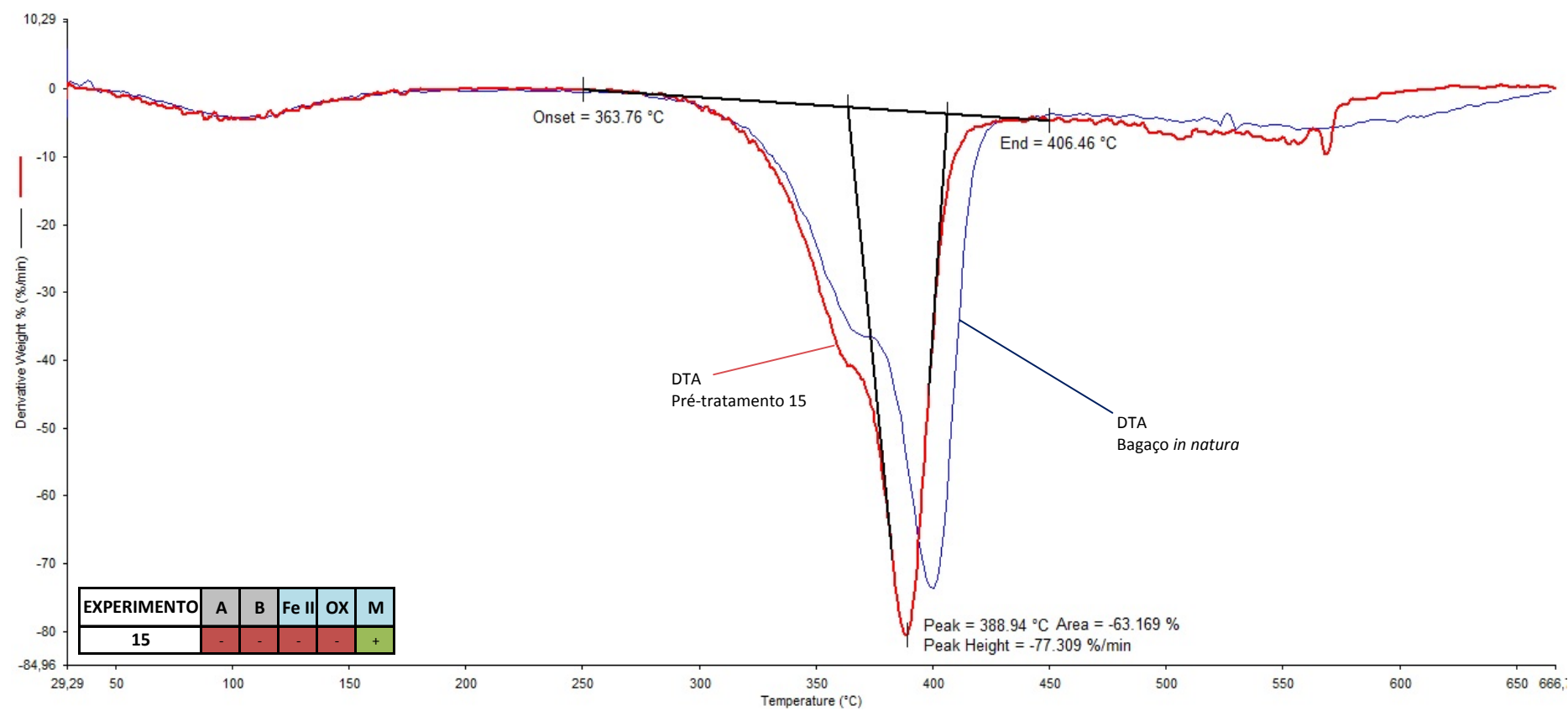


Figura 29 - Curva DTA do bagaço *in natura* e do bagaço do pré-tratamento 15.

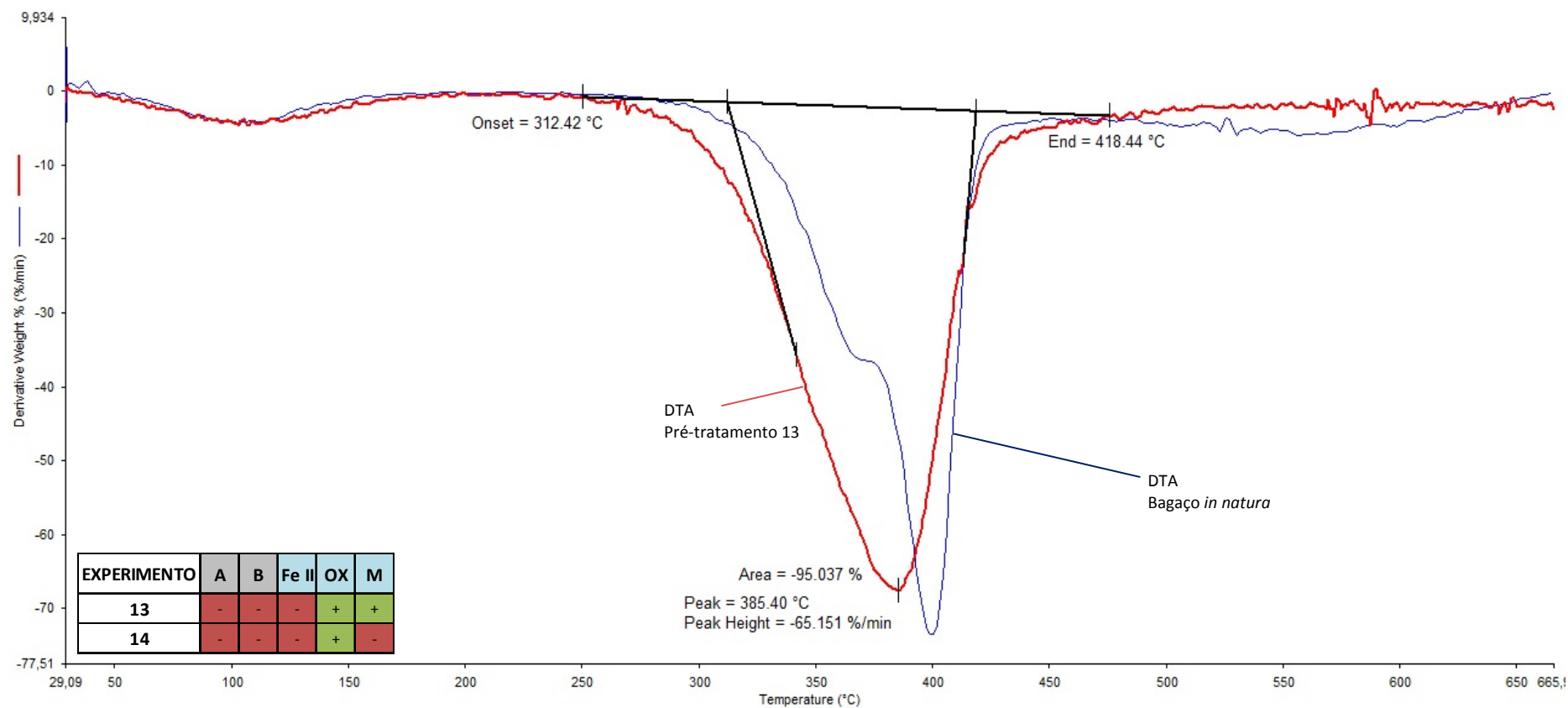


Figura 30 - Curva DTA do bagaço *in natura* e do bagaço do pré-tratamento 13.

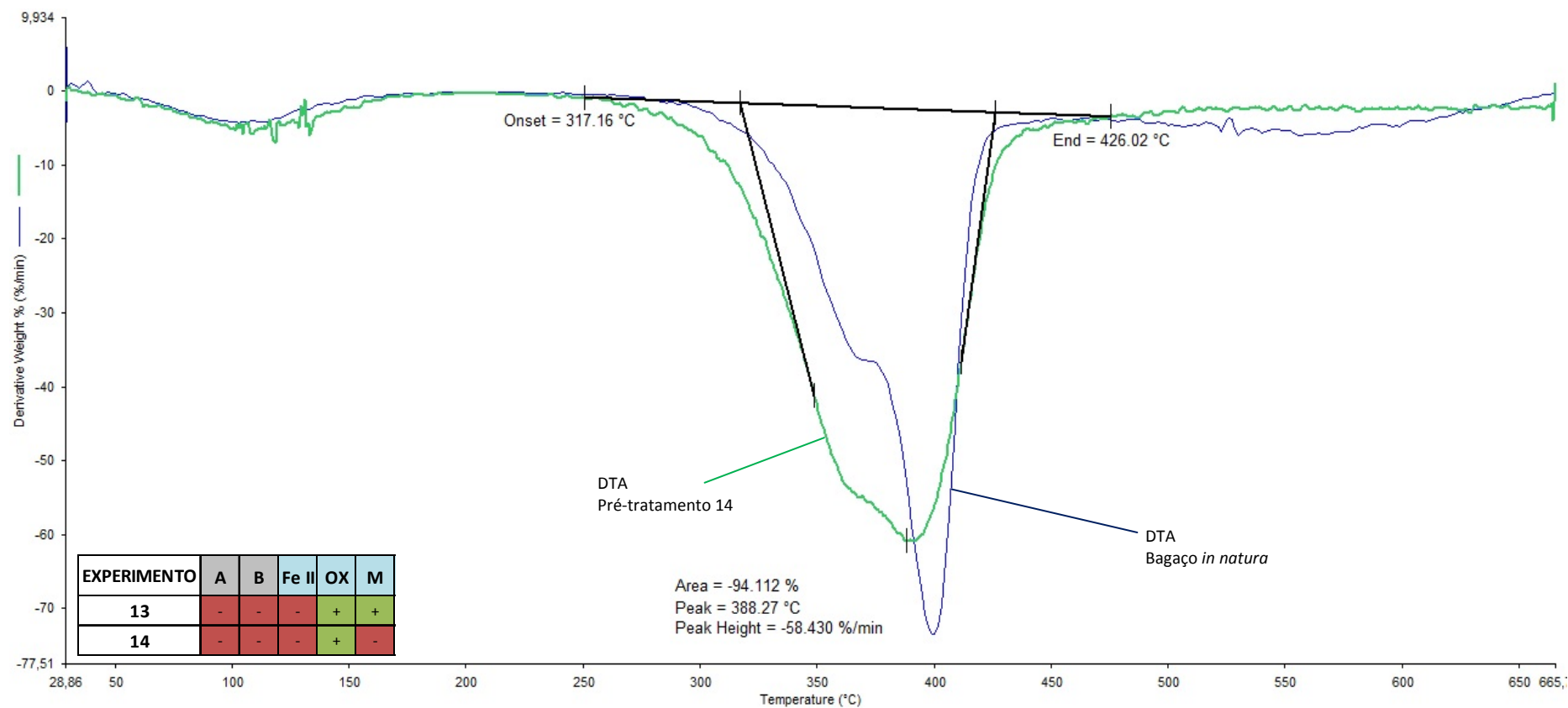


Figura 31 - Curva DTA do bagaço *in natura* e do bagaço do pré-tratamento 14.

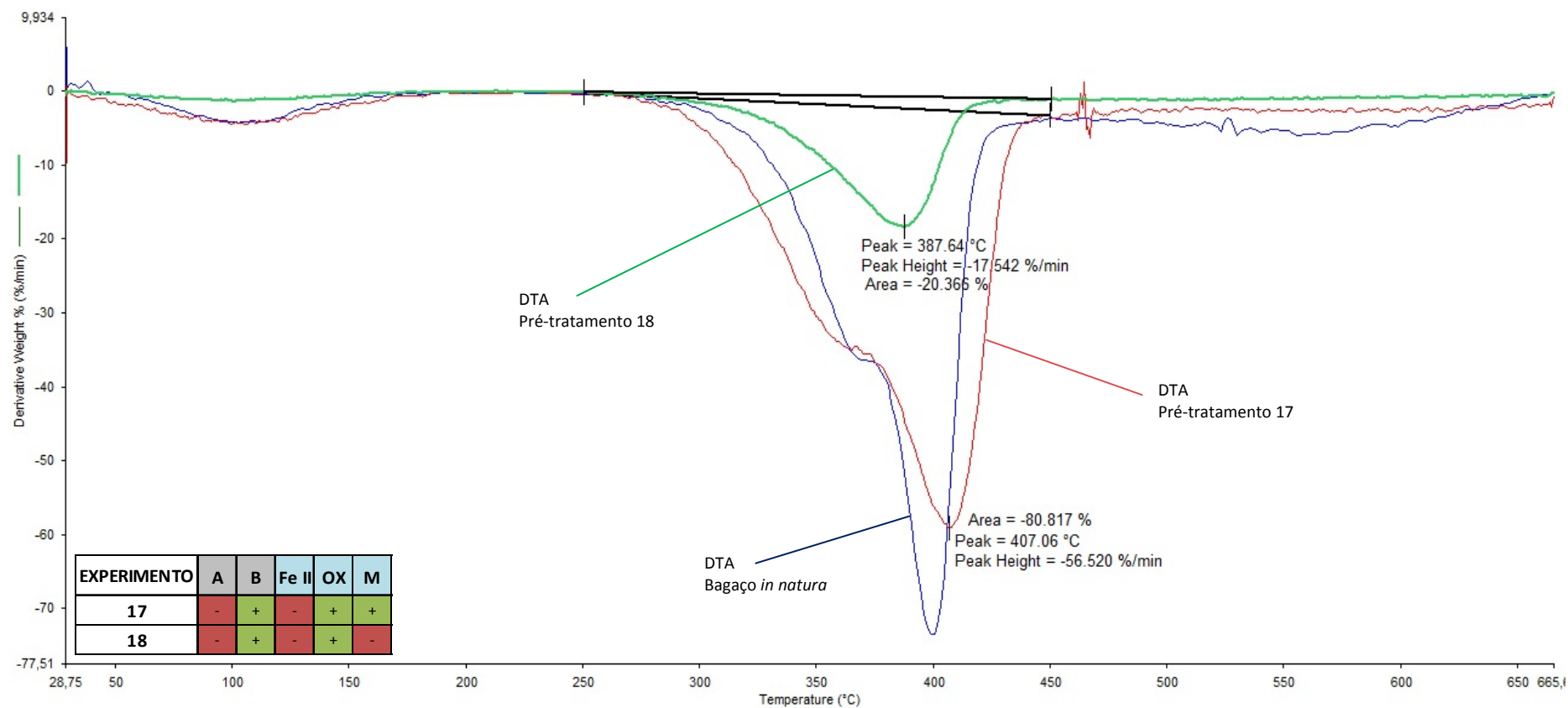


Figura 32 - Curva DTA do bagaço *in natura* e do bagaço do pré-tratamento 17 e 18.

6.8. Hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos de ART com os melhores resultados destacados em negrito, demonstrando que estes pré-tratamentos aumentaram a eficiência da hidrólise em relação do bagaço *in natura*.

Tabela 13 – Resultados de ART da hidrólise enzimática.

VARIÁVEL						UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)						mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)						mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)						mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)						mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas						min	M	0,5	3,0
EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	ART DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (mg/g)		DESVIO	
1	+	-	+	+	+	14,93		0,14	
2	+	-	+	+	-	22,53		0,07	
3	+	-	+	-	+	111,78		0,16	
4	+	-	+	-	-	100,43		0,04	
5	+	-	-	+	+	31,92		0,04	
6	+	-	-	+	-	50,42		0,06	
7	+	-	-	-	+	64,28		0,29	
8	+	-	-	-	-	51,63		0,01	
9	-	-	+	+	+	22,32		0,21	
10	-	-	+	+	-	24,83		0,07	
11	-	-	+	-	+	86,73		0,03	
12	-	-	+	-	-	84,64		0,08	
13	-	-	-	+	+	18,23		0,17	
14	-	-	-	+	-	73,79		0,01	
15	-	-	-	-	+	88,40		0,02	
16	-	-	-	-	-	81,72		0,00	
17	-	+	-	+	+	100,93		0,06	
18	-	+	-	+	-	9,61		0,12	
19	-	+	-	-	+	7,34		0,01	
20	-	+	-	-	-	8,98		0,02	
In natura + EZ						32,72		0,36	
EZ + água						18,13		0,07	
In natura + água						0		0,00	

*Código de identificação de cada variável.

ND = Não detectado.

< LQ = Abaixo do limite inferior da curva padrão (0,1 mg/L).

EZ = Enzima.

Na Figura 33 é apresentada a curva padrão utilizada na análise de ART do hidrolisado, sendo possível observar boa correlação linear da análise.

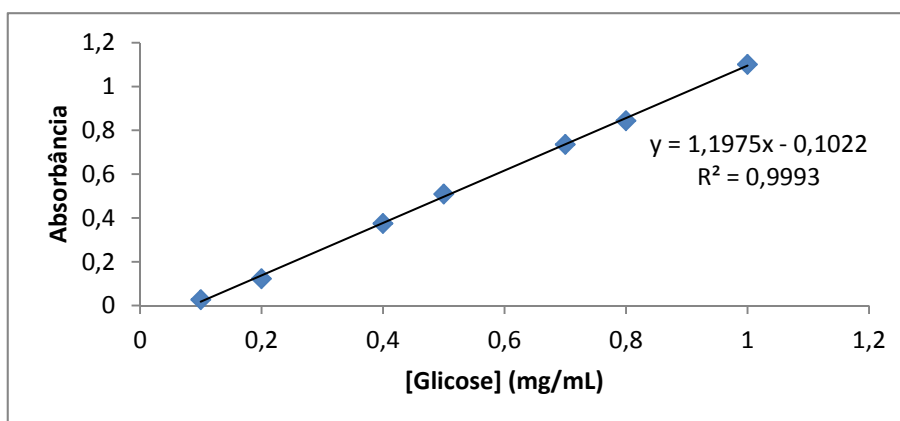


Figura 33 - Curva padrão utilizada na análise de ART do hidrolisado.

O resultado da atividade do papel filtro da enzima (32 FPU/g) demonstra ser semelhante da hidrólise do bagaço *in natura* (33 mg/g), indicando que a utilização da enzima tem eficiência comprovada. Possibilita ainda avaliar em termos dos resultados de ART a eficiência de cada pré-tratamento testado.

O efeito da irradiação de microondas observado no resultado de ART em relação ao bagaço *in natura* pode ser observado nos pré-tratamentos 15 e 16. A diferença de exposição de 0,5 min e 3,0 min teve pouca influência em modificar o material lignocelulósico, visto que foram observadas modificações estruturais semelhantes comparando-se os experimentos dos pré-tratamentos 15 com 16.

Quando adicionado o oxidante (experimentos 13 e 14), a diferença no tempo de exposição foi fundamental para a liberação de ART na hidrólise enzimática, sendo observado o melhor rendimento (experimento 14) em 0,5 min de irradiação (temperatura mais branda), que também resultou na quantificação de glicose significativamente maior do que o bagaço *in natura* e o bagaço do pré-tratamento 13 (Tabela 13 e 14).

Os melhores resultados de ART foram obtidos nos pré-tratamentos 3, 4 e 17, sendo que este último foi o único conduzido na presença de persulfato de sódio. Notoriamente, o tempo de 3,0 min foi fundamental para aumentar a eficiência do oxidante em meio alcalino quando comparado com o resultado do pré-tratamento 18, possivelmente relacionado à decomposição do sal de persulfato e geração de radicais,

conforme as reações 03 e 04. Na Tabela 14 são comparados os resultados obtidos dos pré-tratamentos 3, 4 e 17.

Tabela 14 - Resultados gerais dos pré-tratamentos 3, 4 e 17 em mg/g de bagaço.

EXPERIMENTO	pH MÉDIO	VARIAÇÃO DE MASSA	ART PRÉ-TRATA*.	FT	HMF	FURFURAL	ART HIDRÓLISE
3	1,80	8%	0,27	0,83	< LQ	ND	111,78
4	1,83	7%	0,35	0,91	ND	< LQ	100,43
17	4,56	10%	0,03	0,01	< LQ	< LQ	100,93

* Pré-tratamento

Embora os resultados de ART das hidrólises dos pré-tratamentos 3 e 4 tenha sido alto em comparação aos demais pré-tratamentos, estes apresentaram concentrações significativas de FT e fenol. O pH ácido dos experimentos 3 e 4 (em comparação com os pré-tratamentos 7 e 8) favoreceram a degradação da matriz de lignina e uma pequena parte da celulose, visto que foram as maiores concentrações detectadas de ART liberados durante o pré-tratamento.

Os pré-tratamentos 3 e 4 facilitaram a desconstrução do bagaço na região da lignina, mas com menor eficiência na hemicelulose, pois o acesso da enzima ao substrato celulósico pode ter sido limitada devido à baixa concentração de xilose detectada e resultou também em baixa produção de glicose, mais baixa até que a hidrólise do bagaço *in natura*. Por fim, a concentração alta de ART dos pré-tratamentos 3 e 4 representam a presença de oligossacarídeos e não de glicose e/ou xilose, indicando que as condições utilizadas nos experimentos 3 e 4 removem uma parte da lignina mas não afeta à estrutura da hemicelulose a ponto de facilitar a clivagem enzimática das ligações glicosídicas.

O resultado do experimento 17 possibilitou um aumento de aproximadamente 300% de ART liberados em relação ao bagaço *in natura* durante a hidrólise enzimática. Ainda no experimento 17 os inibidores furânicos permaneceram abaixo do LQ e os FT muito abaixo de 50 mg/L que segundo Arruda et al. (2008) teriam inibido drasticamente a fermentabilidade do hidrolisado C5 pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, que é bem mais sensível aos inibidores do que a *Saccharomyces cerevisiae*.

Uma vez que o bagaço pré-tratado foi lavado e de acordo com os resultados observados para os pré-tratamentos com Fe II e persulfato, é possível que os íons Fe III formados pela transferência de elétrons com o oxidante e que permaneceram aprisionados na fibra, tenha inibido a hidrólise enzimática (Tabela 13 e 15).

6.9. Quantificação de glicose e xilose

Os resultados das análises de ART de uma maneira geral não foram próximos da quantificação de glicose e xilose, pois a mistura de ART também contém oligossacarídeos. Nas Figura 34 e Figura 35 são apresentadas as curvas padrões utilizadas na determinação de xilose e glicose respectivamente, indicando boa correlação linear utilizada na análise.

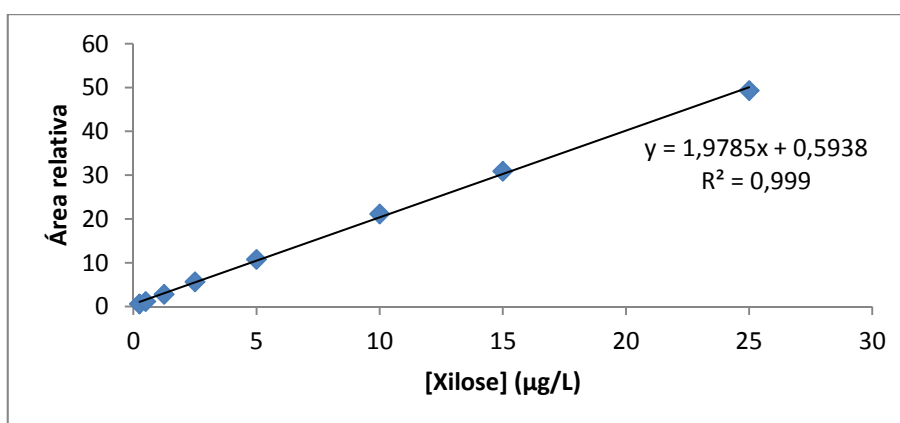


Figura 34 - Curva padrão utilizada na análise de xilose.

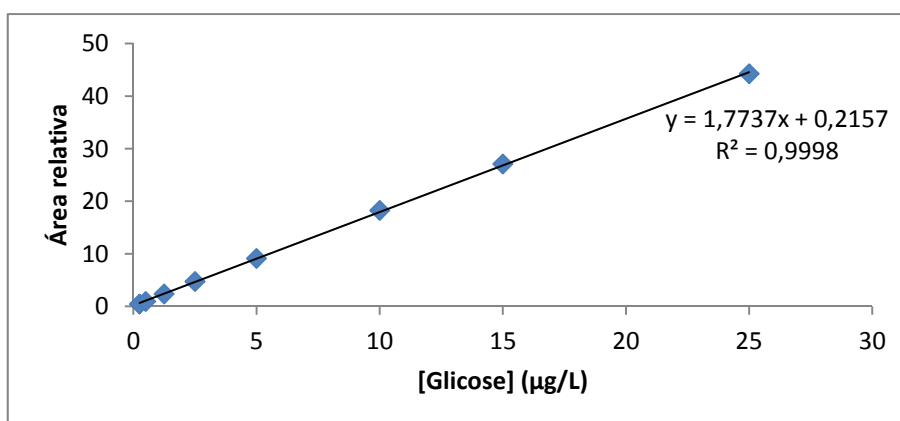


Figura 35 - Curva padrão utilizada na análise de glicose.

Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos nas análises de glicose e xilose do hidrolisado, com destaque para os resultados em negrito. Os experimentos 14,

15, 16 e 17 foram os pré-tratamentos que resultaram na maior liberação de glicose e xilose acima da hidrólise do bagaço *in natura* (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultados de glicose e xilose da hidrólise do bagaço.

VARIÁVEL						UNIDADE	ID*	NÍVEL (-)	NÍVEL (+)
Concentração de ácido (ácido sulfúrico)						mol/L	A	0	0,1
Concentração de base (hidróxido de sódio)						mol/L	B	0	0,1
Concentração de ferro 2 (cloreto ferroso)						mol/L	Fe II	0	0,2
Concentração de oxidante (persulfato de sódio)						mol/L	OX	0	0,1
Tempo de microondas						min	M	0,5	3,0
EXPERIMENTO	A	B	Fe II	OX	M	CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE (mg/g)	DESVIO	CONCENTRAÇÃO DE XILOSE (mg/g)	DESVIO
1	+	-	+	+	+	3,0	0,6	0,9	1,1
2	+	-	+	+	-	11,1	0,4	0,9	0,1
3	+	-	+	-	+	11,3	0,4	4,1	1,1
4	+	-	+	-	-	24,6	0,9	1,4	0,9
5	+	-	-	+	+	3,8	1,5	0,5	3,3
6	+	-	-	+	-	9,0	1,3	0,9	1,6
7	+	-	-	-	+	3,6	0,5	0,8	1,1
8	+	-	-	-	-	9,2	1,9	1,5	2,9
9	-	-	+	+	+	1,7	0,3	0,6	0,3
10	-	-	+	+	-	8,4	0,5	0,8	0,5
11	-	-	+	-	+	20,2	0,1	0,8	0,1
12	-	-	+	-	-	16,3	0,0	0,8	0,3
13	-	-	-	+	+	11,8	4,2	4,9	4,7
14	-	-	-	+	-	41,0	1,8	6,9	5,7
15	-	-	-	-	+	39,3	1,1	5,7	0,6
16	-	-	-	-	-	44,3	3,5	6,9	5,3
17	-	+	-	+	+	53,5	1,7	10,9	2,1
18	-	+	-	+	-	1,7	0,3	0,2	0,0
19	-	+	-	-	+	3,4	2,1	0,3	2,1
20	-	+	-	-	-	1,0	0,4	0,1	0,6
<i>In natura + EZ</i>						33,0	8,2	4,1	9,5

*Código de identificação de cada variável.

EZ = Enzima.

Comparando-se os resultados da quantificação de glicose e xilose do bagaço *in natura* com as obtidas dos pré-tratamentos 15 e 16 (apenas irradiação de microondas), é possível verificar que o uso das microondas provoca uma desestruturação do bagaço facilitando a ação da enzima (Figura 17), muito provavelmente relacionado ao aumento dos poros disponíveis para o acesso da enzima ao substrato de interesse (OGEDA; PETRI, 2010).

Como observado nas análises de ART dos pré-tratamentos 13 e 14, o menor tempo de exposição à irradiação de microondas do experimento 14 foi mais eficiente na liberação de glicose e xilose do que o pré-tratamento 13, quando comparados ao rendimento da hidrólise do bagaço *in natura*.

De certo modo, os processos oxidativos avançados constituem numa tecnologia não pressurizada no meio aquoso, que possibilita reduzir gastos com energia, sendo que fornecer energia desnecessária ao sistema pode contribuir para o aumento da temperatura e consequentemente maior probabilidade das espécies radicalares efêmeras se chocarem atenuando a propagação em cadeia (HOAREUA et al., 2004; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Verificou-se o melhor rendimento de glicose (164%) e xilose (266%) em relação ao bagaço *in natura* resultante do pré-tratamento 17 (oxidante em meio alcalino), na qual a exposição de 3,0 min de irradiação de microondas foi fundamental para o rendimento maior se comparado ao pré-tratamento 18. Contrariamente, não foi obtido resultado semelhante em facilitar a liberação de glicose e xilose nos pré-tratamentos alcalinos na ausência de persulfato, ressaltando que a influência na desestruturação da lignina foi um processo combinado do oxidante e as hidroxilas do meio.

Pode-se inferir que o persulfato reage simultaneamente com a fibra e nos compostos fenólicos que foram solubilizados, uma vez que os pré-tratamentos alcalinos resultam em elevadas concentrações de fenólicos, como observado nos pré-tratamentos 19 e 20. Já os teores baixos de fenólicos dos pré-tratamentos 17 e 18 foram devidos à presença do oxidante (ZHU et al., 2006; LIUTTI, 2007; OGEDA; PETRI, 2010; LIU et al., 2012).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pré-tratamentos de maneira geral contribuíram para facilitar o acesso da enzima a matriz de hemicelulose e celulose, além de solubilizar parte da lignina devido à formação de compostos fenólicos (FT) na ausência de persulfato. Com exceção do pré-tratamento 17, a formação de compostos fenólicos foi devido à degradação não seletiva da lignina (CHURSIN, 2007; ARRUDA et al., 2008; SINGH; SINGH; CHANDRA, 2009).

O resultado de glicose e xilose a partir do pré-tratamento 17 e com a presença de 0,01 mg/g de FT foi ligeiramente maior do que os pré-tratamentos 13 e 14 que não resultaram em compostos fenólicos.

As concentrações de fenol detectadas nos pré-tratamentos 3 e 4, sendo os maiores resultados de ART e FT (Figura 36), podem ser consideradas um parâmetro indireto de eficiência do pré-tratamento em gerar radicais sulfatos (LIUTTI, 2007; LIU et al., 2012). Contudo é preciso estimar a concentração de fenol presente na lignina antes do pré-tratamento e depois do pré-tratamento, além de diferenciar se o fenol residual é da lignina.

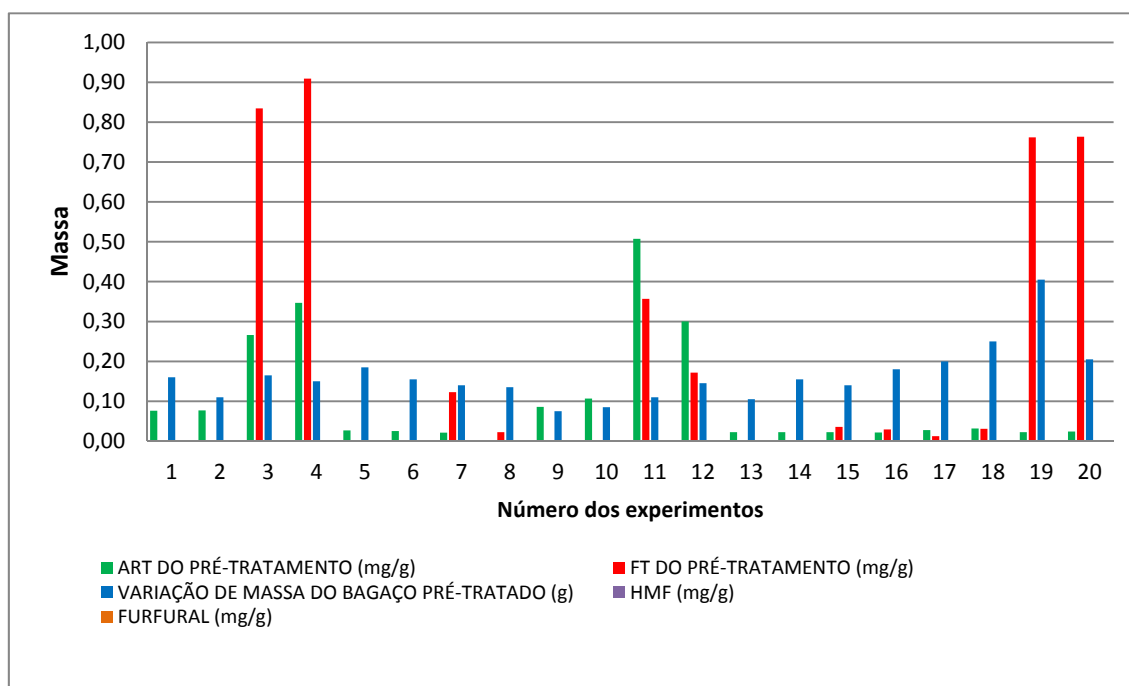


Figura 36 - Perfil dos resultados do líquido resultante dos pré-tratamentos.

A ausência de HMF e furfural no líquido dos pré-tratamentos demonstraram que a matriz de carboidratos não foi hidrolisada quimicamente, conforme concentrações baixas de ART obtidas nesta etapa (Figura 36). Indicou que a oxidação com persulfato possa ser mais seletiva para os centros aromáticos da lignina, agindo de maneira simultânea na degradação da lignina e parte de hemicelulose, além dos compostos fenólicos que por ventura possam ser liberados da lignina e/ou formados de anéis aromáticos e hidroxilas disponíveis no meio alcalino.

A redução da granulometria do bagaço de partida embora altamente desfavorável do ponto de vista energético aumenta a área superficial disponível favorecendo a sacarificação enzimática (CANILHA; MILAGRES; SILVA, 2010). No entanto, com base nos resultados obtidos foi possível combinar o persulfato com condições químicas distintas e obter bons resultados ainda com o bagaço integral (Figura 37).

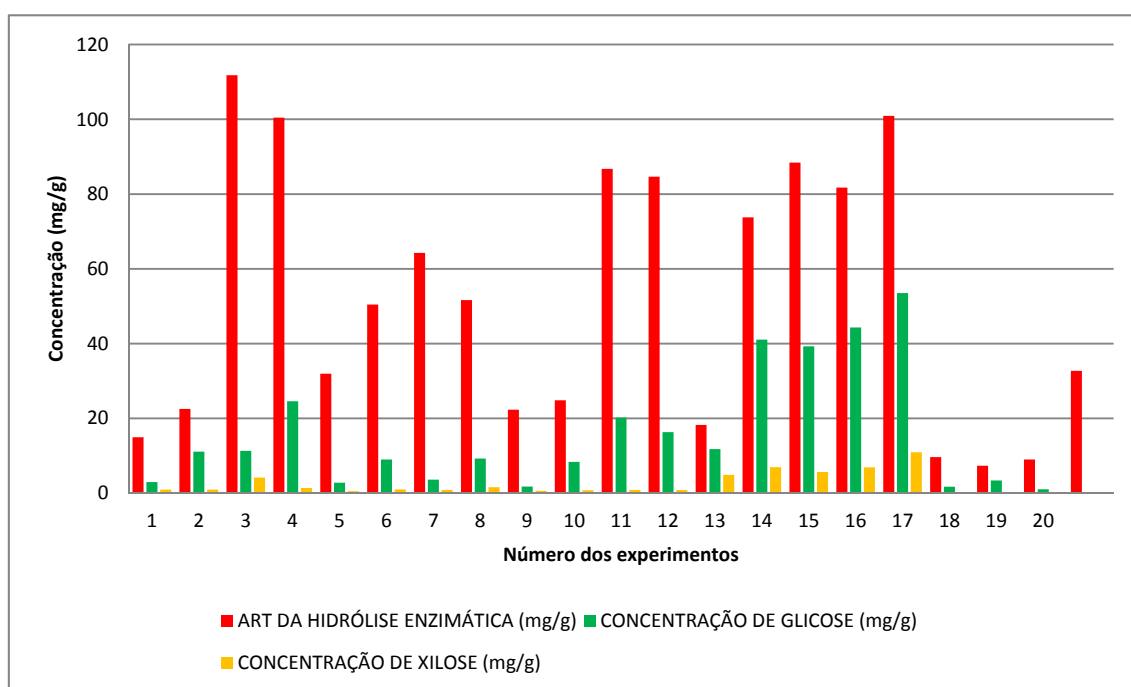


Figura 37 - Perfil dos resultados do bagaço hidrolisado.

A utilização de apenas persulfato de sódio e 0,5 min de irradiação de microondas (80 ± 8 °C) como pré-tratamento do bagaço, contribuiu para a melhoria do rendimento de produção de glicose (124%) e xilose (120%) se comparado à hidrólise enzimática do bagaço *in natura*. Neste pré-tratamento ainda, não ocorreram a formação significativa de

compostos furânicos e fenólicos, visto que ambos os inibidores permaneceram abaixo do LQ dos métodos (Figura 36).

A utilização do persulfato permitiu ainda reações por oxidação direta da lignina e reações por oxidação radicalar em condições químicas distintas, muito embora o melhor rendimento, com mínima formação de inibidores, tenha sido obtido em meio alcalino (164% para glicose e 266% para xilose em comparação ao bagaço *in natura*).

O pré-tratamento com persulfato em meio alcalino com 3,0 min de irradiação de microondas (110 ± 8 °C) resultou na formação de 0,01 mg de fenólicos totais por grama de bagaço pré-tratado, ainda sim muito abaixo do considerado inibidor da fermentação (ARRUDA et al., 2008; XIMENES et al., 2010; KIM et al., 2011; CAO et al., 2013).

É evidente a versatilidade química do persulfato de sódio no pré-tratamento do bagaço de cana, pois com base nas informações apresentadas, é possível que o persulfato possa ser útil também como reagente adicional nos demais processos de pré-tratamento de bagaço de cana que visam à produção de etanol de 2ª geração.

8. CONCLUSÃO

O pré-tratamento alcalino com persulfato de sódio em 3,0 min de irradiação de microondas apresentou os melhores rendimentos de glicose (164%) e xilose (266%) quando comparado com a hidrólise enzimática do bagaço *in natura*, além de 0,01 mg de compostos fenólicos por grama de bagaço pré-tratado. Outro ponto importante foi que o pré-tratamento somente com persulfato de sódio em 0,5 min apresentou rendimentos de glicose (124%) e xilose (120%) em relação ao *in natura*, não sendo detectados compostos fenólicos.

Para a proposta de pré-tratamento do bagaço de cana e sacarificação enzimática, o persulfato de sódio se apresenta um reagente versátil, pois pode ser empregado em condições químicas distintas, sem consumir a matriz de carboidratos essencial, sendo que é possível reagir de maneira sinérgica na desestruturação do material lignocelulósico e na oxidação dos inibidores solubilizados.

9. REFERÊNCIAS

ADEBAJO, M. O.; FROST, R. L. Infrared and ^{13}C MAS nuclear magnetic resonance spectroscopic study of acetylation of cotton. *Spectrochimica Acta Part A*, Elsevier, Brisbane, n. 60, p. 449-453. 2004.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, Elsevier, Madrid, n. 101, p. 4851-4861. Dec. 2009.

ARRUDA, P. V. et al. Efeito da detoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. *Nucleus*, Lorena, v. 5, n. 1. p. 166-182. Abr. 2008.

BLOCK, P. A.; BROWN, R. A.; ROBINSON, D. Novas Tecnologias de Ativação para Oxidação Química In Situ com Persulfato de Sódio." *Ata da Quarta Conferência Internacional de Remediação de Compostos Clorados e Recalcitrantes*, [S.I], [s.n.]. 2004. Sem paginação.

BRASIL. *Matriz Energética*. Brasília: Governo Federal, 2013. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cop/panorama/o-que-o-brasil-esta-fazendo/matriz-energetica>> Acesso em: 19 ago. 2013.

BRASILEIRO, L. B.; COLODETTE, J. L.; PILÓ-VELOSO, D. A utilização de perácidos na deslignificação e no branqueamento de polpas celulósicas. *Química Nova*, [S.I.], v. 24, n. 3, p. 819-829. 2001.

CANILHA, L., A.; MILAGRES, M. F; SILVA, S. S. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrolise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de "desconstrução" da fibra vegetal. *Revista Analytica*, São Paulo, n. 44, p. 48-91. Jan. 2010.

CAO, G. E. et al. Biological abatement of cellulase inhibitors. *Bioresource Technology* Elsevier, West Lafayette, n. 146, p. 604-610. 2013.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. *Decisão de Diretoria Nº 195-2005-E*. São Paulo: Diretoria Plena da CETESB. São Paulo, p. 14, 23 nov. 2005. Disponível em: <www.cetesb.sp.gov.br/Solo./relatorios/tabela_valores_2005.pdf> Acesso em: 24 ago. 2013.

CHURSIN, V. I. Features of oxidative degradation of hydroxyethyl cellulose. *Russian Journal of Applied Chemistry*, Pleiades Publishing, Moscow, v. 80, n. 4, p. 654-659. 2007.

CTBE. *Etanol celulósico é tendência no meio científico*. Campinas: Luiz Paulo Juttel, 03 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br/destaques/detalhe.php?ID=NTA=>>> Acesso em: 21 ago. 2013.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento Fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 9, n. 1, p 23-32. Jun. 2008.

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

DOS SANTOS, M. L. et al. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana de açúcar por análise térmica. *Química Nova*, [S.l], v. 34, [s.n]. 2011.

ERNESTO, V.A. R. T. et al. Thermal characterization of lignocellulosic residue from different sugarcanes. *ICTAC2008 Conference*, Akadémiai Kiado, Budapest, n. 97, p. 653-656. 2009.

FOLIN, O.; CICALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, [S.l], n. 73, f. 672. 1927.

DA FONSECA, J. C. L. Manual para gerenciamento de resíduos perigosos. Cultura Acadêmica, São Paulo, n. 1, p. 1-104. 2009.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Indian Institute of Technology*, New Delhi, [s.n]. 1987. Paginação irregular.

GODSAY, M.P. *Ozone-cellulose studies: Physico-chemical properties of ozone oxidized cellulosic and lignocellulosic materials*. 1995. 239 f. Tese - Doutorado em Ciência e Engenharia de Polímeros. University Microfilms International, New York, 1985.

GÔMEZ, C. H. R. J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, [s.n.]. 1985. Paginação irregular.

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

HAHN-HAGERDAL, B. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, Elsevier, Lund, v. 24, n. 12. 16 out. 2006.

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

HOAREUA, W. et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. *Polymer Degradation and Stability*, Elsevier, [S.I.], n. 86, p. 567-576. 04 jul. 2004.

HUBER, C.; MAICHE, R. Desenvolvimento da produção e pesquisa de bioetanol nos Estados Unidos: Um enfoque nas rotas bioquímicas. *Revista Thema*, [S.I.], v. 7, [s.n.]. 2010.

ITRC. Technical and Regulatory Guidance for In Situ Chemical Oxidation of Contaminated Soil and Groundwater. *Technical/Regulatory Guideline*, The Interstate Technology & Regulatory Council, [S.I.], n. 2, p. 7-10. Jan. 2005.

KIM, Y. E. et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier, [S.I.], n. 48, p. 408-415. 31 jan. 2011.

KLINKE, H.B. et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, Elsevier, [S.I.], v. 82, n. 1, p. 15-26. 2002.

KLOCK, U. Reações Químicas da Madeira. *Química da Madeira*, [S.I.], [s.n.], 2003. Não paginado.

LIU, C. et al. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Industrial Crops and Products*, [S.I.], v. 26, [s.n.], p. 212-219. 2007.

LIU, H. et al. *Oxidation of organic contaminants by activation of persulfate and hydrogen peroxide*. Berkeley: University of California. Department of Civil and Environment Engineering. 21 jun. 2012. Disponível em:
<https://www.youtube.com/watch?v=n_Fvt3sDs3Q> Acesso em: 23 jan. 2013.

LIUTTI, G. C. *Estudo do emprego de radicais sulfato na degradação de compostos fenólicos*. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LOPES, R. V. V. et al. Aplicação do planejamento fatorial para otimização do estudo da produção de fermentado do fruto da palma forrageira. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, [S.I.], v. 7, n. 1, p. 25-32. 2005.

MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method form enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Journal Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier, [S.I.],v. 40, [s.n.], p. 426-432. 2006.

MARTIN, C. et al. Investigation of cellulose convertibility where science meets business and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse by wet oxidation and steam explosion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Elsevier, [S.I.], v. 81, [s.n.], p. 1669-1677. 2006.

MIGUEL, A. A. *Avaliação do uso de radiação microondas e ultrassom combinados com agentes químicos como pré tratamentos de bagaço de cana de açúcar para posterior sacarificação enzimática*. Dez. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, dez. 2009.

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

MS. Ministério da Saúde. *Portaria Nº 2.914*. Edição: Alexandre Rocha Santos Padilha. Brasília, Distrito Federal: Gabinete do Ministro da Saúde. Brasília, p.1-11, 12 dez. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm./2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: 24 ago. 2013.

NINOMIYA, K. H. et al. Sonocatalytic–Fenton reaction for enhanced OH radical generation and its application to lignin degradation. *Ultrasonics Sonochemistry*, Elsevier, Kanazawan, n. 20, p. 1092–1097. Jan. 2013.

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

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, Elsevier, [S.I.], n. 50, p. 1-39. Jul. 2007.

QUESADA, J., M. RUBIO, e D. GÓMEZ. "Chemical characterization of ozonated lignin solutions from corn (*Zea mays*) stalk and poplar (*Populus deltoides*) wood by capillary gas chromatography." *J. High Resol. Chromatog.* 20 (1997): 565-568.

RAÍZEN. Produção de etanol cresce 3,9% na primeira quinzena de setembro. *Notícias Raízen*. 25 set. 2013. Disponível em: <<http://www.raizen.com/pt-br/imprensa/noticias?id=781>> Acesso em: 25 set. 2013.

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

RIBEIRO, P. R., J. R. M. CARVALHO, e REGINA GERIS. "Furfural – Da biomassa ao laboratório de química orgânica." *Química Nova*, Salvador, v. 35, n. 5, p. 1046-1051. Jan. 2012

RICCI, A. Bioeletricidade atinge marco histórico no Brasil. *Jornal da Cana*, ProCana Brasil. 22 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/noticia/Jornal-Cana/55501+Bioeletricidade-atinge-marco-historico-no-Brasil>> Acesso em: 03 dez. de 2013.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, [s.n.], p. 841-846. Ago. 2008.

SANSEVERINO, A. M. Microondas em síntese orgânica. *Química Nova*, [S.l.], v. 25, n. 4, p. 660-667. 2002.

SANTOS, F. A.; DE QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L. Potencial da Palha de Cana-de-açúcar para Produção de Etanol. *Química Nova*, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 1004-1010. Jan. 2012.

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

SCOTT, G. H. et al. Advancing In Situ Chemical Oxidation (ISCO) Technology. REGENESIS. 2013. Disponível em: <<http://www.regenesis.com/contaminated-site-remediation-products/chemical-oxidation/persulfOx/download-whitepaper.aspx>> Acesso em: 27 out 2013.

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

SILVA, M. R.; SILVA, F. J. O papel do ozônio na remoção dos ácidos hexenurônicos e na designificação durante o branqueamento ECF de polpa kraft de eucalipto. *35º Congresso e Exposição Anual de Celulose e Papel*. São Paulo: Associação Brasileira Técnica de Celulose e Papel, 2002.

SINGH, S.; SINGH, B. B.; CHANDRA, e R. Biodegradation of phenol in batch culture by pure and mixed strains of *Paenibacillus sp.* and *Bacillus cereus*. *Polish Journal of Microbiology*, [S.l.], v. 15, [s.n.], p. 319-325. Set. 2009.

SOLOMONS, G., e C. FRYHLE. *Química orgânica*. LTC, Rio de Janeiro, RJ, [s.n.], f. 474. 2001.

SOUZA, Z. J. Bioeletricidade: O que falta para esta alternativa energética deslançar. *Revista Mercado Empresarial*, [S.l.], n. 42. Set. 2012. Não paginado.

SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic. *Bioresource Technology*, [S.l.], v. 83, [s.n.], p. 1-11. 2002.

VORLOVÁ, L., I. BORKOVCOVÁ, K. KALÁBOVÁ, e V. VEČERK. Hydroxymethylfurfural contents in foodstuffs determined by HPLC method. *Journal of Food and Nutrition Research*, [S.l.], v. 45, n. 1, p. 34-38. 2006.

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*, [S.l.], v. 91, [s.n.], p. 1-33. 2011.

WILSON, S. W. et al. Access the new persulfox catalyzed persulfate white paper. REGENESIS, San Clemente, CA. 2013. Disponível em: <<http://www.regenesis.com/contaminated-site-remediation-products/chemical-oxidation/persulfOx/download-whitepaper.aspx>> Acesso em: 16 jul. 2013.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, T. R. Coordinated development of leading biomass. *Bioresource Technology*, Elsevier, [S.l.], v. 96, [s.n.], p. 1959-1966. Fev. 2005.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier, [S.l.], n. 46, p. 170-176. Nov. 2010.

XU, F.; SUN, R. C.; LU, Q. Characteristics of cellulose isolated by a totally chlorine - Free method from *Caragana korshinskii*. *Journal of Applied Polymer Science*, Wiley Periodicals, [S.l.], [s.n.], p. 3251–3263. 2006.

ZHANG, J. et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. *Bioresource Technology*, Elsevier, [S.l.], n. 102, p. 4585–4589. 2011.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Society for Industrial Microbiology*, [S.l.], [s.n.], p. 367-375. 8 jan. 2008.

ZHU, S. D. et al. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Bios. Engin.*, [S.l.], v. 94, [s.n.], p. 437-442. 2006.

ZHU, S. D., et al. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*, v. 41, [s.n.], p. 869-873. 2006.

