

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

ALESSANDRA ANDRADE MIGUEL

**AVALIAÇÃO DO USO DE RADIAÇÃO MICRO-ONDAS E
ULTRASSOM COMBINADOS COM AGENTES QUÍMICOS COMO
PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA
POSTERIOR SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

São José do Rio Preto/ SP

Dezembro - 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

ALESSANDRA ANDRADE MIGUEL

**AVALIAÇÃO DO USO DE RADIAÇÃO MICRO-ONDAS E
ULTRASSOM COMBINADOS COM AGENTES QUÍMICOS COMO
PRÉ-TRATAMENTOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA
POSTERIOR SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos 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

São José do Rio Preto/ SP

Dezembro - 2009

ALESSANDRA ANDRADE MIGUEL

**AVALIAÇÃO DO USO DE RADIAÇÃO MICRO-
ONDAS E ULTRASSOM COMBINADOS COM
AGENTES QUÍMICOS COMO PRÉ-TRATAMENTOS
DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA
POSTERIOR SACARIFICAÇÃO ENZIMÁTICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Boscolo
Professor Assistente Doutor
IBILCE- UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena da Cruz
Professor Doutor
ESALQ – USP – Piracicaba

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Assistente Doutor
IBILCE – UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 04 de dezembro de 2009.

Dedico esta dissertação a Deus por me tocar com a luz da espiritualidade a cada novo dia; e a minha família, meus verdadeiros mestres, exemplos de perseverança, parceria, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível, pois estive em todos os momentos focada em Deus e na busca do auxílio e evolução espiritual, principal objetivo de minha vida.

Agradeço a minha família, principalmente a minha mãe Maria Cristina, a luz do meu viver; e a meu pai Miguel, por torcerem e batalharem pelo meu sucesso incentivando sempre a minha escolha. A minha irmã Andressa que amo incondicionalmente, agradeço pelo companheirismo, pelos cuidados e atenção comigo, e mesmo na distância, sempre com pensamentos uma na outra, em todos os momentos de nossas vidas e a minha avó Leonilda, meu exemplo de vida, pelo carinho e pelas orações.

Ao professor Maurício Boscolo pela orientação, conselho, apoio e dedicação, principalmente nos momentos de maior dificuldade, sempre muito compreensivo. Em todos os momentos que precisei estive disposto com um sorriso no rosto e experiências a ensinar. Tornou-se um amigo especial e um exemplo a ser seguido, tanto na busca pelo conhecimento científico, como na formação do caráter humano. Obrigada pela sua amizade.

Aqueles que enriqueceram o trabalho: Prof. Dr. Roberto da Silva, agradeço por ser sempre tão atencioso e pela sugestão de um novo pré-tratamento; Prof.^a Dr.^a Eleni Gomes pelo apoio, Prof. Dr. Romanelli pelos elogios e amizade e Prof. Dr. Fernando Hoffmann que sei o quanto torce por mim devido nossa grande amizade.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disposição em corrigir esse trabalho, principalmente a Prof.^a Dr.^a Sandra Cruz pela gentileza, simpatia e paciência em nossos contatos e pelo interesse e atenção com minha dissertação. Sou grata pela sua contribuição em meu trabalho. Ao Prof. Dr. Adilson Gonçalves por receber meu trabalho.

A todos os amigos que a vida me ofereceu: Priscila, Natália, Júlia, Viviane, e outros tão quanto especiais e aos amigos do Departamento de Engenharia de Alimentos, principalmente a Letícia Costa e Silva e Ana Paula Vieira pela amizade sincera e ajuda em todos os momentos.

Aos meus grandes companheiros de laboratório, Miki, Luana, Amanda, Camila, a Thaize Tobal, pelos momentos de sufoco superados juntas, e especialmente ao Rodolfo Travaini que inúmeras vezes me auxiliou com sua sabedoria sempre trazendo muito apoio material e espiritual e pela nossa contínua amizade, que tenho certeza que durará para sempre. Agradeço a todos pela convivência e momentos inesquecíveis vividos ao lado de vocês.

Agradecimentos sinceros a uma pessoa que considero como uma irmã - Lílian Rodrigues do Amaral - não somente por todo apoio e ajuda no laboratório transmitindo seus

conhecimentos, mas pela verdadeira amizade e sinceridade que tivemos em curta convivência, suficiente para demonstrar a amiga especial que é. Não tenho palavras pra agradecer, obrigada sempre.

Aos funcionários da seção de Pós - Graduação, principalmente a Rosana que como um anjo sempre esteve presente com orientações e palavras de acalanto e a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, fizeram parte desta etapa de minha vida.

Enfim, agradeço pela oportunidade única de conhecer pessoas tão especiais como todos vocês e por contribuírem na minha formação profissional. Sempre serão levados comigo em meu coração.

À Novozymes Latin América (Araucária-PR), pela doação dos complexos enzimáticos utilizados neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos Alimentos.

A Capes, pela concessão de bolsa de estudos.

MUITO OBRIGADA!

A vida não cessa. A vida é fonte eterna e a morte é o jogo escuro das ilusões. O grande rio tem seu trajeto, antes do mar imenso. Copiando-lhe a expressão, a alma percorre igualmente caminhos variados e etapas diversas, também recebe afluentes de conhecimentos, aqui e ali, avoluma-se em expressão e purifica-se em qualidade, antes de encontrar o oceano eterno da sabedoria. Oh! Caminhos das almas, misteriosos caminhos do coração! E percorrer-vos, antes de tentar a suprema equação da vida eterna torna-se indispensável viver o vosso drama, conhecer-vos detalhe a detalhe, no longo processo do aperfeiçoamento espiritual. Seria extremamente infantil a crença de que o simples “baixar do pano” resolvesse transcendentais questões do Infinito.

Uma existência é um ato.

Um corpo – uma veste.

Um século – um dia.

Um serviço – uma experiência.

Um triunfo – uma aquisição.

Uma morte – um sopro renovador.

Quantas existências, quantos corpos, quantos séculos, quantos serviços, quantos triunfos, quantas mortes necessitamos ainda para encontrarmos a luz?

André Luiz - Nosso Lar (Chico Xavier)

"Nascer, Morrer, Renascer ainda e
Progredir sem cessar, tal é a Lei."
(Allan Kardec)

RESUMO

No presente trabalho foi avaliada a utilização de pré-tratamentos com micro-ondas e ultrassom, associados ou não a agentes químicos, sobre o bagaço de cana-de-açúcar para posterior sacarificação enzimática para produção de açúcares fermentescíveis. Os sobrenadantes dos pré-tratamentos foram analisados por HPLC-RI para quantificação de açúcares e HPLC-UV para determinação de compostos fenólicos, provenientes da degradação da lignina e inibidores da sacarificação. Os bagaços pré-tratados foram hidrolisados com dois complexos enzimáticos fornecidos pela Novozymes, o complexo NS50012 contendo diversas enzimas como celulases, xilanases e hemicelulases e o complexo NS50013 mais específico, contendo maior atividade de β -glicosidase. Verificou-se que as amostras controle tratadas com micro-ondas e ultrassom sofreram perda de massa de 3% e 1,6% respectivamente, porém, variações consideráveis ocorreram com as amostras tratadas com ácidos minerais, chegando a 55,8 % de perda de massa com ácido clorídrico, seguido do ácido nítrico, com perda de 51,5%, ambas com liberação de açúcares, como glicose e xilose. Em meio alcalino, a maior perda foi com o tratamento de NaOH, com 17,3%. O uso de peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio mostrou-se eficiente na deslignificação, com perdas de massa na ordem de 22 e 17%, com o uso de micro-ondas e ultrassom, respectivamente. O uso de CaO proporcionou perda de massa de 45,7 % e o tratamento realizado com sais cujos cátions são ácidos de Lewis como o CaCl_2 e o FeCl_2 resultaram em redução de 30-35% na massa do bagaço. No tratamento ultrassônico destacam-se valores entre 11-29% para os ácidos, mas, de modo geral, os tratamentos com uso de ultrassom demonstraram serem menos efetivos na perda de massa quando comparados ao uso de micro-ondas. Foram detectadas liberações de açúcares como glicose, xilose e celobiose, após pré-tratamentos com HCl, H_2SO_4 , HNO_3 , NaOH, Fe_2O_3 e CaO com micro-ondas e pré-tratamento sequencial, com liberação de celobiose, fator negativo pela inibição da β -glicosidase presente nos complexos. As micro-ondas favoreceram a hidrólise química parcial das fibras que causou a desestruturação do bagaço liberando quantidades significativas de açúcares, diferentemente dos pré-tratamentos ácidos com uso de ultrassom. O pré-tratamento alcalino resultou em grande liberação de xilose e perda de massa de aproximadamente 18%, ou seja, primeiramente o pré-tratamento atuou sobre a deslignificação e depois favoreceu o ataque químico sobre a hemicelulose. Observou-se que o complexo NS50013 atuou de forma mais branda na sacarificação do bagaço, com valores de açúcares redutores totais inferiores aos encontrados para o complexo NS50012, que por apresentar um *pool* de enzimas mais diversificado possibilitou uma melhor sacarificação, evidenciando então que a ação sinérgica das enzimas aumenta a eficiência global do processo hidrolítico e que cada pré-tratamento responde diferentemente frente à ação complexo enzimático. Os maiores teores de glicose foram obtidos com o pré-tratamento iodo associado ao metanol no ultrassom e com o pré-tratamento empregando NaOH seguido de H_2O_2 com micro-ondas para a NS50012. Para o complexo NS50013 o pré-tratamento sequencial também foi eficaz produzindo condições para a atividade enzimática e liberação de montantes consideráveis de glicose. Fica claro que uso de determinados agentes químicos como potencializadores da desestruturação da biomassa permitem diferentes rendimentos na hidrólise enzimática.

Palavras-chave: Bagaço de cana, pré-tratamento, hidrólise enzimática

ABSTRACT

In this work it was tested the utilization of microwave and ultrasound as pretreatments of the sugarcane bagasse associated or not with chemical agents, for later enzymatic saccharification for the production of fermentable sugars. The supernatants of the pretreatments was analyze by HPLC-RI for sugars quantification and HPLC-UV for determination of fenolic compounds, from the lignin degradation and fermentation inhibitors. The treated bagasse was hydrolyzed with two different enzymatic complexes provided by Novozymes, the NS50012 complex that content some different enzymes like cellulases, xylanases and hemicellulases, and the NS50013 complex that is more specific, with larger values of β -glucosidase. It was checked that the control samples treated with microwave and ultrasound suffered weight loss of 3% and 1,6% respectively, and considerable variations occurred with the samples treated with mineral acids, reaching to 55,8% of weight loss with chloridric acid, followed of nitric acid, with loss of 51,5%, both with sugar liberation, as such as glucose and xylose. In alkaline medium, the larger weight loss was with the treatment with NaOH, com 17,3%. The utilization of hydrogen peroxide followed by NaOH showed efficiency in the delignification, with weight losses in the order of 22% and 17%, with microwave and ultrasound, respectively. The utilization of CaO provided weight loss of 45,7% and the treatment realized with salts that the cation are Lewis acids like CaCl_2 and FeCl_2 resulting in reductions of 30-35% in bagasse weight. In the ultrasound treatment stand out values between 29-11% for the acids, but, in overall, the ultrasound treatments showed be fewer effective in weight loss when compared with microwave utilization. Was detect liberation of sugars like glucose, xylose and cellobiose, after treatments with HCl , H_2SO_4 , HNO_3 , NaOH, Fe_2O_3 and CaO with microwave and sequential pretreatment, with liberation of cellobiose, negative factor by the inhibition of the β -glucosidase present in the complexes. The microwave favored the partial chemical hydrolyses of the fibers that caused the destructuring of bagasse liberating significant amounts of sugars, differently of acid pretreatments with ultrasound. The alkaline pretreatment resulting in great liberation of xylose and weight loss of approximately 18%, in other words, first the pretreatment act on the delignification and after favored the chemical attack on the hemicellulose. Was observe that the NS50013 complex act more lenient in the saccharification of bagasse, with values of total redactor sugars smaller than the found for NS50012 complex, because of the more diversified pool of enzymes that enabled a better saccharification, evidencing that the synergistic action of enzymes increases the global efficiency of hydrolytic process and that each one pretreatment responses differently in front of the enzymatic complex action. The bigger levels of glucose was obtained with the pretreatment of iodine associated with methanol in ultrasound and with the pretreatment using NaOH followed by H_2O_2 with microwave for NS50012. For the NS50013 complex the sequential pretreatment also was efficient providing conditions for the enzymatic activity and liberating considerable amounts of glucose. Is clear that the utilization of some chemical agents as enhancers of biomass destructuring allow different yield in enzymatic hydrolysis.

Keywords: sugarcane bagasse, pretreatment, enzymatic hydrolysis

Miguel, Alessandra Andrade

Avaliação do uso de radiação micro-ondas e ultrassom combinados com agentes químicos como pré-tratamentos de bagaço de cana de açúcar para posterior hidrólise enzimática / Alessandra Andrade Miguel. - - São José do Rio Preto: UNESP, 2009.

vii, 85 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maurício Boscolo

Dissertação (mestrado) – UNESP, IBILCE, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, 2009.

1. Pré-tratamentos. 2. Micro-ondas. 3. Ultrassom. 4. Bagaço de cana de açúcar. 5. hidrólise enzimática. 6. Bioetanol ou Etanol celulósico – Tese. I. Boscolo, Maurício. II. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. III. Título.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Bagaço de cana-de-açúcar	5
3.2 Composto lignocelulósico	6
3.3 Componentes do material lignocelulósico e enzimas hidrolíticas	7
3.3.1 Celulose	7
3.3.2 Lignina.....	11
3.3.3. Hemicelulose	13
3.3.4 Pectinas.....	18
3.4. Pré-tratamentos para a Sacarificação do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	21
3.4.1 Micro-ondas	22
3.4.2 Ultrassom	24
3.4.3 Pré-Tratamentos Químicos Associados com Micro-ondas e Ultrassom	25
3.5 Hidrólise Enzimática	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Obtenção e Preparo do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	28
4.2. Pré-Tratamentos.....	28
4.2.1. Agentes químicos	28
4.2.2. Micro-ondas	29
4.2.3 Ultrassom	31
4.2.4 Determinação da perda de massa do bagaço pré-tratado.....	31
4.2.5 Análises cromatográficas do bagaço pré-tratado.....	31
4.3. Complexos Enzimáticos	32
4.3.1. Atividades Enzimáticas	32
4.3.1.1. Hemicelulases	32
4.3.1.2. Celulases.....	32
4.3.1.3. Ligninases.....	33
4.3.1.3.1 Lacase	33
4.3.1.4. Pectinases	33
4.4. Hidrólise enzimática.....	33
4.4.1. Determinação de açúcares redutores totais solúveis no hidrolisado	34

4.4.2. Determinação de açúcares redutores por análise cromatográfica do hidrolisado	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1. Estudo de variação de massa do bagaço pré-tratado	35
5.2. Análises cromatográficas qualitativas do pré-tratado.....	38
5.3. Análises Cromatográficas Quantitativas do Pré-tratado	49
5.4. Determinação das Atividades Enzimáticas dos Complexos NS50012 e NS50013.....	51
5.5. Ensaio Enzimático	52
5.5.1. Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais do Hidrolisado .	53
5.6. Avaliação da Interferência/Influência dos Diferentes Pré-Tratamentos na Sacarificação do Bagaço de Cana-de-açúcar.	57
6 CONCLUSÃO.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8 ANEXOS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Complexo Lignocelulósico.....	7
Figura 2: Unidade Básica da cadeia de celulose.	8
Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal (TAIZ;ZEIGER, 2003).....	8
Figura 4: Representação da ordenação das microfibrilas na parede celular.	9
Figura 5: Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose	11
Figura 6: Exemplo de fragmento de estrutura da Lignina.....	12
Figura 7: Estrutura da Hemicelulose.....	14
Figura 8: Estrutura da Xilana e ação das xilanases	15
Figura 9: Estrutura molecular da xilose.	15
Figura 10: Estrutura de <i>O</i> -acetil-4- <i>O</i> -metilglicuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais se ligam os grupos substituintes.....	16
Figura 11: Complexo xilanolítico.	17
Figura 12: Remoção da lignina associada à hemicelulose da polpa de madeira, pela ação da xilanase	18
Figura 13: Estrutura da Pectina	19
Figura 14: Mecanismo de ação das pectinases.....	20
Figura 15: Exemplo ilustrativo do efeito desejado do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....	22
Figura 16: Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético	22
Figura 17: Região de frequência do som.....	24
Figura 18: Adaptação do forno de micro-ondas doméstico para realização de refluxo.....	29
Figura 19: Adaptação do forno de micro-ondas doméstico para realização de refluxo (furações da cuba, revestimento com anel de cobre e cooler).	30
Figura 20: Cromatogramas da amostra controle no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	39
Figura 21: Cromatogramas da amostra controle no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	39
Figura 22: Cromatogramas da amostra tratada com peróxido de hidrogênio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	39
Figura 23: Cromatogramas da amostra tratada com peróxido de hidrogênio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	39
Figura 24: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	40

Figura 25: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	40
Figura 26: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio associado ao metanol no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	40
Figura 27: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio associado ao metanol no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	41
Figura 28: Cromatogramas da amostra tratada com iodo associado ao etanol no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	41
Figura 29: Cromatogramas da amostra tratada com iodo associado ao etanol no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	41
Figura 30: Cromatogramas da amostra tratada com iodo associado ao metanol no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	42
Figura 31: Cromatogramas da amostra tratada com iodo associado ao metanol no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	42
Figura 32: Cromatogramas da amostra tratada com sulfato de amônio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	42
Figura 33: Cromatogramas da amostra tratada com sulfato de amônio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	43
Figura 34: Cromatogramas da amostra tratada com ácido sulfúrico no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	43
Figura 35: Cromatogramas da amostra tratada com ácido sulfúrico no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	43
Figura 36: Cromatogramas da amostra tratada com ácido clorídrico no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	44
Figura 37: Cromatogramas da amostra tratada com ácido clorídrico no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.....	44
Figura 38: Cromatogramas da amostra tratada com ácido nítrico no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	44
Figura 39: Cromatogramas da amostra tratada com ácido nítrico no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	45
Figura 40: Cromatogramas da amostra tratada com ácido iodídrico no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	45

Figura 41: Cromatogramas da amostra tratada com ácido iodídrico no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	45
Figura 42: Cromatogramas da amostra tratada com óxido de ferro no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	46
Figura 43: Cromatograma da amostra tratada com óxido de ferro no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	46
Figura 44: Cromatogramas da amostra tratada com cloreto de ferro no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	46
Figura 45: Cromatogramas da amostra tratada com cloreto de ferro no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	47
Figura 46: Cromatogramas da amostra tratada com óxido de cálcio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	47
Figura 47: Cromatograma da amostra tratada com óxido de cálcio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	47
Figura 48: Cromatogramas da amostra tratada com cloreto de cálcio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	48
Figura 49: Cromatogramas da amostra tratada com cloreto de cálcio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	48
Figura 50: Cromatogramas da amostra tratada com iodeto de potássio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	48
Figura 51: Cromatogramas da amostra tratada com iodeto de potássio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	48
Figura 52: Cromatogramas da amostra tratada com peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio (seqüencial) no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	49
Figura 53: Cromatogramas da amostra tratada com peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio (seqüencial) no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.	49
Figura 54: Perfil Cromatográfico dos padrões analíticos em HPLC para o hidrolisado com detector de índice de refração e com detector de ultravioleta.	52
Figura 55: Perfil Cromatográfico do bagaço in natura hidrolisado pelo complexo enzimático NS50012.	55
Figura 56: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com uso de Ultrassom hidrolisado pelo	

complexo enzimático NS50012.....	58
Figura 57: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com HCl em ultrassom hidrolisado pelo	
complexo enzimático NS50012.....	59
Figura 58: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com H ₂ O ₂ seguido de NaOH	
(sequencial) complexo enzimático NS50012.	61
Figura 59: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com H ₂ O ₂ seguido de NaOH	
(sequencial) complexo celulolítico NS50013.....	62
Figura 60: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com óxido de cálcio hidrolisado pelo	
multicomplexo enzimático NS50012.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da massa perdida e variação da perda de massa em porcentagem das amostras de bagaço de cana em função dos diferentes tratamentos sob ação de micro-ondas em diferentes tempos de exposição da fibra	36
Tabela 2: Determinação da massa perdida e variação da perda de massa em porcentagem das amostras de bagaço de cana em função dos diferentes tratamentos sob ação de ultrassom em diferentes tempos de exposição da fibra	37
Tabela 3: Tempo de retenção dos padrões de carboidratos no pré-tratamento	38
Tabela 4: Quantificação de açúcares (mg/g) liberados no pré-tratamento.....	50
Tabela 5: Perfil de atividades enzimáticas dos complexos NS50012 e NS50013 utilizados para hidrólise enzimática.....	52
Tabela 6: Açúcares redutores e açúcares redutores totais resultantes da sacarificação enzimática do bagaço de cana (mg/g) com uso de multicomplexo enzimático NS50012 ...	54
Tabela 7: Açúcares redutores e açúcares redutores totais resultantes da sacarificação enzimática do bagaço de cana (mg/g) com uso de multicomplexo enzimático NS50013 ...	56

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos agrícolas podem ser transformados em combustíveis ou produtos com valor agregado por meio de processos químicos e/ou biológicos. O papel do Brasil na busca pela produção de combustíveis alternativos tem cada vez mais relevância e espaço no mercado mundial mostrando seu pioneirismo, liderança e busca por tecnologias e fontes renováveis para alcançar sua autonomia energética (GOMES, 2004; RAMOS, 2000).

O Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais de grande interesse econômico como aqueles oriundos de indústrias de papel e celulose (materiais desclassificados de eucalipto e pinus), derivados da madeira (serragem), usinas de açúcar e álcool (bagaço de cana e palha) e, de modo geral, resíduos agrícolas gerados pelas culturas como a palha de grãos e cereais (palha e farelo de trigo, casca e sabugo de milho, cascas de arroz, aveia e café), dentre outros (RAMOS, 2000).

Como substrato para a produção de etanol celulósico busca-se o uso desses resíduos agroindustriais como descritos em vários estudos recentes, pelo uso da palha de arroz, palha e farelo de trigo (PALMAROLA-ANDRADOS *et al.*, 2005; HONGZHANG, 2006; TABKA *et al.*, 2006; KARIMI; EMTIAZI; TAHERZADEH, 2006), fibra de alfafa (SREENATH *et al.*, 2001), palha e fibra de milho (DIEN *et al.*, 2006), serragem de madeira (SASSNER; GALBE; ZACCHI, 2006), resíduos amiláceos e gomas (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2007; LEWANDOWICZ; JANKOWSKI; FORMAL, 2000), entre outros.

Conforme a União Nacional da Indústria Canavieira (UNICA, 2009) a produção de etanol aumentou consideravelmente nos últimos anos, sendo que a liderança mundial na produção de cana-de-açúcar é do Brasil, tendo processado aproximadamente 504 milhões de toneladas na safra 2008/2009, na principal região produtora do País, a Centro-Sul; com estimativa de moagem para 550 milhões de toneladas para a safra 2009/2010. O setor sucroalcooleiro brasileiro tem um faturamento anual bruto de cerca de US\$ 32 bilhões, sendo que na safra 2008/09, 44% da receita foi gerada pela comercialização de açúcar, 54% do etanol, e 2% pela comercialização de energia elétrica no mercado interno.

De acordo com a Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável - CMADS, 2008 a produção de etanol a partir da hidrólise da biomassa de cana-de-açúcar pode triplicar a quantidade de combustível produzido em relação à área plantada no Brasil. Uma tonelada de bagaço de cana pode produzir teoricamente até 186 litros de etanol através de

processos de hidrólise e fermentação que são objetos de estudo em diversos países. Segundo a Secretaria de Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, 2008 se fosse aproveitado apenas 12% do bagaço de cana gerado no Brasil seria possível produzir dois bilhões de litros de etanol sem aumentar a área plantada. Esse bagaço é em grande parte utilizado para produção de energia a partir da queima em caldeiras. Entretanto, a viabilização de novas tecnologias de utilização do bagaço de cana-de-açúcar poderá usar parte desse material para a produção de etanol celulósico, agregando então valor econômico ao resíduo gerado.

É importante salientar as vantagens para o uso deste resíduo como, por exemplo, sua disponibilidade e o aumento da produção de etanol sem o crescimento total da área cultivada, já que a expansão dessa cultura tem sido motivo de controvérsias, pois segundo Ramos (2000) o uso de monoculturas com finalidade energética pode gerar redução na fertilidade do solo e comprometimento na disponibilidade da produção de alimentos.

A utilização dos componentes obtidos a partir desses materiais lignocelulósicos hoje é o maior desafio para produção de etanol celulósico e acredita-se no uso de técnicas de pré-tratamento e deslignificação associadas com a ruptura da fibra vegetal. Estes pré-processos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou combinações entre eles, o que dependerá do grau de desestruturação requerido e do fim a que se destina o processo. Pré-tratamentos que combinam métodos físicos e químicos têm sido apontados na literatura como os mais eficientes como, por exemplo, o uso de explosão a vapor (FOCHER; MARZETTI; CRESCENZI, 1988; WOOD; SADDLER, 1988), uso de ultrassom (MARTINES; DAVOLO; JUNIOR, 1999) e micro-ondas (SANSEVERINO, 2002).

As propriedades estruturais da lignocelulose podem ser justificadas pela associação íntima que existe entre os três componentes principais da parede celular; a celulose, a hemicelulose e a lignina. As estruturas microfibrilares de celulose encontram-se embebidas em uma matriz composta por hemicelulose e lignina, cuja função estrutural é de agir como barreira natural à degradação microbiana. Em função, tanto da natureza do substrato quanto da natureza do complexo enzimático responsável pela sua transformação, pode-se facilmente perceber que a hidrólise enzimática tem limitantes associados às mudanças na estrutura do bagaço de cana-de-açúcar e aqueles relativos ao comportamento das enzimas durante o processo hidrolítico (FAN; GHARPURAY; LEE, 1982).

Geralmente, os compostos encontrados após os pré-tratamentos agem como inibidores das reações enzimáticas e dos processos fermentativos, sendo pouco estudados e, além disso, no pós-tratamento deixam de ser extraídos do meio reacional por razões técnicas ou

econômicas. A caracterização química das frações obtidas e/ou a identificação dos compostos formados podem servir para a seleção e/ou escolha adequada do pré-tratamento viável. Resultados significativos quanto à liberação de substratos após pré-tratamentos ou a verificação da inibição causada pelos mesmos nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação serão úteis para validar um processo eficaz para obtenção do etanol celulósico. De modo geral, apesar de já ter sido extensivamente estudado vários modelos de pré-tratamentos sobre materiais lignocelulósicos, ainda há carência de fundamentos científicos quanto à formação de substratos e inibidores e a comprovação da viabilidade econômica do processo como um todo (FOCHER *et al.*, 1988).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação de diferentes processos físico-químicos como pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e suas contribuições em etapa posterior de hidrólise enzimática para produção de açúcares fermentescíveis solúveis.

O trabalho é dividido em duas etapas principais: a primeira de pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar usando radiação micro-ondas e ultrassom combinados ou não com diferentes agentes químicos; e a segunda de hidrólise enzimática do pré-tratado com determinação da quantidade de carboidratos fermentescíveis liberados, verificando desta maneira os diferentes rendimentos obtidos com os complexos enzimáticos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O aperfeiçoamento de novas tecnologias para tratamentos dos materiais lignocelulósicos tem sido desejado do ponto de vista econômico ao considerar-se sua utilização como substrato em processos para produção de etanol celulósico (KRISHNA; REDDY; CHOWDARY, 2001; RÉCZEY; KÁDÁR; SZENGYEL, 2004). Diversos processos são desenvolvidos para uso desses materiais transformando-os em compostos químicos e produtos de alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. O uso de resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos e uma contribuição significativa para amenizar o problema do excesso de resíduos causadores de poluição (PANDEY *et al.*, 2000a; PRIMO-YÚFERA; GIL-TORTOSA; GARCIA-BREIJO, 1995). A disponibilidade de resíduos como matérias primas agrícolas, por exemplo, trigo, mandioca, arroz e milho (SUN; CHENG, 2002) e principalmente o resíduo bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), que é o mais abundante pela grande quantidade ofertada no setor sucroalcooleiro, tem se mostrado excelente fonte de carboidratos buscando assim a minimização dos custos de produção de etanol combustível. (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006).

3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

No processo industrial tradicional para fabricação de álcool etílico emprega-se como substrato o caldo de cana-de-açúcar e o melaço, misturados em diferentes proporções, em processos batelada-alimentada (mais utilizado) ou contínuo e ocorre a obtenção do caldo e a reutilização das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004). O bagaço de cana é um material fibroso obtido após a extração do caldo e ao sair da moenda tem aproximadamente 30% da massa da cana e em torno de 50% de umidade. Os principais fatores que afetam a composição química do bagaço estão relacionados com: o tipo de cana, o tipo de solo, as técnicas de colheita e até o manuseio. Este bagaço é geralmente queimado para aquecimento das caldeiras e geração de energia elétrica, sendo o excedente visto como biomassa em potencial para produção do etanol celulósico. Sua composição química é constituída por três frações principais: celulose com 46%, hemicelulose com 27%, lignina total com 26% e o restante como teor de cinzas (CANILHA *et al.*, 2007).

Além da fração lignocelulósica, apresenta por volta de 35% de pectina, importante

polímero constituinte da lamela média e parede primária da célula vegetal, 25% de xiloglicanas e 5% de arabinoglicanas (GLAZER; NIKALDO, 1994). Por apresentar baixo conteúdo de resíduos, em torno de aproximadamente 2% , o bagaço mostra vantagens em comparação com outros tipos de resíduos industriais como a palha de arroz e palha de trigo, no qual tem respectivamente 17,5% e 11% de cinzas (PANDEY *et al.*, 2000b).

Este material apresenta grande resistência à ação de enzimas hidrolíticas e ataques microbianos, devido ao fato de ocorrer uma grande associação entre a celulose com a hemicelulose e a lignina formando um rígido complexo. Por sua vez, a lignina está covalentemente associada com a hemicelulose criando uma espécie de barreira protetora que impede o acesso de agentes hidrolíticos à celulose (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006).

3.2 Composto lignocelulósico

O principal desafio tecnológico do processamento do material celulósico é superar a resistência da celulose para posterior hidrólise (LASER *et al.*, 2002). A parede vegetal é composta por fibrilas celulósicas arranjadas em uma extensa matriz amorfa composta por carboidratos com ligantes polifenólicos. Esta matriz de carboidratos é identificada por polímeros de pentose lineares e ramificados, classificados como hemicelulose. O composto majoritário dos ligantes polifenólicos, por sua vez, é denominado lignina (AMER; DREW, 1980).

As microfibrilas de celulose são revestidas com hemicelulose e entrelaçadas com a lignina, formando assim as fibras, ou seja, a celulose aparece embebida em uma matriz amorfa de lignina e hemicelulose, formando a lignocelulose, como visto na Figura 1. Além do componente lignocelulósico, a pectina é um importante polímero constituinte do material, que por sua vez apresenta variações na quantidade de componentes devido a fatores como espécie, idade e parte da planta (GOMES, 2004).

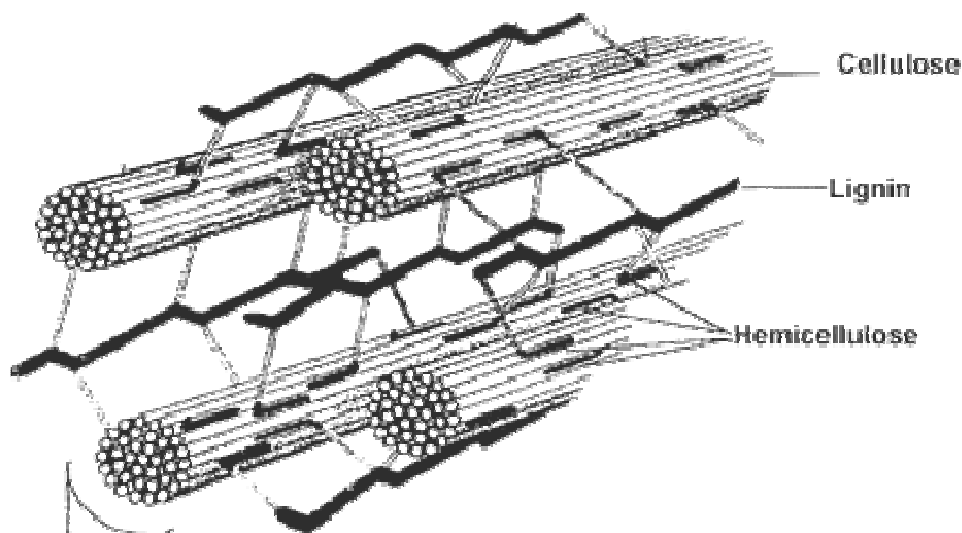


Figura 1: Complexo Lignocelulósico.

Fonte: http://www.life.ku.dk/forsking/online_artikler/artikler/~media/BIOKEMI_INFO/artikelbilleder/lignocellulose2.gif.ashx.

Pesquisas sugerem que o material celulósico seja pré-tratado para então ser enzimaticamente hidrolisado. Isto implica na busca pela ruptura do complexo celulolítico e pela deslignificação. Para ser efetivo, o pré-tratamento deve produzir fibras modificadas e limitar a extensão na qual o pré-tratamento torna-se inibidor do desenvolvimento dos microrganismos fermentadores. Deve-se também ser economicamente viável e limitar custos associados ao tratamento dos resíduos (LASER *et al.*, 2002).

Tanto na hidrólise enzimática quanto na fermentação alcoólica existe a presença de inibidores que podem ser produtos derivados da hidrólise de hemiceluloses, como ácido acético, liberado a partir de grupos acetil do material bruto ou furfural e hidroximetilfurfural, gerados na degradação de açúcares ou ainda produtos derivados da degradação da lignina como compostos fenólicos, ácidos aromáticos e aldeídos. Ácidos orgânicos como vanílico, sirínico, capróico, caprílico e palmítico são citados entre os ácidos com capacidades inibitórias presentes nos meios de fermentação obtidos a partir de materiais lignocelulósicos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

3.3 Componentes do material lignocelulósico e enzimas hidrolíticas

3.3.1 Celulose

A celulose é um homopolímero linear formado por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) entre unidades de glicose apresentando mais de 10.000 resíduos como demonstrado na Figura 2 (CAMPBELL, 2000).

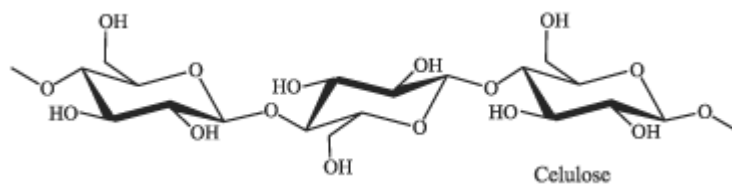


Figura 2: Unidade Básica da cadeia de celulose.

Fonte: <http://www.geocities.com/capecanaveral/launchpad/9071/celulose.gif>

A celulose está presente na parede celular vegetal, sendo que sua deposição é maior e combinada com lignina nas células envolvidas com suporte e transporte. É dividida em lamela média, parede primária e parede secundária, esta última dividida em 3 camadas, sendo S1 a primeira e mais delgada, rica em lignina, S2, também delgada e rica em celulose e S3, a mais interna, com lignina relativamente abundante presente na matriz celulósica como mostra a Figura 3 (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001).

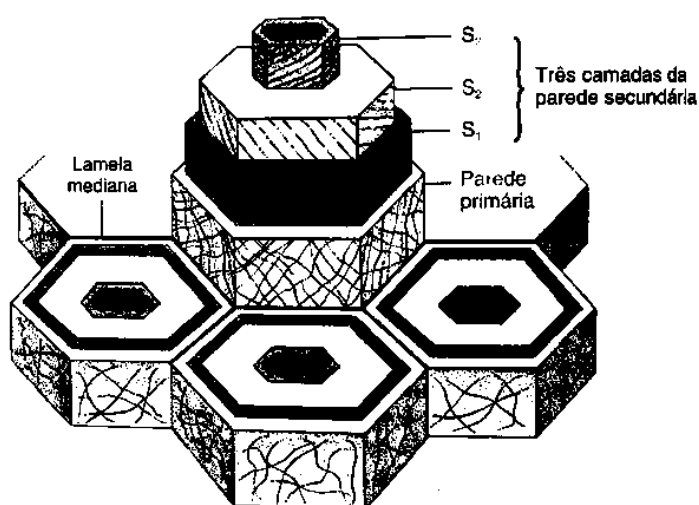


Figura 3: Estrutura da parede celular vegetal (TAIZ; ZEIGER, 2003).

A cadeia da celulose é estabilizada por ligações de hidrogênio internas à cadeia e entre as cadeias adjacentes que se encontram na posição paralela e com a mesma polaridade. As interações (internas e entre cadeias) formam um aglomerado cristalino chamado de microfibrila (GLAZER; NIKAIDO, 1994). A região cristalina por si mesma representa um obstáculo extra para o processo de hidrólise (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006) e tem elevada resistência à tração e inerte à ação de solventes comuns (CAMPBELL, 2000). Ocorre

a combinação das microfibrilas para formar fibras largas, que por sua vez, se organizam em camadas finas (lamelas) para formar a estrutura da parede celular vegetal como observado na Figura 4. Essa área organizada é chamada região cristalina, em contraste com a região amorfa, que é menos ordenada. A proporção dessas frações na celulose isolada varia com sua origem. (GLAZER; NIKAIDO, 1994).

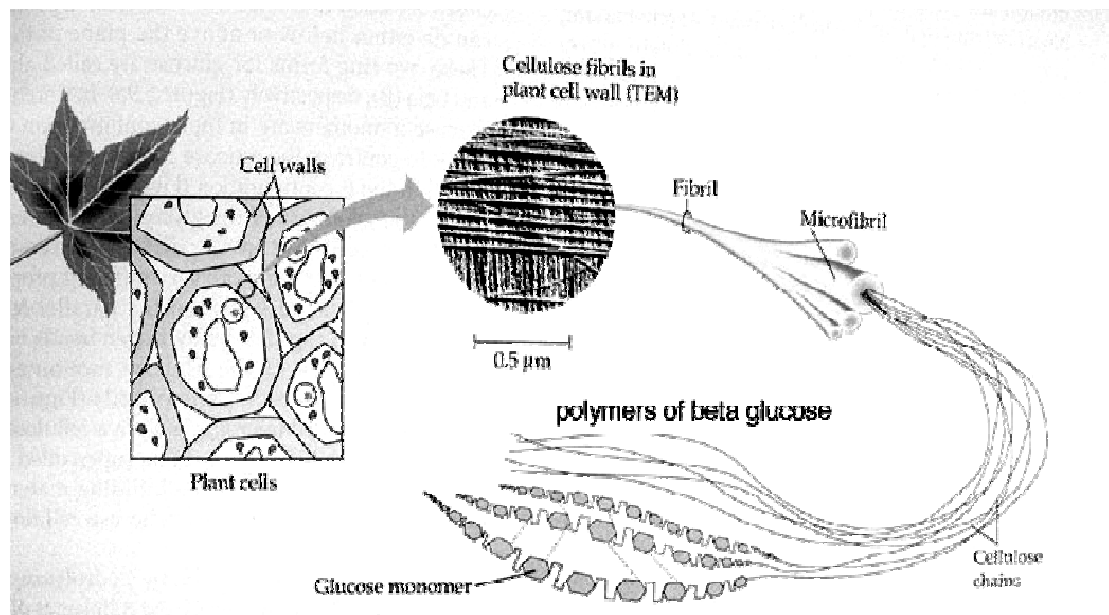


Figura 4: Representação da ordenação das microfibrilas na parede celular.
Fonte: <http://academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/cellulosefibers.jpg>

3.3.1.1 Complexo celulolítico – celulasas

A degradação enzimática da celulose na natureza é feita por um sistema de enzimas extracelulares que, em fungos, são liberadas diretamente no meio, enquanto que em bactérias aparecem ligadas à parede celular (GOMES, 2004). Segundo Wood e McCrae (1982), uma variedade muito grande de microrganismos é capaz de produzir um sistema enzimático que degrade materiais celulósicos. Estudos sobre o mecanismo de ação das celulasas postularam que o sistema celulase deveria primeiro atacar a celulose cristalina modificando-a ou desagregando-a (celulose amorfa) de tal forma que a outra enzima possa causar a despolimerização ou hidrólise das cadeias de celulosas (PALMA-FERNANDEZ, 2002).

O sistema celulolítico consiste:

- Endoglucanases ou endocelulasas - EC 3.2.1.4, que atacam a carboxi-metil-celulose (CMC) e região amorfa da celulose, ao acaso, liberando celooligossacarídeos.

-Exo-1,4- β -D-glucanases ou exocelulases(CBH) - EC 3.2.1.91, que atacam o avicel e celulose amorfa sequencialmente, liberando unidades de celobiose a partir da extremidade não redutora da cadeia de celulose. Essa enzima, atuando sinergisticamente com a endoglucanase, promove extensa degradação da celulose cristalina.

- β - glicosidases ou celobiasas - EC 3.2.1.21, que removem resíduos de glicose a partir da extremidade não redutora de celodextrinas e não interage cooperativamente com as endoglucanases na hidrólise da celulose cristalina (GOMES, 2004).

A enzima avicelase atua na porção fibrosa da molécula de celulose, e tem ação de exoglucanase ao remover monômeros ou dímeros das porções terminais das cadeias. Por outro lado, a enzima carboximetilcelulase tem atuação na porção cristalina da molécula de celulose, comportando-se como endoglucanase. Sendo assim, ela atua na quebra de ligações na parte interna da cadeia, expondo as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos com terminações susceptíveis ao ataque das exoglucanases.

Segundo Woodward (1982) e Coughlan (1985), as enzimas endo e exoglucanases em associação com a β -glicosidase atuam sequencialmente e sinergisticamente para degradar celulose cristalina à glicose. As endoglucanases agem ao acaso nas regiões de baixa cristalinidade das fibras celulósicas, enquanto a celobiohidrolase remove unidades de celobiose a partir da terminação não redutora da cadeia celulósica. A β -glicosidase hidrolisa celobiose a glicose. Conforme o mecanismo de ação das celulasas retratado na Figura 5, observa-se que a β -glicosidase é um constituinte importante do complexo enzimático na conversão da celulose a glicose, superando a inibição das celulasas, uma vez que catalisam a hidrólise da celobiose e celooligossacarídeos de cadeia pequena até glicose, mas não degradam celulose. Dessa forma, as β -glicosidases podem ser consideradas um fator limitante da velocidade da reação enzimática de sacarificação completa da celulose (PALMA-FERNANDEZ, 2002).

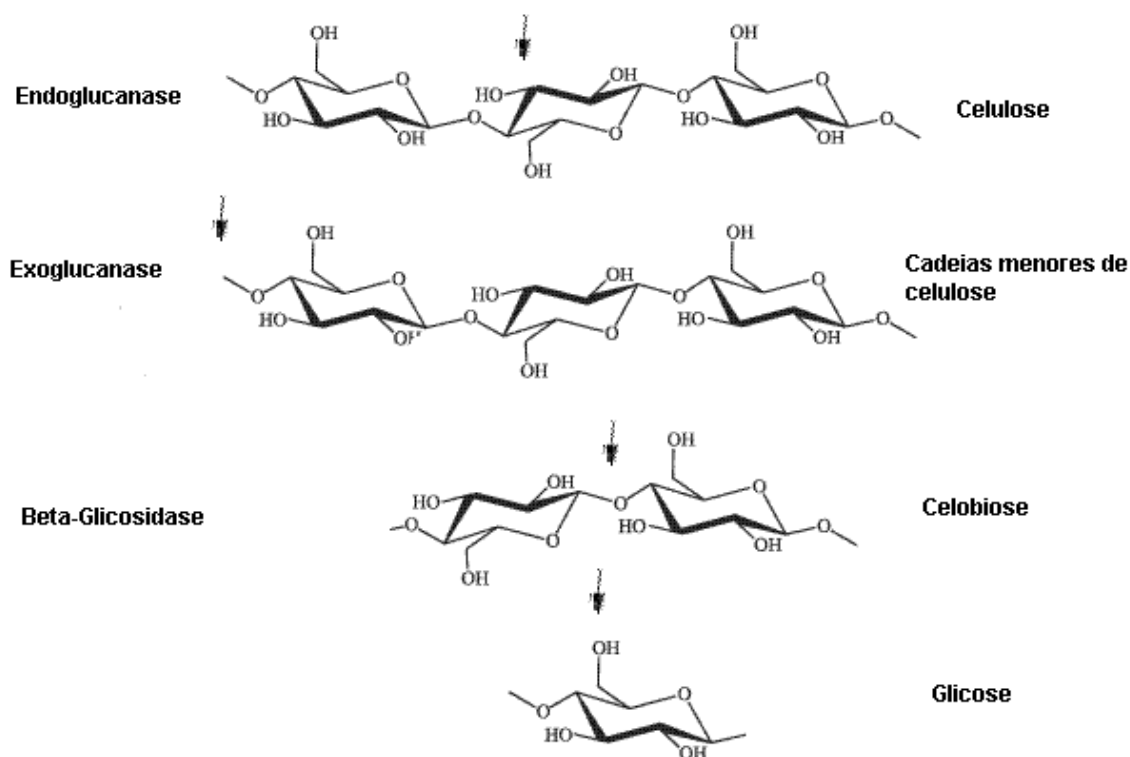


Figura 5: Mecanismo da hidrólise enzimática da celulose (adaptado de PALMA-FERNANDEZ, 2002).

Essas enzimas celulolíticas são extensivamente usadas em vários processos biotecnológicos, incluindo a produção do etanol combustível através de resíduos celulósicos agrícolas (XIN; YINBO; PEIJI, 1993; BOTHAST; SAHA, 1997).

3.3.2 Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira e trata-se de um dos principais componentes dos tecidos vegetais. Em estudos passados concluiu-se que a lignina é de natureza aromática e muito complexa sendo que pontos relativos, principalmente em relação a sua estrutura, ainda permanecem duvidosos. Isto decorre da grande diversidade de ligações em sua formação, como também pelas modificações estruturais pela qual o material sofre durante o isolamento das paredes celulares (SALIBA *et al.*, 2001).

A lignina é um heteropolímero tridimensional amorfo de elevado peso molecular, formado pela polimerização oxidativa de nove unidades de fenil-propano, compostas por nove carbonos e seus precursores diretos como álcoois coniferil, sinapil e *p*-coumaril(Figura 6). Já

a lignina presente em gramíneas é formada pela mistura de álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico (GOMES; SILVA, 2004). Em função de sua estrutura, esse biopolímero é de difícil degradação comparado com outros polissacarídeos (GLAZER; NIKAIDO, 1994; AMER; DREW, 1980; GOMES; SILVA, 2004).

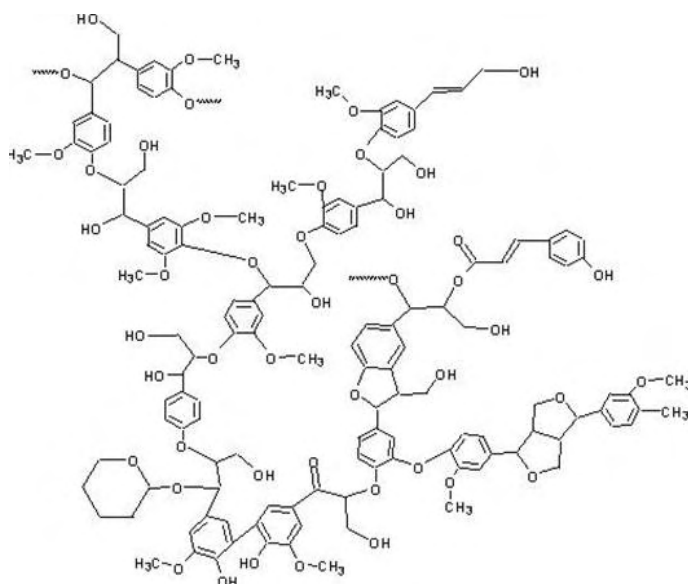


Figura 6: Exemplo de fragmento de estrutura da Lignina.

Fonte: <http://academic.scranton.edu/faculty/canm1/inorganic/inorganicmoduleport.html>.

3.3.2.1 Enzimas lignolíticas - ligninases

O mecanismo de degradação da lignina é feito por fenoloxidasas e sua atuação lignolítica ocorre em função da ação sinérgica das enzimas liberadas extracelularmente como as lacases, lignina-peroxidases (LiP), manganês-peroxidases (MnP) e outras oxidasas tais como a tirosinase, catecol desidrogenase, glicose oxidase, glioxil oxidase, glioxal oxidase e arialcool desidrogenase, que através de ação oxidativa não-específica quebram o polímero de lignina de modo extensivo (GOMES; SILVA, 2004). Enquanto a LiP quebra ligações não aromáticas, a MnP e as lacases podem oxidar os componentes fenólicos da lignina (MAYER; HAREL, 1979).

As lacases são classificadas como cobre-oxidases e apresentam um sítio multinuclear de cobre. As peroxidases apresentam sítios ativos com grupos prostéticos e como as mais atuantes temos as enzimas lignina-peroxidase (LiP) - EC. 1.11.1.14, reportadas pela primeira vez em 1984 no basidiomiceto *Phanaerochaete chrysosporium*, e manganês-peroxidase - EC 1.11.1.13,

que são glicoproteínas globulares formadas por 11-12% de α -hélice com dois domínios delimitando uma cavidade central que abriga o grupo heme, no qual existem dois resíduos conservados, uma histidina e um ácido aspártico. As LiPs são estabilizadas por oito pontes dissulfeto e apresentam preferência por substratos aromáticos não fenólicos, com formação de cátions aromáticos após o processo de oxidação, sendo um exemplo deste tipo de substrato o álcool veratrílico (GOMES; SILVA, 2004).

3.3.3. Hemicelulose

Hemiceluloses são heteropolissacarídeos altamente ramificados e não cristalinos na maior parte dos casos. Como resíduos presentes podem ser citados as pentoses como D-xilose e L-arabinose, as hexoses como D-galactose, L-galactose, D-manose, L-raminose e L-fucose e o ácido D-galacturônico. Tais resíduos são diversamente modificados por acetilação e metilação (GLAZER; NIKAIDO, 1994). O termo hemicelulose descrito inicialmente por Schulze (1981) foi usado para designar frações de polissacarídeos da parede celular vegetal facilmente hidrolisáveis e desde então tem sido utilizado imprecisamente para descrever grupos de heteropolissacarídeos complexos não-celulósicos, classificados com base nos monossacarídeos constituintes (WILLIAMS, 1989). Houve redefinições com base em suas propriedades químicas, como somente polissacarídeos da parede celular ligados não covalentemente à celulose (BAUER *et al.*, 1973; KENNEDY; WHITE, 1988).

As hemiceluloses são abundantes e baratas fontes de carboidratos fermentecíveis. De acordo com o monômero constituinte são classificadas como xilanas, mananas, galactanas e arabinanas. Prende-se firmemente à superfície das microfibrilas de celulose, envolvendo-as e mantendo ligações cruzadas através de ligações de hidrogênio (BOCCHINI, 2004). A maioria das hemiceluloses são moléculas relativamente pequenas, contendo entre 70 e 200 resíduos de monossacarídeos, sendo as hemiceluloses de madeiras duras às moléculas maiores, com 150 a 200 unidades, conforme vistos na figura 7. (COUGHLAN, 1992; KENNEDY; WHITE, 1988). A composição das hemiceluloses em plantas pode ser influenciada por vários fatores, tais como crescimento, maturação, natureza do solo, clima, localização geográfica e tipo de fertilizante usado (WILKIE, 1979).

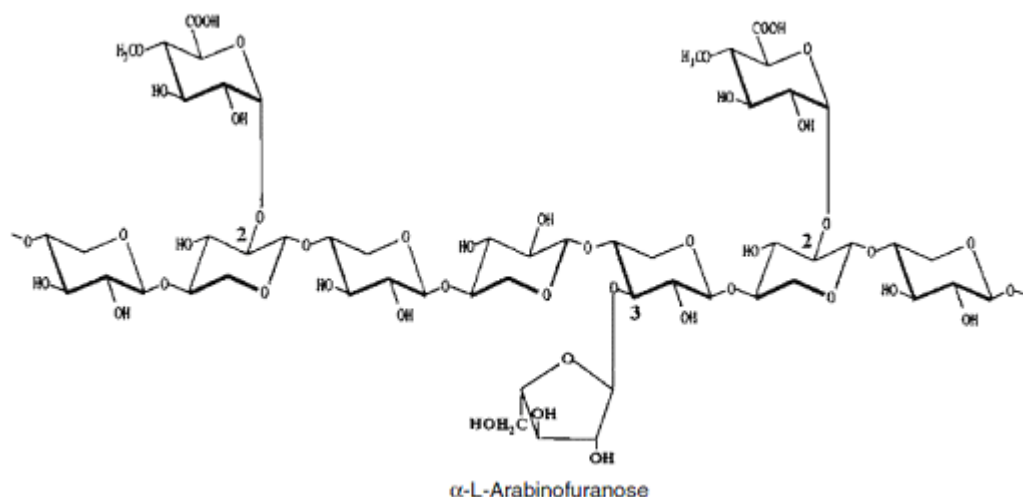


Figura 7: Estrutura da Hemicelulose.

Fonte: http://blogs.princeton.edu/chm333/f2006/biomass/bio_oil/02_chemistry_processing_the_basics/01_chemistry

Murty e Chandra (1997) demonstraram a fermentação de hemiceluloses de resíduos agrícolas tais como resíduos de madeira, talo de banana e bagaço de cana-de-açúcar por *Clostridium sp CSAIV* e apresentaram significativa quantidade de hemiceluloses em suas composições de 12 a 23%, aproximadamente. Sob condições ótimas de cultivo, a taxa de crescimento da linhagem bacteriana aumentou, bem como a concentração de etanol na cultura. Neste estudo, os autores confirmaram que a fonte e a composição da hemicelulose têm importante papel na fermentação do substrato por microrganismos e sua utilização eficiente pode contribuir para a melhoria dos processos de bioconversão, com o intuito de aumentar a competitividade econômica dos mesmos (YU *et al.*, 1987). Tem ocorrido aumento de interesse no uso de hemiceluloses não somente para produção de etanol celulósico, mas como polímeros para a utilização nas indústrias química e farmacêutica, na produção de biopolímeros catiônicos, hidrogéis e derivados de ésteres alquílicos de cadeias longas (SUN *et al.*, 2004a).

3.3.3.1 Xilanas

As xilanas são os principais polissacarídeos da fração hemicelulósica das plantas, sendo formadas por uma cadeia principal de resíduos de xilose (Figura 9), unidos por ligações glicosídicas β -1,4, com diferentes grupos substituintes na cadeia principal. A xilana é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (PRADE, 1995), apresentam cadeias

laterais curtas constituídas por resíduos arabinosil, glucuronosil e acetil (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997; BIELY, 1985).

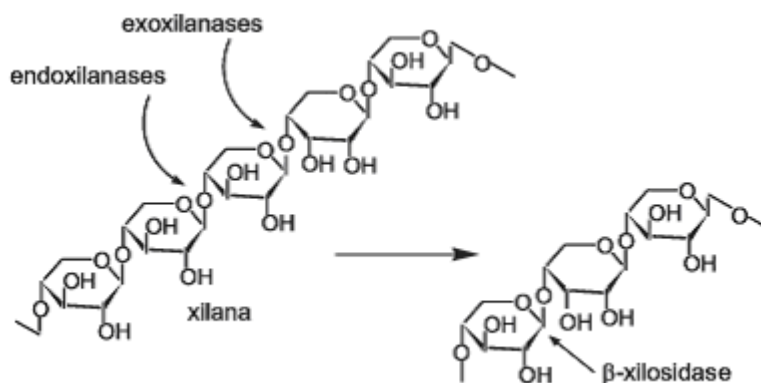


Figura 8: Estrutura da Xilana e ação das xilanases (adaptado de GOMES *et al.*, 2007).

Como observado na figura 8, as xilanas estão em íntimo contato com a celulose através de fortes interações formadas por ligações de hidrogênio e por forças de Van der Waals (WONG; TAN; SADDLER, 1988). Suas moléculas são orientadas paralelamente às cadeias de celulose, na matriz da parede celular, e localizadas entre as microfibrilas de celulose (NORTHCOTE, 1972). A xilana ligada covalentemente com a lignina e não covalentemente com a celulose tem papel importante na manutenção da integridade da celulose, protegendo as fibras contra o ataque das celulases (BEG *et al.*, 2001; UFFEN, 1997).



Figura 9: Estrutura molecular da xilose.

Fonte: <http://bioweb.sungrant.org/NR/rdonlyres/DDEA9C37-CF9D-4B23-98AE-1464D9193446/0/F2StructureofXylose.gif>

Como exemplos, na figura 10, têm-se as madeiras duras que contêm *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilanas altamente acetiladas, sendo que o grupo acetil confere a solubilidade parcial desta molécula em água. Já as madeiras macias contêm arabino-4-*O*-

metilglucuroxilanas, com substituição do grupo acetil por unidades de α -L-arabinofuranosil (BOCCHINI, 2004).

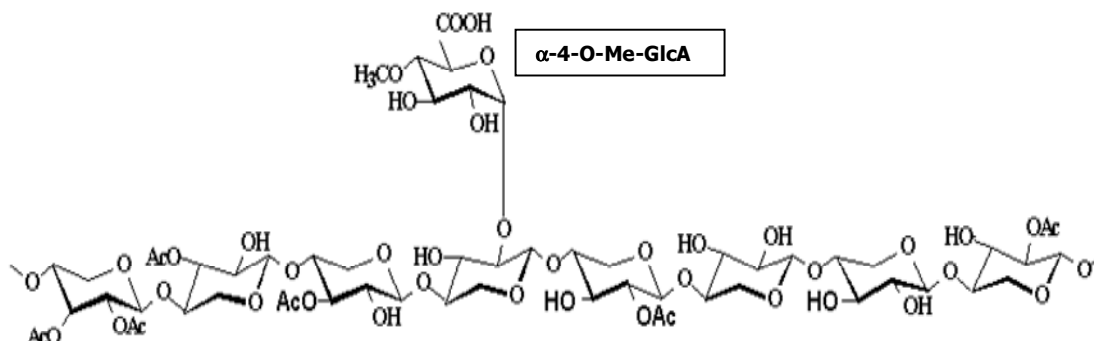


Figura 10: Estrutura de *O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana presente em madeiras duras. Os números indicam os átomos de carbono aos quais se ligam os grupos substituintes. Ac: grupo acetil; α -4-*O*-metilglucurônico (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

3.3.3.2 Complexo Xilanolítico - Xilanases

Xilanases são glicosidases - EC. 3.2.1.x, que catalisam a hidrólise das ligações 1,4- β -D-xilosídicas na xilana, que por sua vez, é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza. Estas enzimas são classificadas atualmente como glicosidases, de modo que são formadas famílias com seqüências relacionadas. Até o momento, 96 famílias de glicosidases foram descritas divididas em 14 clãs, sendo aproximadamente um terço destas enzimas poliespecíficas para substrato (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Sabe-se que a eficiente exploração das frações hemicelulósicas, principalmente a xilana requer um complexo entendimento sobre os sistemas enzimáticos que realizam sua conversão a compostos utilizáveis (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

A hidrólise do substrato ocorre por atuação de um complexo xilanolítico, com destaque para as endoxilanases ou 1,4- β -D-xilanohidrolase - EC 3.2.1.8, que hidrolisam as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da molécula de xilana resultando em um decréscimo no grau de polimerização do substrato. Outras enzimas do complexo xilanolítico são a exo-1,4- β -xilosidase - EC 3.2.1.37, α -L-Arabinosidase - EC 3.2.1.55 e acetil esterases - EC 3.1.1.6 (WONG; TAN; SADDLER, 1988). Enzimas despolimerizantes que atuam sinergisticamente na sacarificação da xilana podem ser produzidas por microrganismos (FERREIRA-FILHO, 1994) caracterizando assim o complexo xilanolítico formado por:

- Endo- β -1,4-xilanases ou 1,4- β -D-xilana hidrolase - EC 3.2.1.8, que hidrolisam as ligações internas da cadeia principal da xilana, produzindo xilooligossacarídeos e promovendo a diminuição do grau de polimerização desse polissacarídeo.

- β -xilosidases ou β -D-xilosídeo xilohidrolase - EC 3.2.1.37, que hidrolisam pequenos xilooligossacarídeos a xilose, a partir da extremidade não redutora.

- Enzimas desramificantes como α -L-arabinofuranosidases - EC 3.2.1.55, α -glucuronidasas - EC 3.2.1 e acetilxilana esterases - EC 3.1.1.6 que hidrolisam as cadeias laterais da molécula (GOMES, 2004).

Por se tratar de um substrato complexo e heterogêneo, a hidrólise completa da xilana requer a ação de um sistema de enzimas com diferentes especificidades e modos de ação demonstrada na Figura 11.

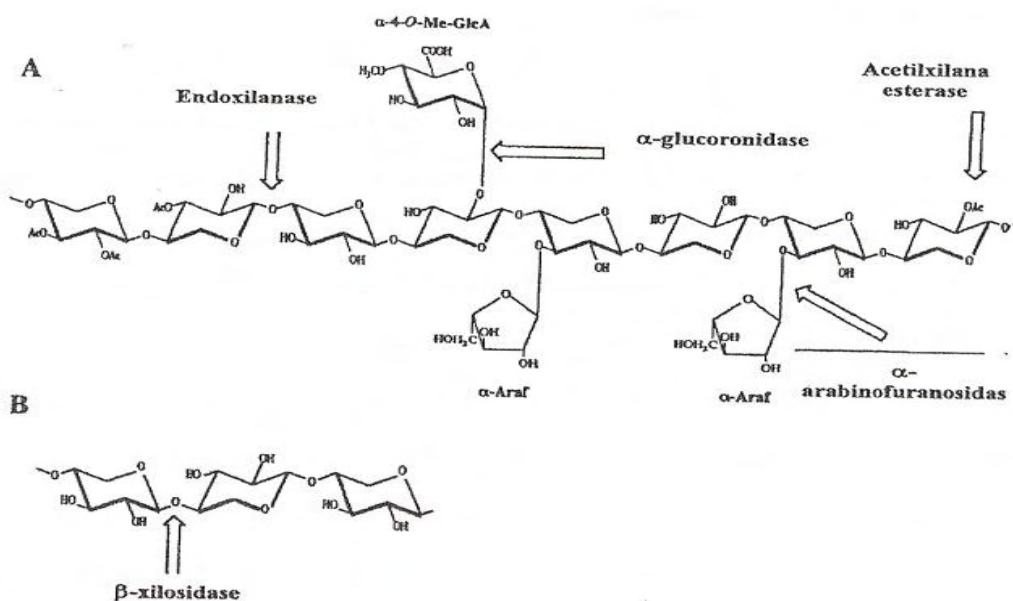


Figura 11: Complexo xilanolítico. A: Enzimas envolvidas na degradação da xilana. Ac: grupos acetil; α - araf: arabinofuranose; α -4-O-Me-GlcA: ácido α -4-0-metilglucurônico. B: Hidrólise de xilooligossacarídeos pela β - xilosidase (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Xilanases microbianas degradam a xilana e alteram a interface entre a celulose e a lignina. Desta forma, facilitam a remoção da lignina associada à xilana na superfície das fibras, encontradas na Figura 12 (BOCCHINI, 2004).

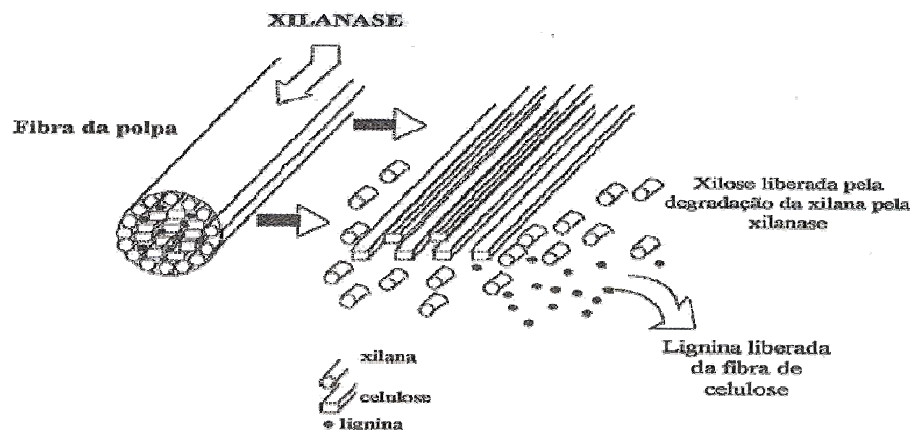


Figura 12: Remoção da lignina associada à hemicelulose da polpa de madeira, pela ação da xilanase (TECHAPUN *et al.*, 2003).

3.3.4 Pectinas

Substâncias pécnicas são polissacarídeos coloidais ácidos e complexos, com resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações α (1-4). As cadeias laterais consistem em L-ramnose, arabinose, galactose e xilose (KASHYAP *et al.*, 2001). Essas moléculas são diferenciadas de acordo com a natureza da cadeia principal e comumente é usado o termo geral de pectina para todas as substâncias pécnicas (CHEFTEL; CHEFTEL, 1992).

Protopectinas são substâncias pécnicas insolúveis em água encontradas em tecidos vegetais e que servem de base para a produção de compostos solúveis. Ácidos pécnicos, também chamados de ácidos poligalacturônicos são galacturonanas que contêm quantidades bastante reduzidas de grupos metoxil, ou seja, baixo grau de metoxilação. Já os ácidos pectínicos são galacturonanas com quantidades variáveis e geralmente altas de grupos metoxil, formando o grupo de alto grau de metoxilação. Já a pectina é um nome genérico utilizado para designar misturas variadas de componentes cujo ácido pécnico ou poligalacturônico é o principal componente. Na sua forma natural, a pectina está presente na parede celular e geralmente apresenta-se interligada com outros polissacarídeos estruturais e proteínas, formando assim moléculas insolúveis de protopectina (KASHYAP *et al.*, 2001).

Conforme figura 13, a cadeia principal da pectina é formada de monômeros de ácido D-galacturônico que se unem por ligações glicosídicas α - 1,4 (COLLMER; RIED; MOUNT, 1988). Um pequeno número de ramnose, arabinose e galactose é parte integrante da molécula de pectina como cadeia lateral (PANDA; SUSHMA; KUMAR, 2004).

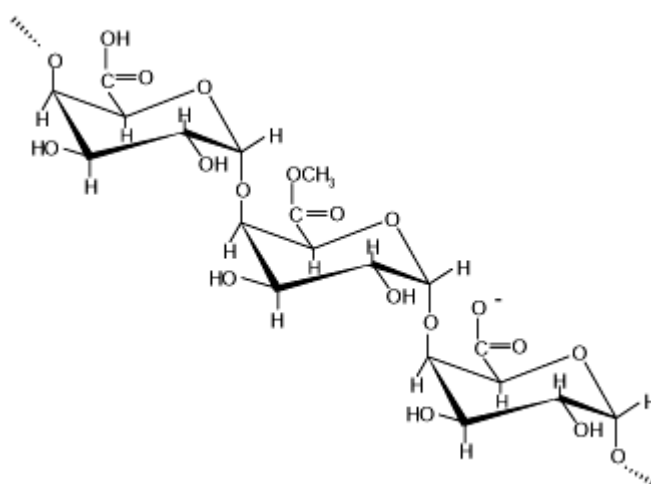


Figura 13: Estrutura da Pectina (adaptado de BRANDÃO, ANDRADE, 1999)

A pectina confere viscosidade nos meios em que se encontra e nos tecidos de frutas verdes, está ligada às microfibrilas de celulose para constituírem a parede celular vegetal. Esta pectina é caracteristicamente insolúvel conferindo rigidez a parede onde durante o amadurecimento sua estrutura é alterada tornando-se mais solúvel, pela ação de enzimas pectinolíticas. Substâncias pécticas atuam na retenção de líquidos quando o tecido vegetal é lesionado, pois as moléculas de pectina remanescentes junto às fibrilas de celulose e cadeias laterais de hemicelulose facilitam a retenção de água (KASHYAP *et al.*, 2001; PIFERRI *et al.*, 1989).

3.3.4.1 Enzimas Pectinolíticas – Pectinases

Substâncias pécticas são degradadas por enzimas pectinolíticas produzidas por plantas e também por microrganismos e entre os principais produtores de pectinases estão: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *penicillium frequentans*, *bacillus subtilis*, entre outros (SOARES, 1999). As pectinases são enzimas responsáveis pela degradação da longa e complexa cadeia da pectina. Sua aplicação industrial foi observada inicialmente a partir de 1930 para produção de vinhos e sucos de frutas (SILVA, 2003).

Como observado na figura 14, estas enzimas, em função do seu modo de ataque à cadeia de pectina e pela preferência do substrato (pectina, ácido péctico ou protopectina) são classificadas em: desesterificante ou desmetoxilante (pectinaesterases); despolimerizantes (incluem as hidrolases e as liases) e protopectinases que solubilizam a protopectina para formar pectina (UENOJO; PASTORE 2007).

- Desesterificante ou desmetoxilante como: Pectina esterases (PE) ou também chamada de polimetilgalacturonase esterase (PMGE) - EC 3.1.1.1, desesterificam o grupamento metoxila da pectina formando ácido pécico, liberando metanol e hidrogênio (SILVA, 2003; UENOJO; PASTORE 2007).

- Despolimerizantes envolvem as hidrolases (catalisam a hidrólise de ligações α -1,4) e as liases (catalisam a β -eliminação). Dentre as hidrolases temos: Poligalacturonases (PG) que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas entre dois resíduos de ácido galacturônico. É a maior enzima com função hidrolítica, podendo apresentar ação endo- (hidrólise aleatória) ou exo- (hidrólise sequencial) do ácido pécico (MACMILLAN, SHEIMAN, 1974; SILVA, 2003). Já as liases, também chamadas transeliminases, rompem ligações glicosídicas resultando em galacturonídeos e incluem: Pectina liases (PL) ou polimetilgalacturonato liase (PMGL) - EC 4.2.2.10, que eliminam resíduos de polimetilgalacturonato de uma forma aleatória formando metil oligogalacturonatos insaturados. As pectato liases ou poligalacturonato liase (PGL) - EC 4.2.2.2, atuam sobre o poligalacturonato, produzindo oligogalacturonatos insaturados, sendo os pectatos geralmente bons substratos para a atuação da enzima diminuindo sua atividade a medida que diminui a cadeia de oligogalacturonato. As protopectinases solubilizam protopectina, formando pectina solúvel altamente polimerizada (SILVA, 2003; UENOJO; PASTORE 2007).

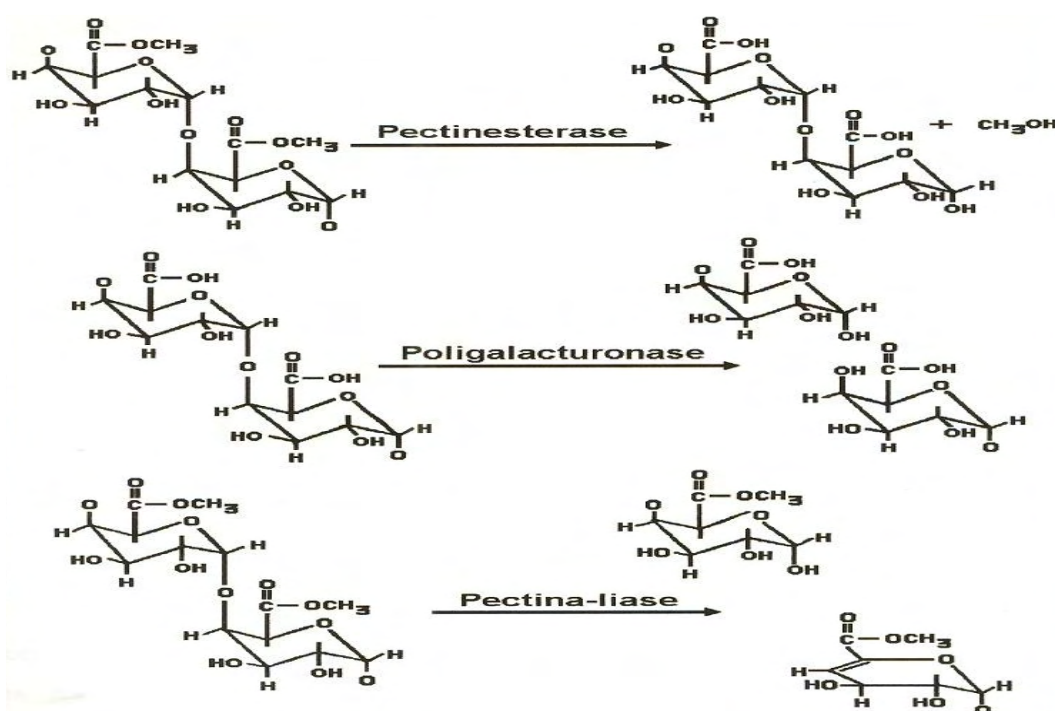


Figura 14: Mecanismo de ação das pectinases (DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

3.4. Pré-tratamentos para a Sacarificação do Bagaço de Cana-de-açúcar

A transformação do bagaço de cana-de-açúcar em etanol celulósico envolve duas etapas: a desestruturação e hidrólise das frações celulose e hemicelulose para a obtenção de açúcares como glicose, xilose e arabinose e a fermentação alcoólica dos açúcares redutores liberados em etanol (ADSUL *et al.*, 2005). O efeito positivo de um pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos já foi reconhecido há bastante tempo e este tem sido citado na literatura como um dos passos mais importantes para melhora do rendimento da hidrólise (LEE, 1997; MOSIER *et al.*, 2005).

Como visto na figura 15, o material lignocelulósico deve conter propriedades após os pré-tratamentos como produzir fibras desordenadas cuja porção contendo celulose possa sofrer hidrólise pelas celulasas sem maiores problemas, não liberar ou liberar quantidades pequenas de compostos com efeito inibitório; e o pré-tratamento deve ter um alto grau de simplicidade e ser economicamente viável (ADSUL *et al.*, 2005; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006).

Existem vários métodos de pré-tratamentos: físicos (explosão a vapor, radiação gama, micro-ondas, fluídos supercríticos, ultrassom, etc.), químicos (alcalinos, ácidos, solventes, gases, etc.) e biológicos (enzimas isoladas ou fungos) ou até mesmo combinações destes. Buscando a desorganização da fibra vegetal, como demonstrado na figura 15, pré-tratamentos do bagaço têm sido propostos incluindo o emprego de explosão a vapor (RAMOS, 2000), explosão por CO₂ (MARTIN; JONSSON, 2002; MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2006; SUN; CHENG, 2002), água quente (LASER *et al.*, 2002; SASAKI; ADSCHIRI; ARAI, 2003), peroxidação (MARTIN *et al.*, 2006), hidrólise parcial ácida (AGUILAR *et al.*, 2002) hidrólise ácida com H₂SO₄ ou HCL (SUN; CHENG, 2002), com ácido peracético (TEIXEIRA; LINDEN; SCHROEDER, 1999) ou alcalina com NaOH ou amônia (KURAKAKE; KISAKA; KOMAKI, 2001), pirólise e pirólise com vácuo (GARCA; CHAALA; ROY, 2002), uso de amônia ou CO₂ (SUN; CHENG, 2002) ozonólise, oxidação úmida (WO), biodegradação da lignina, explosão da fibra pela amônia (AFEX), uso de solventes orgânicos, uso de glicerol (DEMIRBAS, 1998), uso de micro-ondas (SANSEVERINO, 2002), uso de ultrassom (MARTINES; DAVOLOS; JUNIOR, 1999; INGRAM; WOOD; ALDRICH, 1997), entre outros.

Esses métodos promovem uma boa remoção da lignina e liberação da celulose e hemicelulose, mas geralmente produzem compostos indesejáveis sendo aromáticos fenólicos como hidroxibenzaldeídos e seringaldeídos, furânicos como furfuraldeído e 5 -hidroximetil 2 -

furfuraldeído, além dos ácidos fórmico, acético, vanílico e levulínico, os quais são derivados principalmente da quebra da lignina e inibem a atividade microbiana fermentativa.

É importante lembrar que independente da forma do pré-tratamento e da hidrólise empregados e do teor de açúcares obtidos, se ocorrerem formação de inibidores para a fermentação ou necessitarem de etapas de purificação do hidrolisado, o processo será técnica e economicamente inviável (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996).

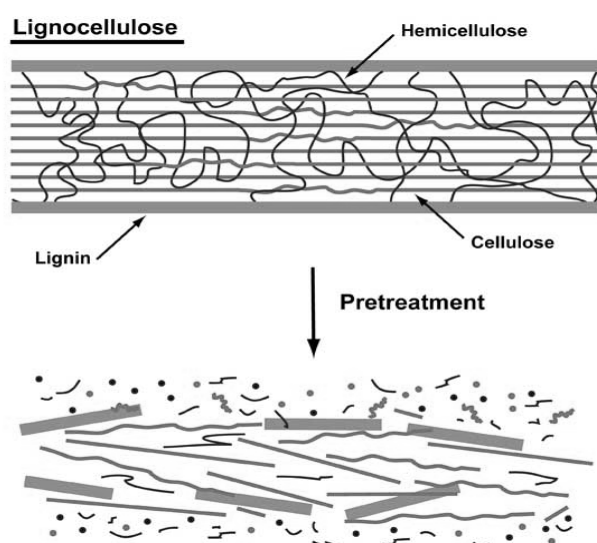


Figura 15: Exemplo ilustrativo do efeito desejado do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.
Fonte: <http://www.biomassmagazine.com/images/upload/20080403103622.jpg>

3.4.1 Micro-ondas

No espectro eletromagnético (figura 16), as micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes que se situam entre as ondas de rádio e a radiação infravermelha e caracterizam-se por ter frequência de emissão compreendida entre 300MHz e 300GHz. (SANSEVERINO, 2002).

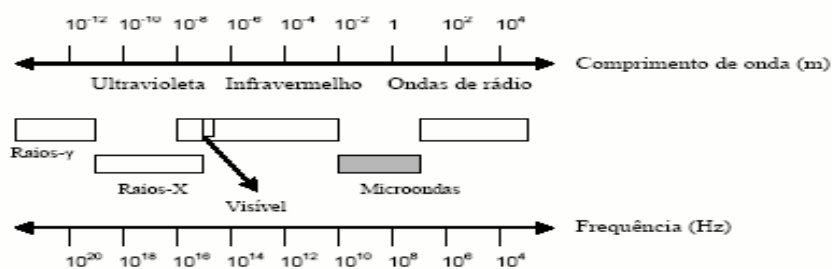


Figura 16. Localização da região de micro-ondas no espectro eletromagnético (SANSEVERINO, 2002).

Os primeiros relatos de reações orgânicas conduzidas em micro-ondas surgiram em 1986 e foram feitas em frasco selado com uma comparação com o aquecimento convencional. Uma notável redução no tempo de reação foi observada, embora não tenha havido um controle de pressão. O aquecimento por micro-ondas é completamente diferente daquele que ocorre em um forno convencional. Segundo Sanseverino, 2002 o aquecimento por micro-ondas é também chamado de aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro deles é chamado rotação de dipolo, e relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que tem dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor.

O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção, que acontecem através da migração de íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético. Estas perdas dependem do tamanho, carga, condutividade dos íons dissolvidos e interação destes últimos com o solvente. Em geral, substâncias polares absorvem bem micro-ondas (como água, acetonitrila, etanol), enquanto que substâncias menos polares (hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos) ou substâncias com momento de dipolo nulo (CCl_4 , CO_2) absorvem micro-ondas fracamente (SANSEVERINO, 2002).

A ação das micro-ondas sobre as moléculas de água provoca um intenso movimento rotacional que, por atrito gera aquecimento. Os choques provocados por este movimento rotacional podem ser úteis para promover a desestruturação do complexo ligno-hemicelulósico e conseqüentemente facilitar a ação enzimática sobre os polímeros que o compõem. Reações orgânicas com aquecimento por micro-ondas podem ser conduzidas em fornos de micro-ondas modificados, em digestores e/ou reatores de micro-ondas. A grande vantagem seria o baixo custo destas modificações quando comparado com o preço de um equipamento para laboratório. Além disso, a possibilidade de realização de refluxo, a facilidade de adaptação do forno, a ausência de solventes orgânicos, sendo, portanto apontada como técnica de química limpa, entre outras são viáveis, apenas necessitando de uma segurança operacional maior (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006; SANSEVERINO, 2002).

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

interessante de conduzir reações orgânicas pela grande redução nos tempos de reação e bons rendimentos. A técnica é promissora do ponto de vista industrial, já existindo vários reatores em uma escala de laboratório (SANSEVERINO, 2002). Silva; Ferreira e Souza (2006) serviram como referência principal para as modificações feitas no forno de micro-ondas que foi utilizado neste trabalho.

3.4.2 Ultrassom

Outra alternativa de pré-tratamento é o uso de ultrassom normalmente usado na indústria para limpeza de materiais, solda de plásticos, processos químicos, preparação de emulsão e suspensão, degaseificação de solventes, entre outros (MARTINES; DAVOLO; JUNIOR, 1999). O ultrassom é um método físico que reduz o grau de cristalinidade, diminui o grau de polimerização, aumenta a fração solúvel da fibrila de celulose e também ajuda a reduzir o tamanho das partículas, podendo ser usado diferentes potências como visto na Figura 17 (INGRAM; WOOD; ALDRICH, 1997).

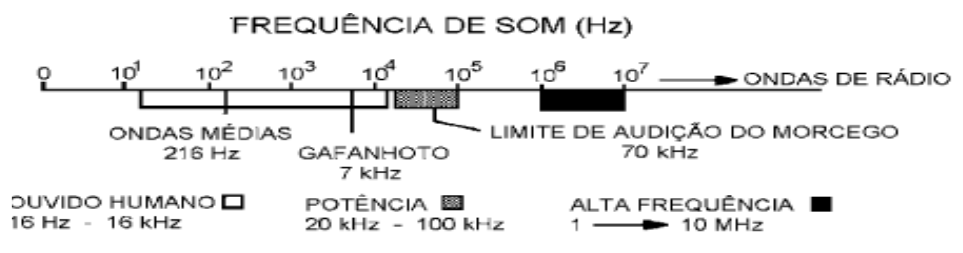


Figura 17. Região de frequência do som (MARTINES; DAVOLO; JUNIOR, 1999).

O tratamento em banho de ultrassom promove a intensa vibração das moléculas, gerando calor e causando alterações estruturais das fibras celulósicas. Um dos principais efeitos deste pré-tratamento foi aumentar a capacidade de retenção de água do substrato contribuindo assim para um maior desenvolvimento da capilaridade e retardando o processo de drenagem. Essas modificações possibilitam um maior alcance das enzimas ao substrato, sendo benéficas, portanto para a bioconversão de celulose em etanol. A cavitação ultrassônica é um processo complexo, influenciado por variáveis como temperatura, tempo, intensidade, frequência do ultrassom e a superfície do substrato. É responsável por suavizar a superfície das microfibrilas constituintes da celulose, aumentando a área hidratada disponível para ação enzimática (INGRAM; WOOD; ALDRICH, 1997).

Estudos realizados com prévia aplicação de banho de ultrassom em papel ofício e subsequente sacarificação e fermentação resultaram em maior rendimento na produção de etanol quando comparados com os resultados do material que não foi submetido ao processo do banho de ultrassom. Ingram; Wood e Aldrich (1997) reportam que após 24 horas de tratamento ultra-sônico em papel ofício com concomitante sacarificação enzimática, o aumento na produção de etanol foi da ordem de 50%. Após 96 horas de tratamento, o aumento foi de 16%. Vargas *et al.* (2004) demonstraram que é possível potencializar o processo de inversão de carboidratos por ultrassom e Sun *et al.* (2004b) conseguiram a solubilização de até 91% da lignina e de 92% da hemicelulose de bagaço de cana usando solução alcalina e peróxido de hidrogênio sob impacto de ondas ultra-sônicas. O uso do ultrassom em reações no laboratório tem se tornado comum e a extensão da tecnologia para reações em escala industrial virá em seguida atrelada os recentes avanços no entendimento da natureza da cavitação e os efeitos químicos do ultrassom.

3.4.3 Pré-Tratamentos Químicos Associados com Micro-ondas e Ultrassom

Diferentes condições químicas, como meios alcalinos, ácidos e oxidativos foram impostos ao bagaço durante o tratamento sob ação de micro-ondas e ultrassom. Alguns processos de pré-tratamento menos agressivos (condições mais brandas de temperatura e pressão, ausência de ácidos) têm sido citados na literatura como eficazes. Entre eles temos o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino (GOULD, 1984 e 1985; GOULD, U.S. Pat. N° 4,649,113, 1987; AMJED *et al.*, 1992; KRISHNA *et al.*, 1998) e peróxido de hidrogênio seguido de hidróxido de sódio, bastante conhecido das indústrias de papel e celulose, sendo utilizado para alvejar polpas de madeira altamente lignificadas.

3.5 Hidrólise Enzimática

A busca por técnicas de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com métodos que evitem ou minimizem a formação de compostos tóxicos é fundamental para o máximo aproveitamento dos materiais lignocelulósicos. As rotas mais conhecidas são as hidrólises ácida e enzimática (Macedo, 2003). Embora a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Além disso, se as condições de reação (temperatura, concentração de ácido) não forem muito bem controladas,

ocorre degradação dos produtos finais, incluindo a degradação da glicose, o que não ocorre na hidrólise enzimática devido à especificidade da enzima.

O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996, WYMAN, 1999; RILEY, 2002, LASER *et al.*, 2002; MACEDO, 2003; LEATHERS, 2003), pois é possível se atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente. No entanto, este processo ainda é economicamente inviável, o que reforça a necessidade de se fazer pesquisas sobre o assunto.

O maior problema é o custo das enzimas usadas e neste ponto o Brasil possui uma vantagem extraordinária devido, não só à grande disponibilidade de matéria-prima, mas também à possibilidade de integração com usinas de açúcar e destilarias, usando a infraestrutura existente. A grande dificuldade nos EUA e Europa é o alto custo da matéria-prima, o que os força a pesquisar a fermentação simultânea das pentoses e a recuperação de subprodutos para tornar o processo viável (ROSSEL *et al.*, 2005).

A obtenção dessas enzimas se dá principalmente através de bactérias e fungos, sendo alguns exemplos fúngicos representados principalmente por *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. A hidrólise enzimática da celulose requer adsorção da celulase na superfície da celulose, biodegradação da celulose em açúcares fermentecíveis e desadsorção da celulase. Entretanto, a baixa acessibilidade da enzima à estrutura da fibra do bagaço é uma barreira a ser vencida quando se busca a otimização do processo (SUN; CHENG, 2002).

Muitos microrganismos possuem eficientes sistemas enzimáticos capazes de converter a lignocelulose em metabólito essencial para seu crescimento. Esse complexo enzimático inclui Celulases (endo-1,4- β -celulase – EC 3.2.1.4; exo-1,4- β -glicosidase – EC 3.2.1.74; exo-1,4- β -D-celobiohidrolase – EC 3.2.1.91 e β -glicosidase – EC 3.2.1.21); Hemicelulases (β -1,4-D-endoxilanase – EC 3.2.1.8; exo-1,4- β -xilosidase – EC 3.2.1.37; α -L-arabinosidases – EC 3.2.1.55 e acetil esterases – EC 3.1.1.6) e Ligninases (lacases – EC 1.10.3.2; manganês peroxidase – EC 1.11.1.13 e lignina peroxidase – EC 1.11.1.14). Enzimas do grupo pectinolítico como pectina esterases - PE – EC 3.1.1.11; pectina liase (exo-PL – EC 4.2.2.9 e endo-PL – EC 4.2.2.2) e poligalacturonase (exoPG – EC 3.2.1.67 e endoPG – EC 3.2.1.15) têm sido também produzidas por fermentação de resíduos lignocelulósicos (KANG; PARK; LEE, 2004; DA SILVA; FRANCO; GOMES, 1997).

Sabe-se que as enzimas celulases são inibidas por celobiose e glicose e o padrão desta inibição tem sido objeto de vários estudos. A celobiose é um inibidor mais forte do que a glicose; ela é transformada em glicose pelas β -glicosidases. Como muitos complexos

enzimáticos comerciais apresentam baixas concentrações de β -glicosidase, é indicado que se adicione β -glicosidase de outras fontes aos complexos enzimáticos para diminuir a concentração de celobiose no meio reacional, diminuindo assim, a inibição (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996; SUN;CHENG, 2002). Além da inibição, algumas variáveis como a concentração do substrato, o grau de cristalinização e polimerização da celulose, conteúdo de lignina e a realização de pré-tratamentos podem afetar razoavelmente as taxas de hidrólise do material. A forte inibição de celulasas pelos seus subprodutos como celobiose e glicose e custos ainda desfavoráveis para a implantação em maior escala do processo são questões a serem exploradas (INGRAM; WOOD; ALDRICH, 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos físico-químicos foram desenvolvidos no Laboratório de Físico-Química, no Departamento de Química e Ciências Ambientais e os ensaios enzimáticos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, em São José do Rio Preto, SP.

4.1. Obtenção e Preparo do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar foi obtido a partir de usinas da região de São José do Rio Preto, referente à safra do início de 2008. Inicialmente o bagaço *in natura* foi lavado exaustivamente para remoção de quaisquer açúcares livres presentes nas fibras, seco em estufa a 60 °C com fluxo de ar por 48 horas e em seguida a granulometria das fibras foi padronizada por passagem em peneira granulométrica de 100 mesh. Após tais procedimentos, o bagaço foi armazenado em sacos plásticos de polipropileno lacrado, dispostos em local seco para posterior utilização.

4.2. Pré-Tratamentos

Neste trabalho foram avaliados diferentes tratamentos do bagaço de cana com a finalidade de se potencializar a ação de enzimas hidrolíticas no processo de sacarificação. Para os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar foram utilizados agentes químicos associados com: radiação com micro-ondas a pressão atmosférica, em sistema aberto empregando forno de micro-ondas doméstico adaptado com condensador de refluxo para se evitar a perda de solvente (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2006; CADDICK, 1995; SANSEVERINO, 2002), e em banho de ultrassom de 40 kHz (MARTINES; DAVOLOS; JUNIOR, 1999).

4.2.1. Agentes químicos

Soluções de caráter alcalino: NaOH(aq.) e NaOH(met.); caráter ácido: HCL, H₂SO₄, HI, HNO₃; caráter oxidativo: H₂O₂, I₂ (met.), I₂ (et.); soluções de sais e óxidos: Fe₂O₃, FeCl₂, CaO, CaCl₂, KI, NH₄SO₄; e tratamento sequencial com H₂O₂ seguido de NaOH. Todas as

soluções foram preparadas com 1% m/v ou v/v. Sabe-se que as concentrações molares não são equivalentes nestas situações, mas justifica-se em função do caráter exploratório do ensaio.

4.2.2. Micro-ondas

No presente trabalho foi usado um forno de micro-ondas doméstico adaptado Modelo Electrolux com capacidade de 20 litros e frequência de magnetron de 2450 MHz. Esse equipamento foi adaptado segundo Silva; Ferreira; Souza, (2006) para permitir a realização de reações em sistemas a pressão atmosférica com refluxo em diferentes taxas de exposição do material às micro-ondas, como visto na Figura 18.

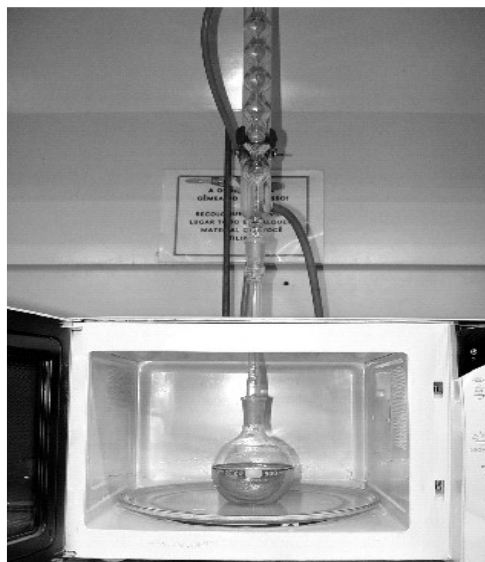


Figura 18: Adaptação do forno de micro-ondas doméstico para realização de refluxo.

Foi necessário furar a parte superior do forno de micro-ondas exatamente no centro de sua cavidade. Um conector foi construído para permitir a adaptação do condensador de refluxo revestido com anel de cobre e uma rolha de borracha ajustada ao sistema para evitar o vazamento de radiação. Os experimentos foram realizados no interior de uma capela sendo utilizados os equipamentos de proteção individual adequados. Para aumentar a segurança os pontos por onde passam as conexões foram vedadas externamente com cola de silicone que, além de impedir o possível vazamento de micro-ondas, é de fácil remoção e resistente a

temperaturas superiores a 110 °C. O condensador permite o refluxo dos solventes, não ocorrendo ressecamento nem queima do material a ser tratado.

Com a finalidade de aumentar a vida útil do magnetron, foi adaptado um cooler acima deste, forçando a saída do ar quente, como pode ser observado na Figura 19. Esses dispositivos evitam o desligamento do magnetron pelo termostato do forno por superaquecimento, garantindo assim os tempos de reação programados.



Figura 19. Adaptação do forno de micro-ondas doméstico para realização de refluxo (furações da cuba, revestimento com anel de cobre e cooler).

Em um balão de 250 ml conectado a um condensador de refluxo foram adicionados 5,0 g de bagaço de cana pré-tratado e lavado e 50 ml da solução com o agente químico a ser testado. O forno foi programado em potência máxima e os tempos de tratamento foram de cinco e dez minutos. No pré-tratamento sequencial com peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio os tempos reacionais foram divididos, 50% do tempo para o peróxido de hidrogênio e 50% do tempo após a adição do hidróxido de sódio totalizando como antes cinco ou dez minutos de reação.

Após esse tempo, o balão foi resfriado e transferiu-se o líquido resultante para frascos de vidro que foram armazenados em freezer a -20 °C para posterior análise cromatográfica. No sólido residual foi adicionada água destilada para lavagem e retirada do excesso de agente químico e encaminhado para secagem na estufa a 60°C por 48 horas para determinação de perda de massa. O material seco foi reservado para utilização nas hidrólises enzimáticas.

4.2.3 Ultrassom

Os ensaios em banhos de ultrassom seguiram o mesmo procedimento descrito no item 4.2.2, exceto que as amostras eram acondicionadas em erlenmeyers de 250 ml ao invés do balão e permaneciam em imersão parcial no banho, assegurando-se que todo o volume da amostra permanecia imerso, durante o tempo de ação da radiação ultrassônica.

4.2.4 Determinação da perda de massa do bagaço pré-tratado

A determinação da perda de massa mostra a atuação e o reflexo de cada tratamento sobre o material fibroso. A perda de massa foi determinada pela variação ocorrida após os diferentes tratamentos físico-químicos. Após cada tratamento, o bagaço foi novamente pesado e sua massa comparada com a massa inicial (5,0g). A diferença de massa foi expressa em percentagem de massa perdida e o controle foi realizado com água destilada.

4.2.5 Análises cromatográficas do bagaço pré-tratado

Como forma de avaliar a extensão da degradação da fração lignocelulósica das fibras pelos pré-tratamentos foram realizadas análises qualitativas e quantitativas de açúcares em termos do perfil cromatográfico dos componentes resultantes do bagaço tratado por meio de HPLC (Jasco PU-980 Intelligent HPLC Pump) com detector espectrofotométrico UV/VIS (Jasco UV-975 Intelligent UV/VIS Detector) em 255 nm e refratômetro (Shodex RI-72), acoplados em série nesta ordem.

Utilizou-se como eluente água deionizada em fluxo de 0,9 ml/min e coluna de BioRAD HPLC Carbohydrate Analysis Column Aminex® HPX-87C (300 mm x 7,8 mm) instalada em forno (Dionex STH 585) a 80°C. O líquido resultante dos diferentes pré-tratamentos foram centrifugados durante 10 min a 16530g e 20 µl do sobrenadante era utilizado para as análises cromatográficas.

Todas as amostras eram analisadas em duplicata. Foram preparadas curvas padrão dos açúcares glicose, xilose e celobiose nas concentrações de 0,01 %, 0,03 %, 0,05 %, 0,10 %, 0,30 %, 0,50 % e 1,0 %, seguindo os mesmos procedimentos descritos acima, as quais permitiram a identificação qualitativa e quantitativa destes açúcares através da correlação da área dos picos.

4.3. Complexos Enzimáticos

Os complexos enzimáticos utilizados foram obtidos através da empresa Novozymes® Latin América Ltda (Araucária - PR, Brasil): NS50013 – complexo de celulases e NS50012 – complexo enzimático contendo diferentes enzimas como celulases, hemicelulases, xilanases, etc. Foi avaliado o perfil enzimático do extrato bruto para padronização de atividade enzimática utilizada na hidrólise.

4.3.1. Atividades Enzimáticas

4.3.1.1. Hemicelulases

4.3.1.1.1 Xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada por meio reacional composto de 450 µl de substrato (solução 0,5% de xilana Birchwood Sigma Co. em tampão ácido acético/NaOH 0,1 M em pH 5,0) e 50 µl da solução enzimática convenientemente diluída, incubada em banho maria por 10 minutos a 45 °C.

O açúcar redutor foi quantificado pelo método Somogyi e Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944) que se dá em função dos açúcares reduzirem o íon cúprico do reativo I a óxido cuproso, em meio alcalino e a quente. Em seguida, o óxido cuproso reage com o ânion arsênio-molibdato do reativo II produzindo um composto de coloração azul (óxidos de molibdênio, Mo_2O_3 , com $\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$). Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose por minuto de reação, utilizando a curva padrão de xilose para quantificação.

4.3.1.2. Celulases

4.3.1.2.1 Avicelase e CMCase

A atividade da avicelase foi determinada por procedimento idêntico ao do item 4.3.1.1, exceto que o substrato foi substituído por celulose microcristalina (Avicel - Sigma Co.) a 0,5%. O mesmo procedimento foi utilizado para a quantificação da CMCase (endoglucanase ou β -glucanase) utilizando-se como substrato carboximetilcelulose (CMC - Sigma Co). Uma

unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto de reação, utilizando a curva padrão de glicose para quantificação.

4.3.1.2.2 β-glicosidase

A mistura de reação foi composta de 50 μL do extrato enzimático bruto, convenientemente diluído, 250 μL de 4-nitrofenol-D-glicopiranosídeo 4 mM (PNPG, Sigma Co.) e 250 μL de solução tampão ácido acético/NaOH 0,1 M e pH 5,0. A mistura do substrato mais tampão foi incubada a 45 °C e a reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 2,0 ml de Na₂CO₃ 2 M, o nitrofenol liberado foi quantificado por espectrofotometria na região do visível em 410 nm. A atividade enzimática foi determinada por curva padrão de nitrofenol. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de nitrofenol por minuto de reação.

4.3.1.3. Ligninases

4.3.1.3.1 Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 30 °C usando 2,2'-azino-bis-etilbenthiiazolina (ABTS) como substrato, em meio reacional contendo 0,1 ml de tampão ácido acético/NaOH 0,1 M (pH 5,0), 0,8 ml de solução de ABTS a 0,03 % (p/v) e 0,1 ml da solução enzimática bruta. A oxidação do ABTS foi medida pelo monitoramento do aumento da absorbância a 420 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de $3,6 \times 10^4$ /mol/cm para o ABTS oxidado (BOURBONNAIS;PAICE, 1988).

4.3.1.4. Pectinases

O mesmo procedimento do item 4.3.1.1 foi adotado para determinação da atividade das pectinases usando tampão ácido acético/NaOH pH 5,0 com 1 % de pectina.

4.4. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada em frascos de vidro esterilizados contendo 0,15 g de bagaço seco com 6 ml de tampão ácido acético/NaOH 0,1 M pH 5,0 que foram colocados em banho maria a 45°C e após a estabilização da temperatura foram adicionados 1,5 ml de

extrato enzimático diluído 20 vezes para padronização da atividade de avicelase em 300 U/ml. O meio reacional foi incubado a 45 °C por 24 horas sob agitação de 200 rpm.

Para a reação foram realizados ensaios em duplicata tanto para amostra hidrolisada quanto para o controle de cada amostra para o desconto do teor de açúcares já presentes nas amostras pré-tratadas. Frascos hermeticamente fechados foram empregados para evitar a evaporação da água e após 24 horas de hidrólise a reação foi paralisada em banho de gelo. Foram analisados também os hidrolisados em tempo zero que serviram como controles da reação. Os sobrenadantes foram então cuidadosamente transferidos para microtubos tipo eppendorf e congelados em freezer a -20 °C para ensaios posteriores.

A quantidade de açúcares redutores liberados durante a hidrólise foi quantificada por meio do método de Somogy-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944) e por HPLC como descrito anteriormente.

4.4.1. Determinação de açúcares redutores totais solúveis no hidrolisado

Para determinação de açúcares redutores totais liberados com a hidrólise enzimática foi utilizado a metodologia de Somogy-Nelson (SOMOGYI, 1945; NELSON, 1944). As amostras foram anteriormente filtradas e centrifugadas, sendo que nos controles correspondem aos açúcares já presentes nas fibras. Os reativos I e II da reação de Somogy-Nelson foram preparados com reagentes analíticos e foi elaborada curva padrão com diferentes concentrações de glicose e os resultados expressos em mg de ART/g de bagaço.

4.4.2. Determinação de açúcares redutores por análise cromatográfica do hidrolisado

Uma série de compostos entre sacarídeos de diferentes tamanhos, compostos fenólicos, aldeídos, ácidos, ésteres, entre outros podem ser obtidos no processo de hidrólise enzimática. Geralmente os artigos da literatura da área expressam seus resultados somente pela quantificação de açúcares redutores, porém é importante salientar a importância da determinação de compostos inibidores de microrganismos fermentadores por HPLC-RI para determinação de carboidratos e HPLC-UV para determinação de compostos fenólicos ($\lambda=255$ nm). As análises cromatográficas do hidrolisado foram realizadas de maneira análoga à descrita no item 4.2.5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Estudo de variação de massa do pré-tratado

Foram realizadas análises de perda de massa nos tratamentos com micro-ondas e ultrassom sendo os valores representados em porcentagem, segundo análise estatística das amostras em duplicata. São mostrados na Tabela 1 os valores médios referentes à diferença de massa expressa em porcentagem nos tempos 5 e 10 minutos e o controle para o pré-tratamento com uso de micro-ondas.

Foi possível observar claramente que os pré-tratamentos com tempo de reação de 5 minutos, tanto com uso de micro-ondas quanto com uso de ultrassom, foram menos eficientes que os pré-tratamentos com 10 minutos. Em função disso, foram considerados nos ensaios cromatográficos e nas discussões a seguir apenas as perdas de massa dos pré-tratamentos executados com tempos de exposição da fibra de 10 minutos, devido sua maior potencialidade.

Verificou-se que as amostras controle (pré-tratamentos físicos com micro-ondas e ultrassom sem o uso de agentes químicos), em relação ao controle *in natura*, sofreram perda de massa na ordem de 3% para micro-ondas e 1,6% para ultrassom. Observou-se também variações consideráveis nas massas das amostras tratadas com todos os ácidos minerais chegando a 55,8 % de perda de massa da amostra tratada com ácido clorídrico, seguido da amostra tratada com ácido nítrico, com perda de 51,5%, com o uso das micro-ondas.

Tabela 1. Determinação da massa perdida e variação da perda de massa em porcentagem das amostras de bagaço de cana em função dos diferentes tratamentos sob ação de micro-ondas em diferentes tempos de exposição da fibra.

Soluções	Micro-ondas em 5 minutos		Micro-ondas em 10 minutos	
	Massa Perdida (g)	Perda de Massa (%)	Massa Perdida (g)	Perda de Massa (%)
Controle	0,09	1,78±0,72	0,15	3,08±0,90
HCL	1,83	36,02±0,96	2,87	55,82±0,88
H ₂ SO ₄	1,98	38,60±0,52	2,26	44,04±0,49
HI	1,72	33,50±0,99	2,35	45,88±1,38
HNO ₃	2,03	40,11±1,51	2,64	51,53±2,03
NaOH	0,22	4,34±2,03	0,88	17,32±3,63
H ₂ O ₂ + NaOH(Seq)	0,86	16,89±0,98	1,15	22,82±0,45
NaOH em Metanol	0,11	2,15±0,76	0,18	3,58±1,38
Fe ₂ O ₃	0,83	16,27±0,66	1,78	33,68±6,53
FeCl ₂	0,93	18,30±0,96	1,80	35,08±0,46
CaO	1,13	22,28±2,14	2,38	45,72±0,78
CaCl ₂	1,11	21,85±3,16	1,59	30,47±1,06
KI	0,99	19,64±1,68	1,98	38,17±2,70
NH ₄ SO ₄	0,42	8,36±0,79	0,66	13,05±3,05
I ₂ em Etanol	0,55	10,76±0,83	0,91	18,05±4,12
I ₂ em Metanol	0,11	2,17±0,93	0,15	2,99±0,21
H ₂ O ₂ 10v	0,20	3,97±2,24	0,36	7,26±2,73
H ₂ O ₂ 20v	0,36	7,15±1,89	0,52	10,35±1,99

De forma geral, os tratamentos ácidos com micro-ondas foram extremamente efetivos na perda de massa e também ocorreram perdas de massa moderadas em meio alcalino sendo a maior no pré-tratamento com NaOH, de 17,3%. Dentre os dois óxidos inorgânicos estudados, o óxido de cálcio foi o que proporcionou uma perda de massa de 45,7 %, o que pode ser considerada da mesma magnitude que os resultados obtidos pelos ácidos inorgânicos. O tratamento realizado com sais cujos cátions são ácidos de Lewis como o CaCl₂ e o FeCl₂ resultaram em perdas de massa moderadas, sendo que proporcionaram em média uma redução de 30-35% na massa do bagaço.

Já o tratamento com KI acarretou aproximadamente 38,2%, o que deve estar mais relacionado com a natureza do ânion do que com o cátion. Os tratamentos oxidativos como peróxido de hidrogênio e o iodo associado com solventes proporcionaram reduções de massas muito pequenas quando comparados com outros tratamentos. Ou seja, os resultados

demonstram claramente que o uso de agentes químicos tem grande participação na desestruturação do bagaço de cana-de-açúcar.

A Tabela 2 traz os valores referentes à diferença de massa expressa em percentagem de massa perdida nos tempos 5 e 10 minutos e o controle para os tratamentos com uso do ultrassom.

Tabela 2. Determinação da massa perdida e variação da perda de massa em porcentagem das amostras de bagaço de cana em função dos diferentes tratamentos sob ação de ultrassom em diferentes tempos de exposição da fibra.

Soluções	Ultrassom em 5 minutos		Ultrassom em 10 minutos	
	Massa Perdida(g)	Perda de Massa(%)	Massa Perdida(g)	Perda de Massa(%)
Controle	0,01	0,20±0,39	0,09	1,66±0,48
HCL	0,64	12,81±0,96	1,39	27,37±1,05
H ₂ SO ₄	0,51	10,08±0,73	0,59	11,72±0,04
HI	0,45	8,96±1,18	1,48	29,04±2,97
HNO ₃	0,44	8,75±1,13	1,27	24,79±0,70
NaOH	0,08	1,57±2,06	0,15	2,85±0,07
H ₂ O ₂ + NaOH(Seq)	0,12	2,36±0,73	0,75	14,82±0,74
NaOH em Metanol	0,16	3,16±0,28	0,44	8,58±6,38
Fe ₂ O ₃	0,38	7,48±0,13	1,23	24,47±0,77
FeCl ₂	0,02	0,39±1,16	0,06	1,36±0,57
CaO	0,55	10,72±1,83	1,14	22,06±0,11
CaCl ₂	0,42	8,30±1,92	0,88	17,26±2,46
KI	0,07	1,39±3,02	0,10	2,19±0,59
NH ₄ SO ₄	0,11	2,18±1,53	0,25	4,87±0,29
I ₂ em Etanol	0,13	2,56±0,78	0,49	9,41±5,01
I ₂ em Metanol	0,00	0,00±0,00	0,48	9,51±0,25
H ₂ O ₂ 10v	0,11	2,19±0,93	0,24	4,85±1,47
H ₂ O ₂ 20v	0,19	3,77±1,18	0,39	7,46±0,80

No tratamento ultrassônico destacam-se valores entre 29-11% para os ácidos, sendo que o mais efetivo foi o ácido iodídrico (29%), diferentemente do ocorrido no tratamento com micro-ondas onde o ácido iodídrico apresentou rendimentos altos de perda de massa (45%), porém, ainda foi menor que o ácido clorídrico (55%) com as micro-ondas. Tem-se o óxido de ferro (Fe₂O₃) com 24,47% e o óxido de cálcio (CaO) com 22,06% e variáveis entre 7 – 9% para os pré-tratamentos oxidativos.

De modo geral, os tratamentos com uso de ultrassom demonstraram ser pouco efetivos na perda de massa quando comparados aos tratamentos com uso de micro-ondas, com valores de perda de massa numa faixa relativamente menor, como exemplo o controle que mostrou valores próximos a 1,6% no ultrassom e a 3% no micro-ondas comprovando o potencial de atuação maior da radiação micro-ondas.

5.2. Análises cromatográficas qualitativas do pré-tratado

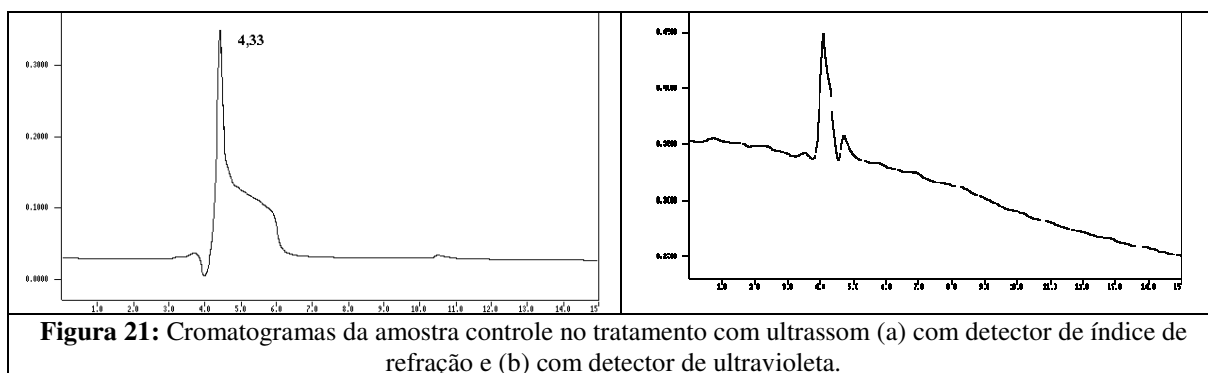
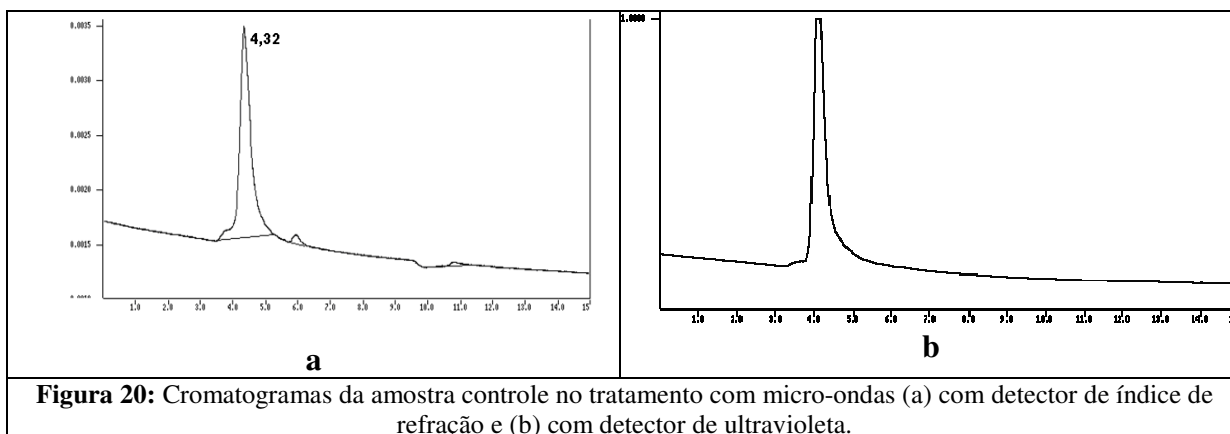
Para cada pré-tratamento realizado no bagaço de cana são apresentados os cromatogramas de índice de refração para detecção de carboidratos e de ultravioleta para detecção de fenólicos em geral. Os tempos de retenção dos padrões de carboidratos estudados estão relacionados na Tabela 3. Os cromatogramas de índice de refração e de ultravioleta dos padrões analíticos encontram-se no Anexo 1.

Tabela 3. Tempo de retenção dos padrões de carboidratos no pré-tratamento

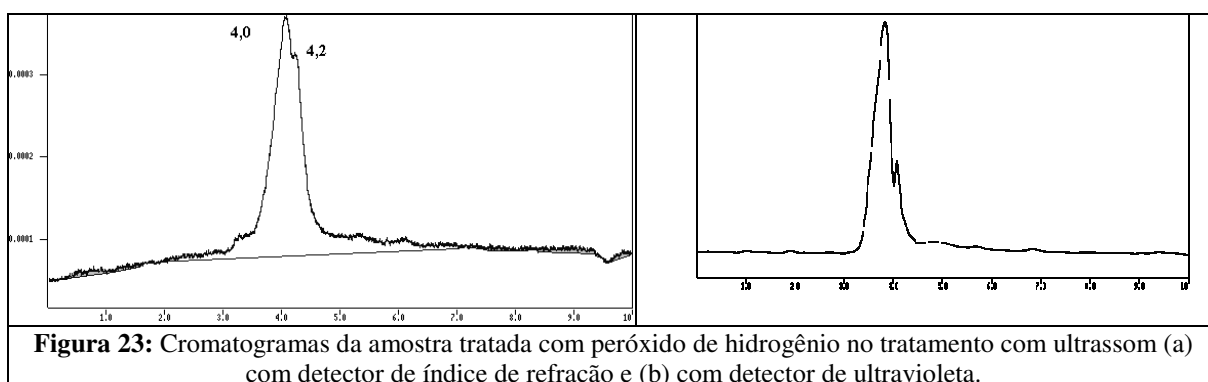
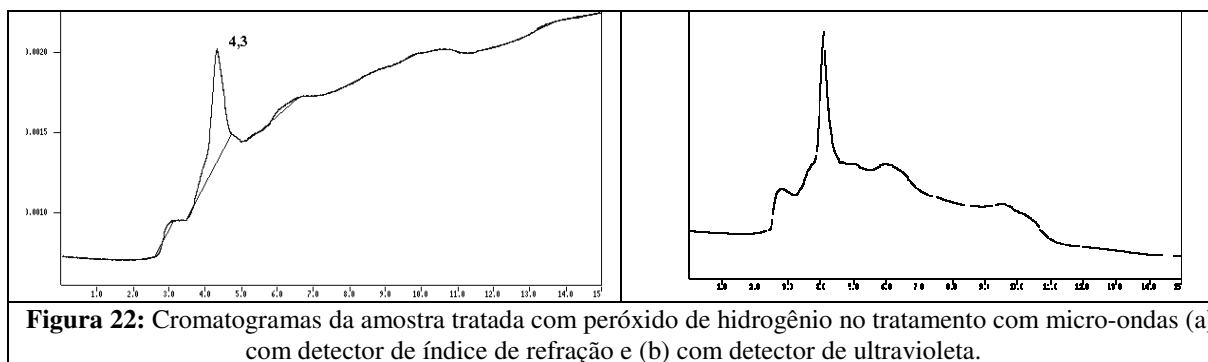
Padrão Cromatográfico	Tempo de Retenção (min)
Glicose	7,0
Xilose	7,6
Celobiose	5,5
Maltose	5,7
Sacarose	5,6
NaOH	4,0
Iodo (I ₂)	5,0
Solventes (Etanol e Metanol)	11,0

Foi observado que os compostos químicos empregados nos tratamentos podem contribuir para formação de picos cromatográficos nos intervalos de tempo mencionados, sendo assim os picos detectados em tempos de retenção menores que 4 minutos e maiores que 11 minutos não foram considerados na discussão dos resultados. No caso de um pico cromatográfico ocorrer no mesmo tempo nos detectores de índice de refração e de ultravioleta, este não será considerado como carboidrato, devido à presença de grupos cromóforos.

Nas amostras controle não foi detectada a presença de carboidratos de acordo com o tempo de retenção dos padrões analíticos empregados, tanto no tratamento com micro-ondas como no tratamento com ultrassom (Figura 20 e 21). Nas figuras 22 e 23 são apresentados os tratamentos com peróxido de hidrogênio que não demonstraram a presença de carboidratos, devido à presença de compostos cromóforos nos picos com o detector de ultravioleta.



Isto se dá porque os açúcares não são cromóforos, pois possuem ligações duplas conjugadas, comuns apenas nos compostos que absorvem no visível, justificando assim a ausência de açúcares nos cromatogramas com picos iguais nos dois detectores utilizados.



Nos cromatogramas dos pré-tratamentos com NaOH aquoso foi encontrado pico no tempo da xilose para o uso de micro-ondas, como pode ser visto na figura 24.

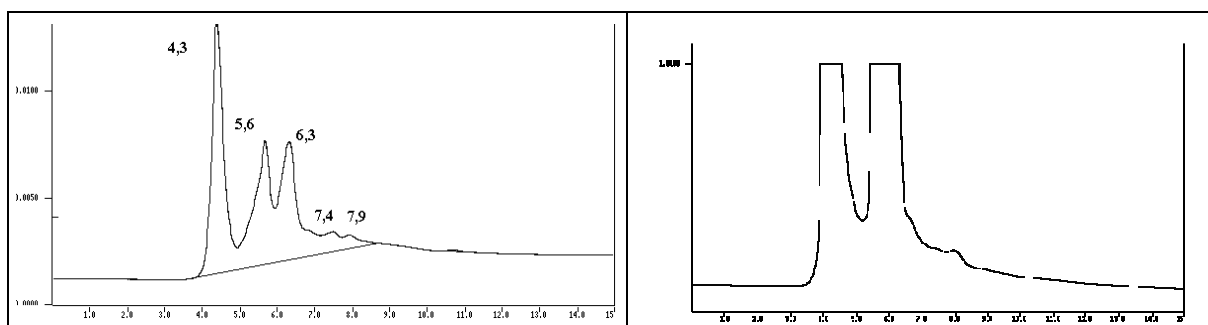


Figura 24: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.

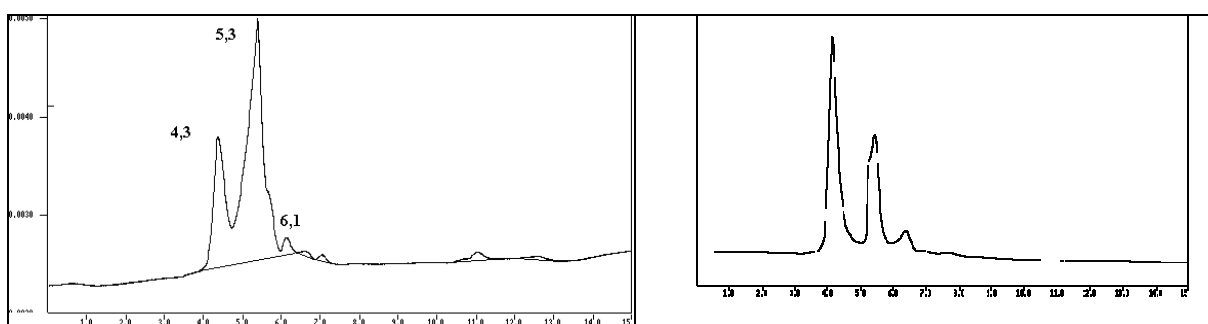


Figura 25: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio no tratamento com ultrassom (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.

Os tratamentos com hidróxido de sódio associado ao metanol mostraram diferentes picos nos detectores de ultravioleta, tanto no tratamento com micro-ondas quanto com o ultrassom demonstrando assim a efetiva atuação do meio alcalino na fração de lignina do bagaço de cana-de-açúcar (Figuras 26 e 27).

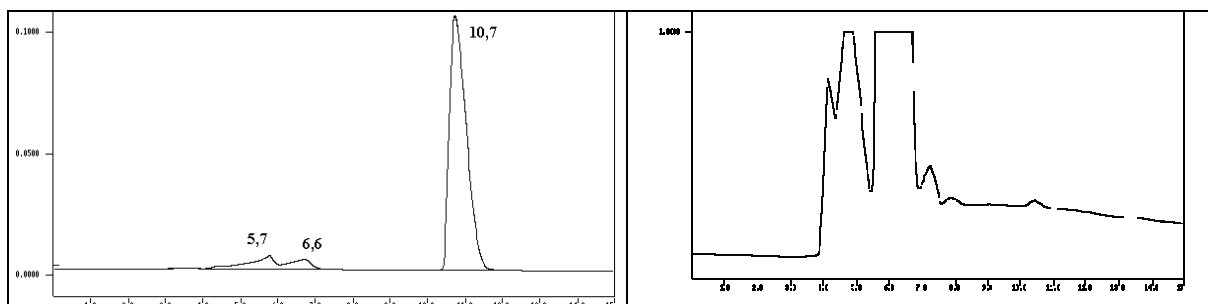
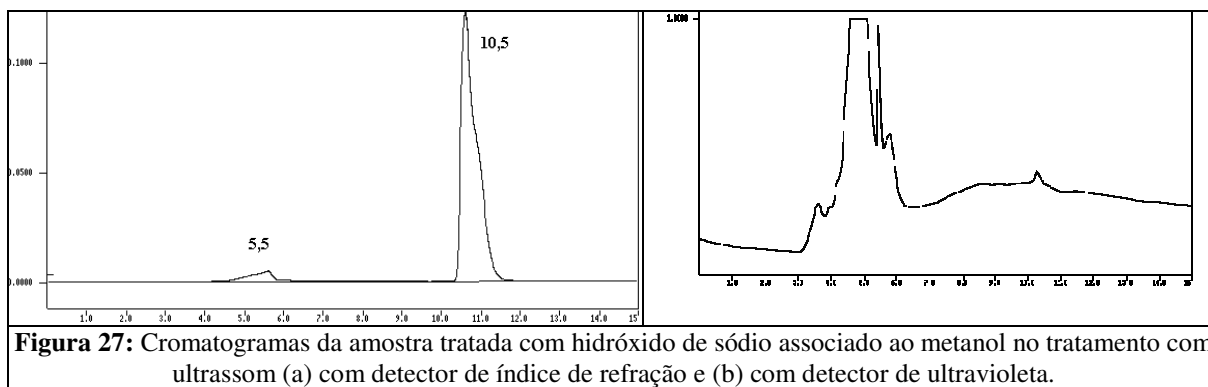
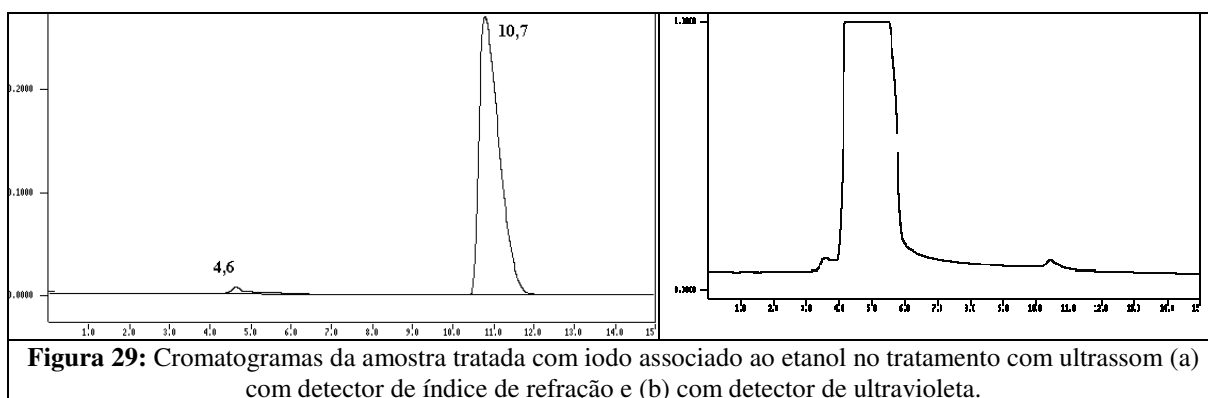
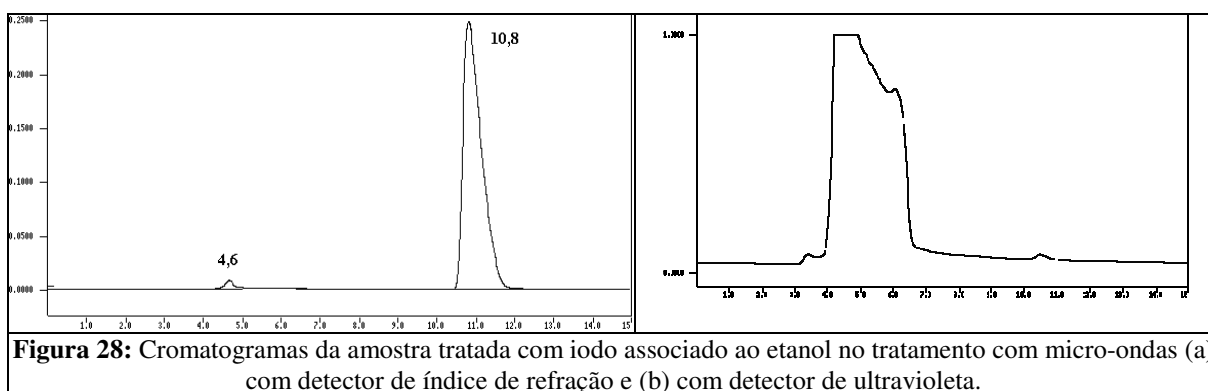
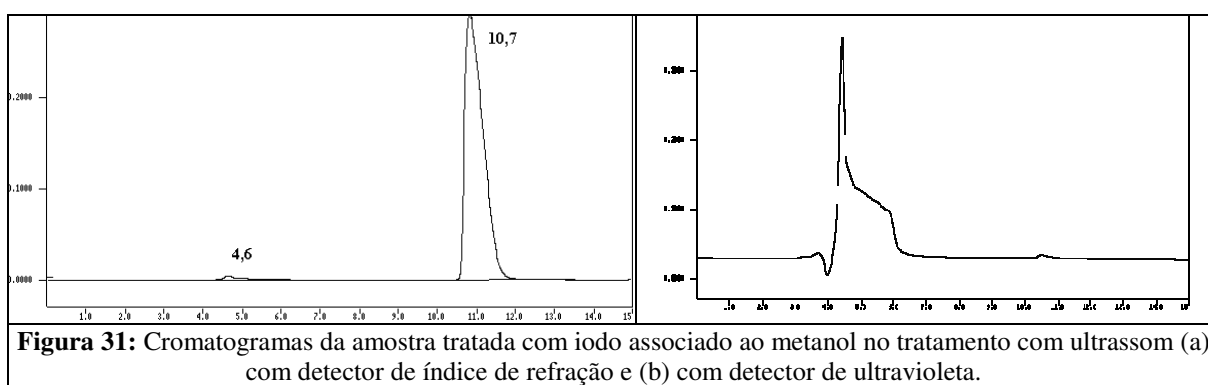
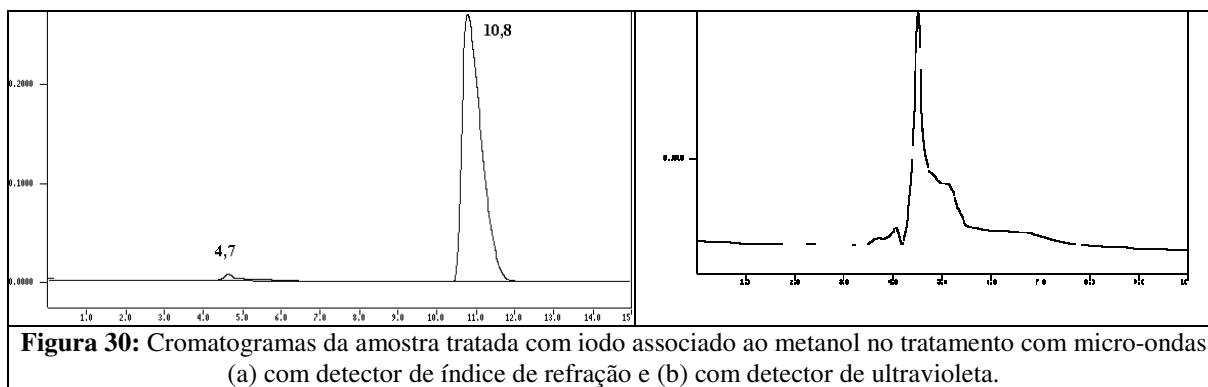


Figura 26: Cromatogramas da amostra tratada com hidróxido de sódio associado ao metanol no tratamento com micro-ondas (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta.

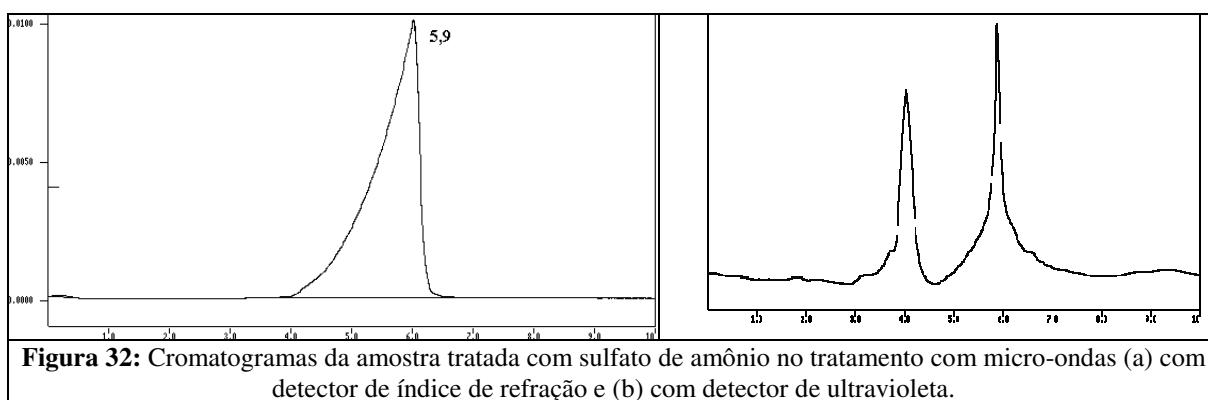


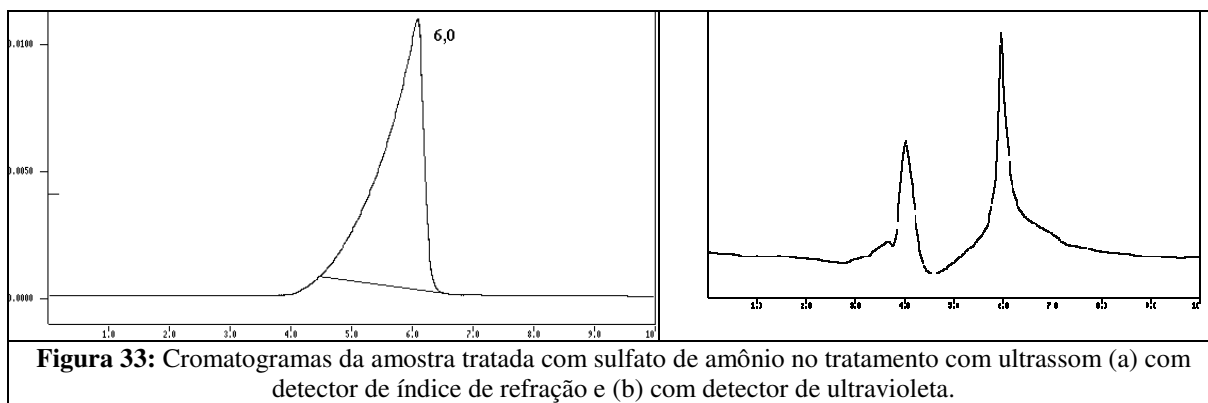
Os tratamentos oxidativos com iodo associados aos solventes como etanol e metanol mostrados da Figura 28 até a Figura 31 também não demonstraram resíduos de carboidratos sendo pouco significativo na determinação de resíduos fenólicos, tendo somente variações de massa de aproximadamente 4% para ultrassom e 9,5% para micro-ondas.



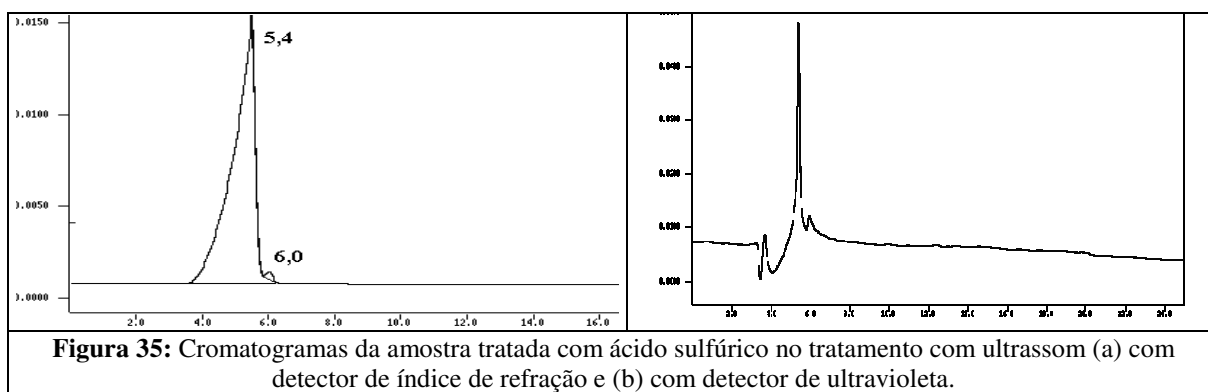
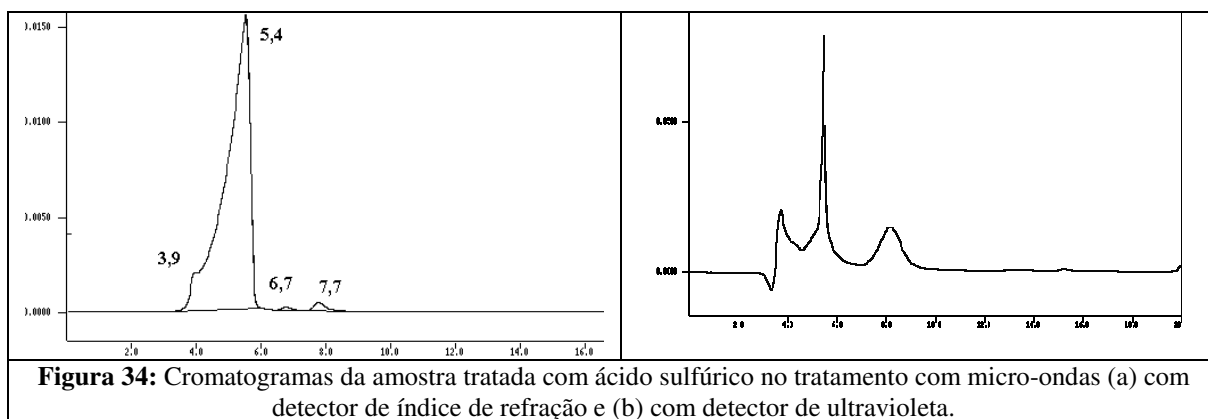


Nos tratamentos com sulfato de amônio correspondentes as Figuras 32 e 33, não ocorreram liberações de carboidratos, com tempos de retenção similares aos padrões estudados. Através do detector de ultravioleta foi possível visualizar liberações de compostos cromóforos, o que possivelmente deve-se à degradação da lignina.

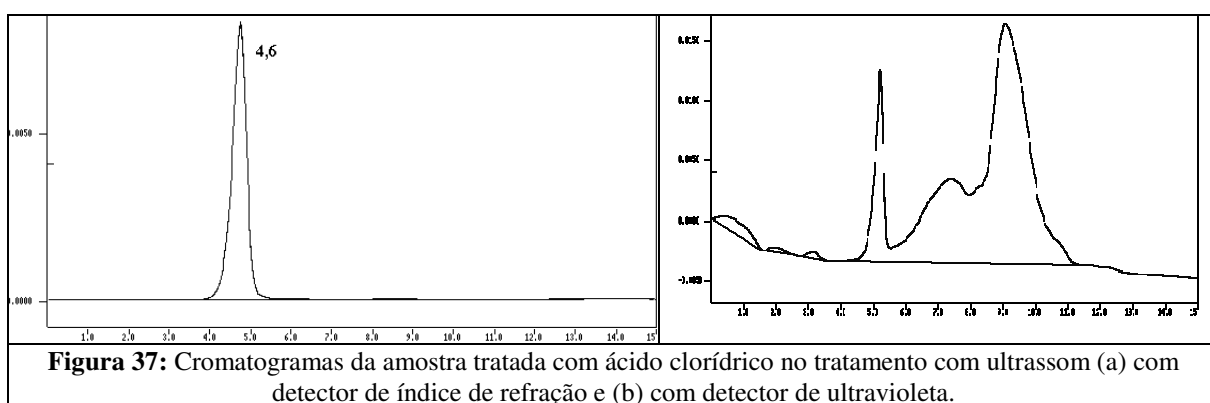
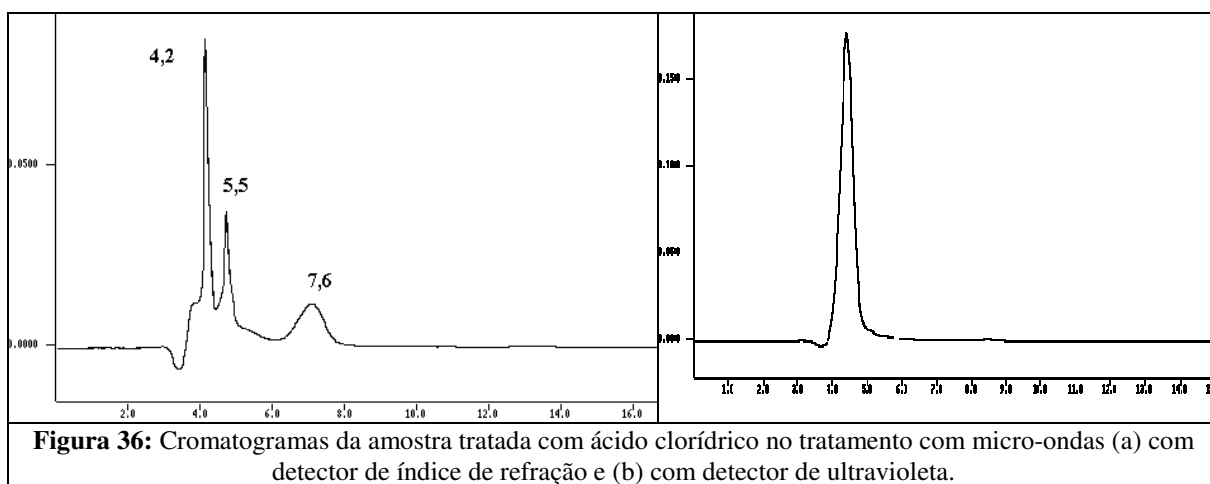




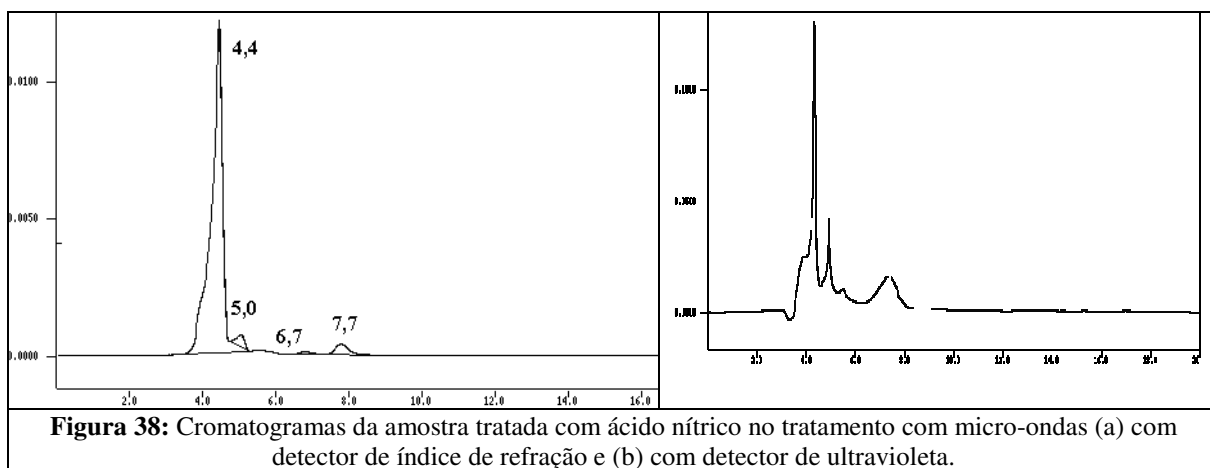
Os tratamentos ácidos mostrados nas Figuras 34 até 41 sugerem que houve desestruturação do bagaço de cana-de-açúcar e liberação de carboidratos nos picos variando entre 5 e 8 minutos no detector de índice de refração sendo provável a presença de pequena quantidade de açúcares como glicose, xilose e celobiose comparados com os padrões analíticos. Os cromatogramas com detector de ultravioleta do pré-tratamento com ácido sulfúrico com micro-ondas e ultrassom, vistos nas figuras 34b e 35b, demonstram o perfil de desestruturação química do bagaço. Além desta designificação, foi detectado com o uso de micro-ondas pico coerente ao tempo de retenção da xilose.

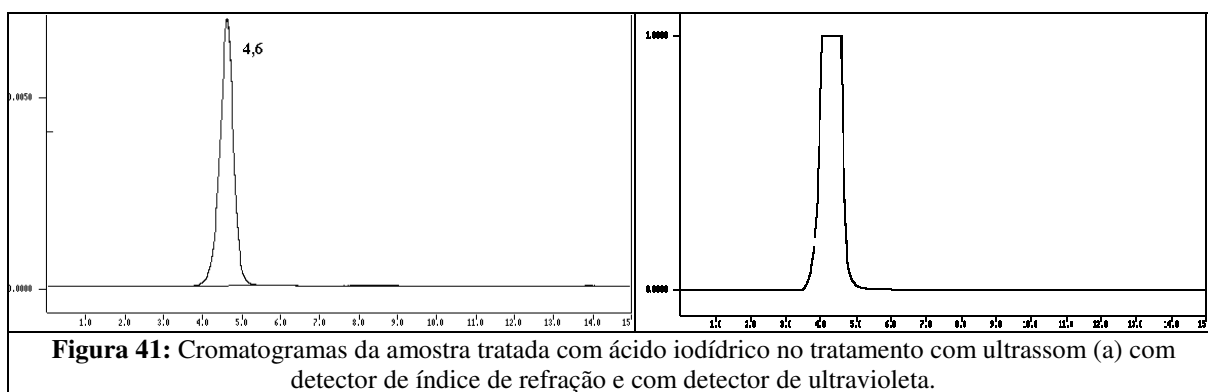
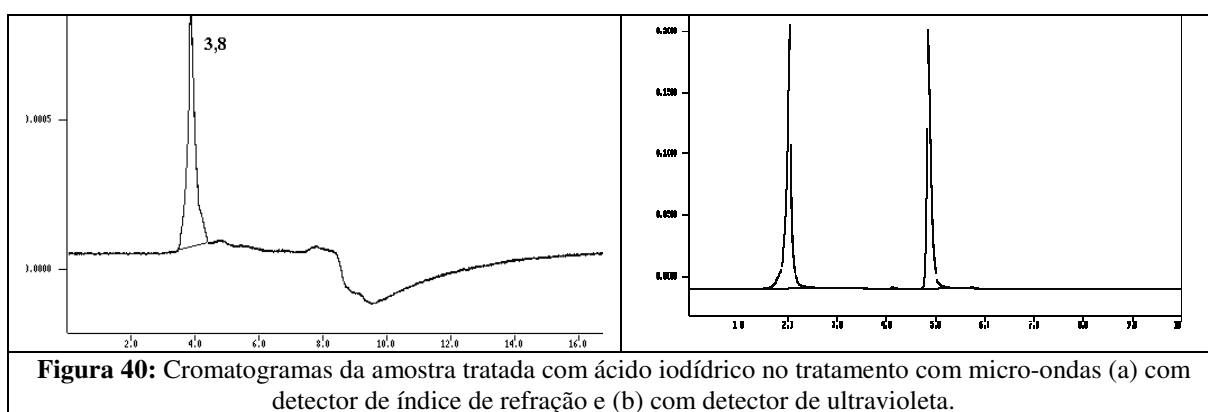
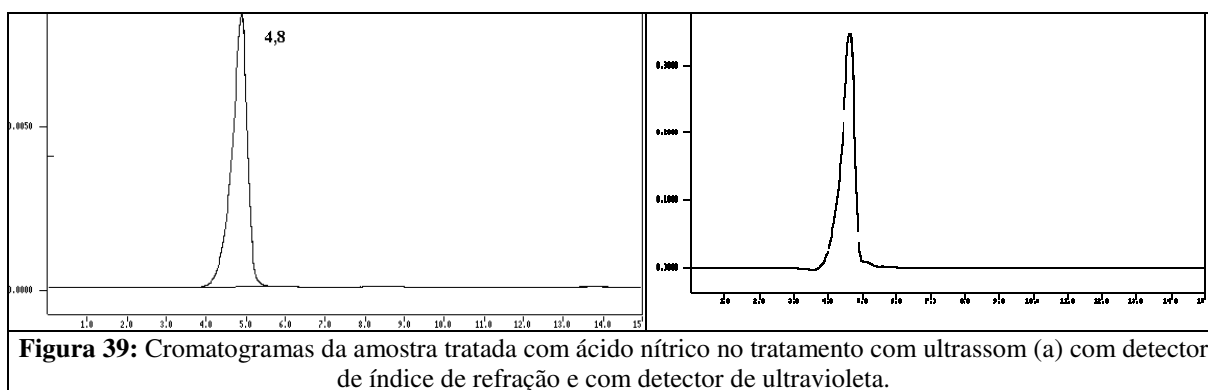


Com o ácido clorídrico foi encontrado pico em 7,6 minutos referente a xilose e 5,5 minutos referente a celobiose, no tratamento com micro-ondas (Figura 36). Além disso, apresentaram a maior porcentagem de massa perdida justificando o aparecimento de carboidrato pelo possível desarranjo na estrutura do bagaço.



As amostras tratadas com ácido nítrico liberaram compostos fenólicos como mostrados nas Figuras 38 até 40 e também ocorreu liberação de xilose no tempo de 7,7 minutos com o uso das micro-ondas, demonstrado na figura 38.



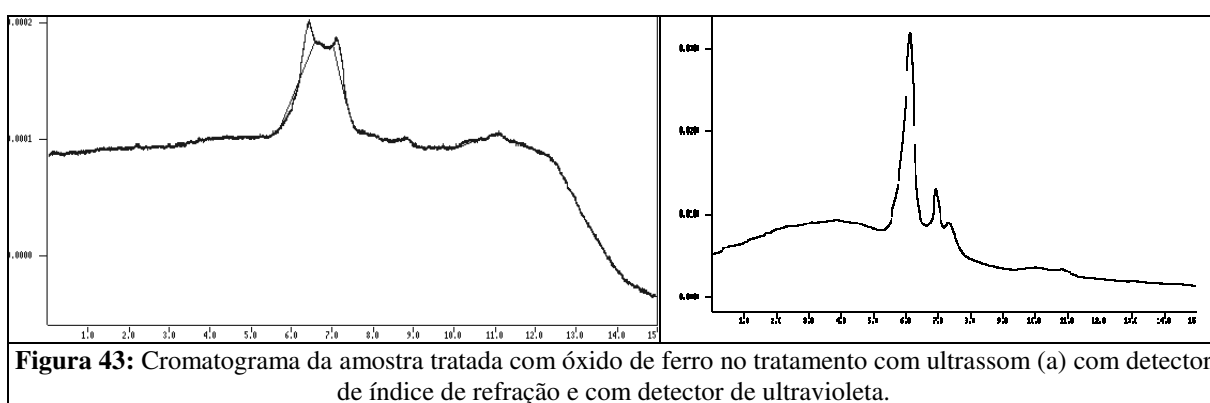
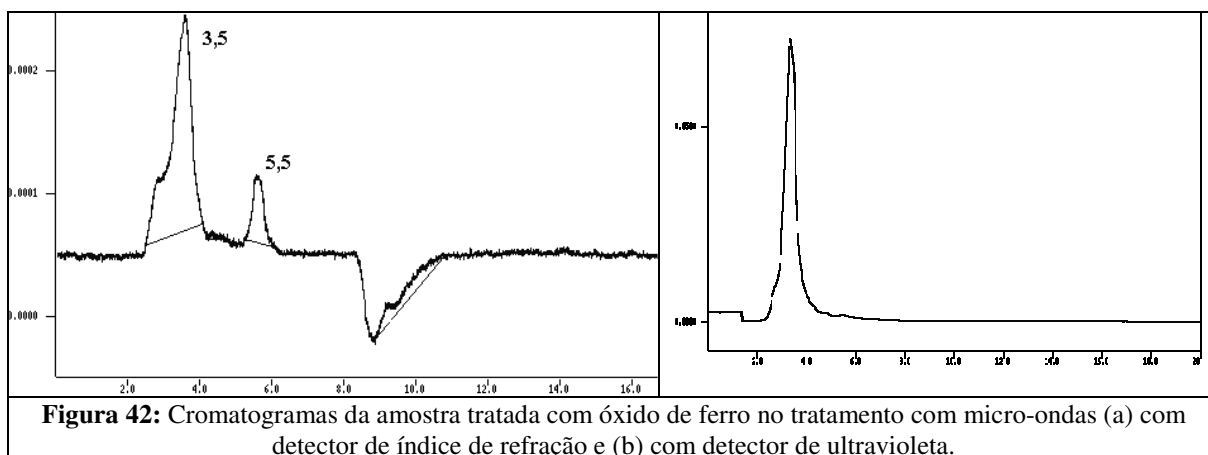


Embora se tenha conseguido uma perda de massa significativa com o emprego do ácido iodídrico não foi detectado nenhum pico correspondente aos carboidratos com tempos de retenção estabelecidos. No entanto apresentaram picos cromatográficos com o detector de ultravioleta liberando compostos aromáticos e fenólicos relacionados com a deslignificação.

Podemos então inferir que os diferentes tipos de ácidos empregados nos tratamentos promovem liberações de diferentes compostos químicos originados da fração lignocelulósica.

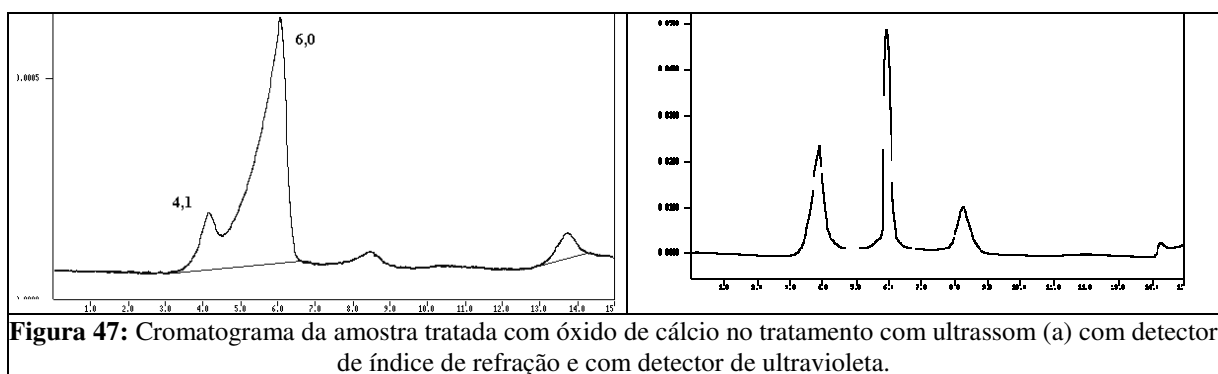
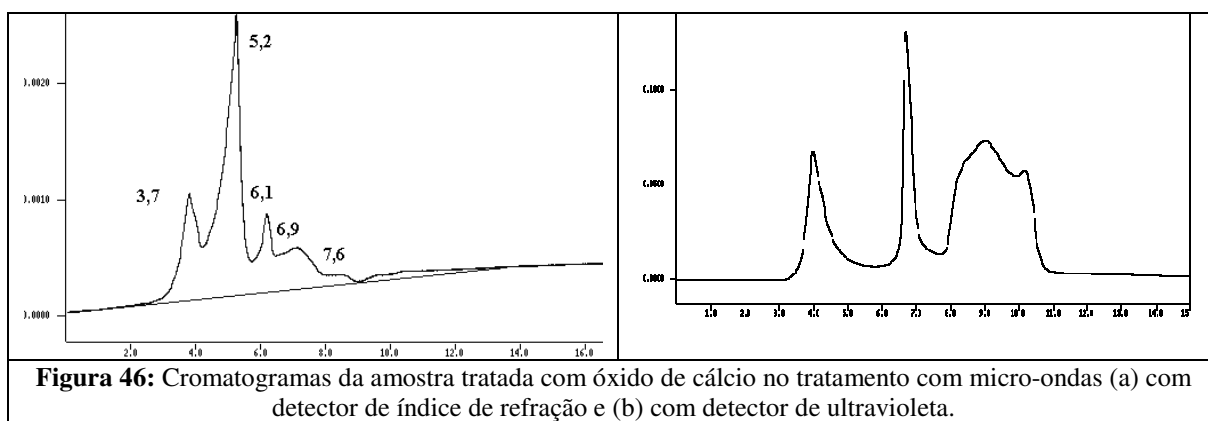
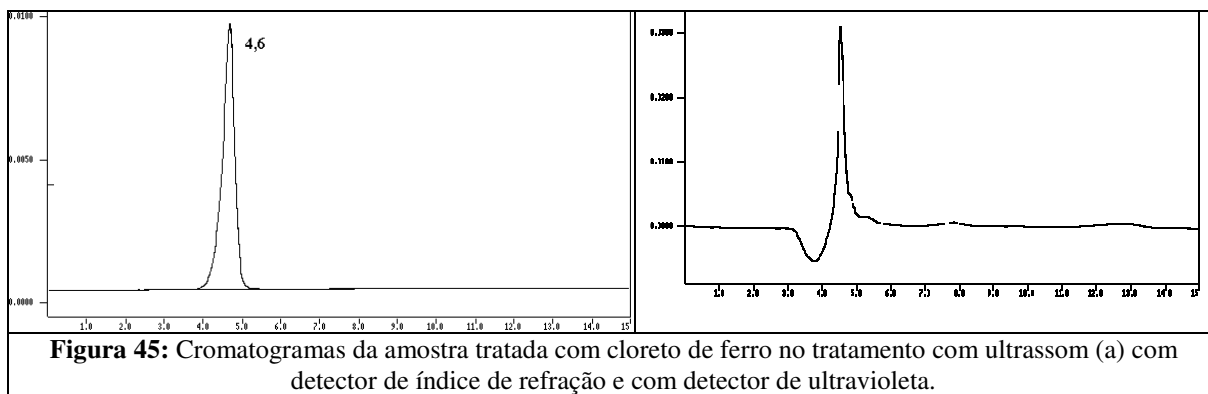
Para os tratamentos com óxidos, tanto o óxido de ferro (Figuras 42 e 43) quanto o óxido de cálcio (Figuras 46 e 47) o uso das micro-ondas associadas a esses agentes químicos

resultaram na liberação de açúcares, pois os picos foram detectados no índice de refração e não apareceram no ultravioleta, o que nos leva a crer que se trata de carboidratos.



O uso de radiação micro-ondas associada à solução de cloreto de ferro promoveu liberação de um composto com tempo compatível com a xilose e a celobiose e no detector de ultravioleta foi comprovado a presença de compostos fenólicos possivelmente liberados na desestruturação da lignina (Figuras 44 e 45) permitindo assim que a fração hemicelulósica fosse liberada. Embora o agente químico seja um ácido de Lewis, sua ação como agente de despolimerização não foi elucidada até o momento, necessitando-se de novos estudos.

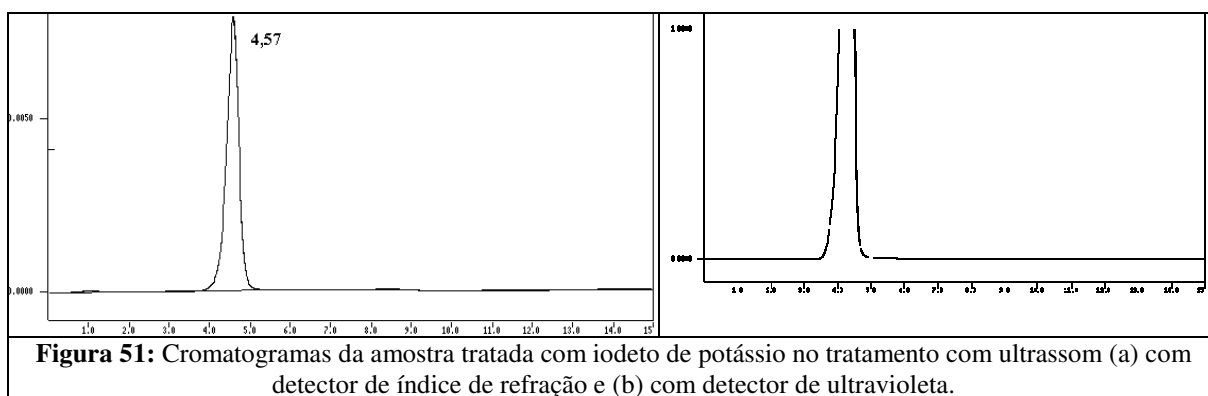
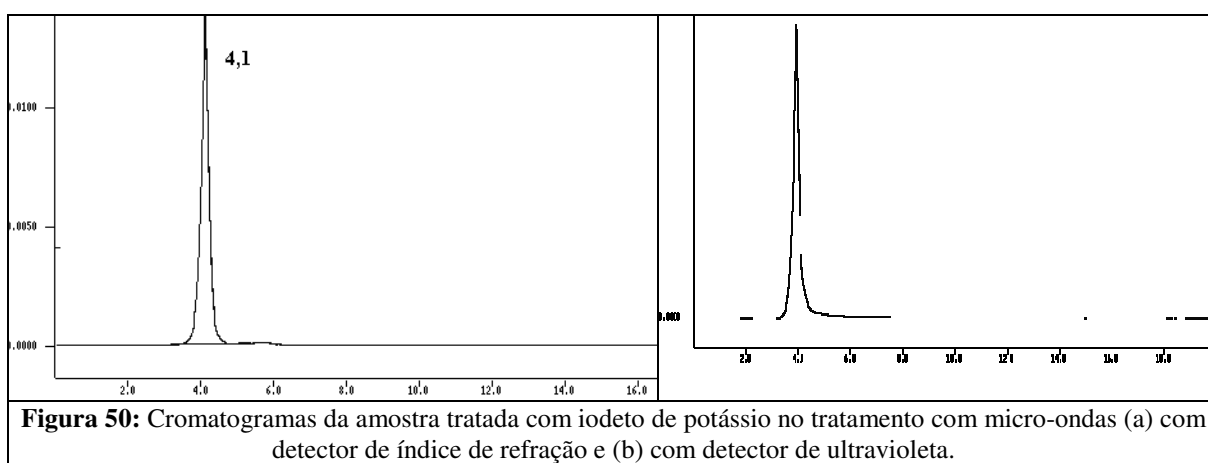
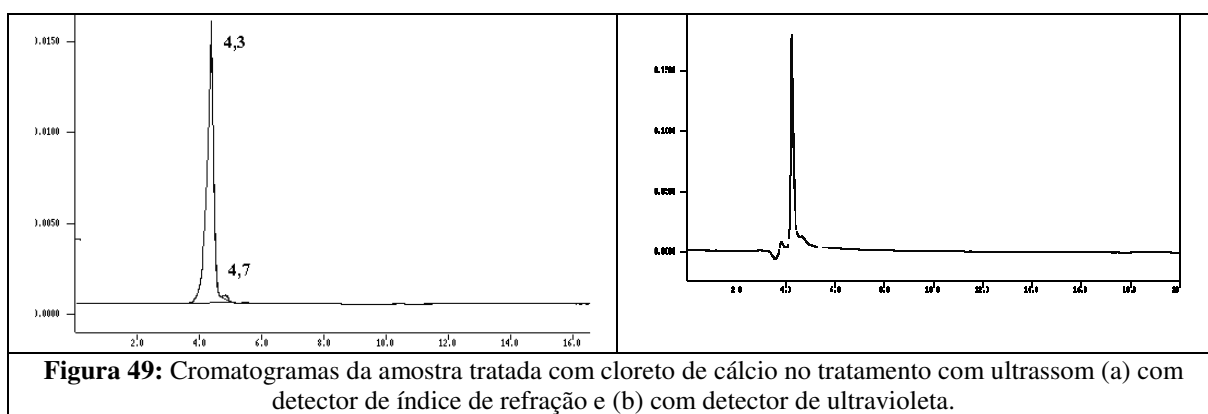
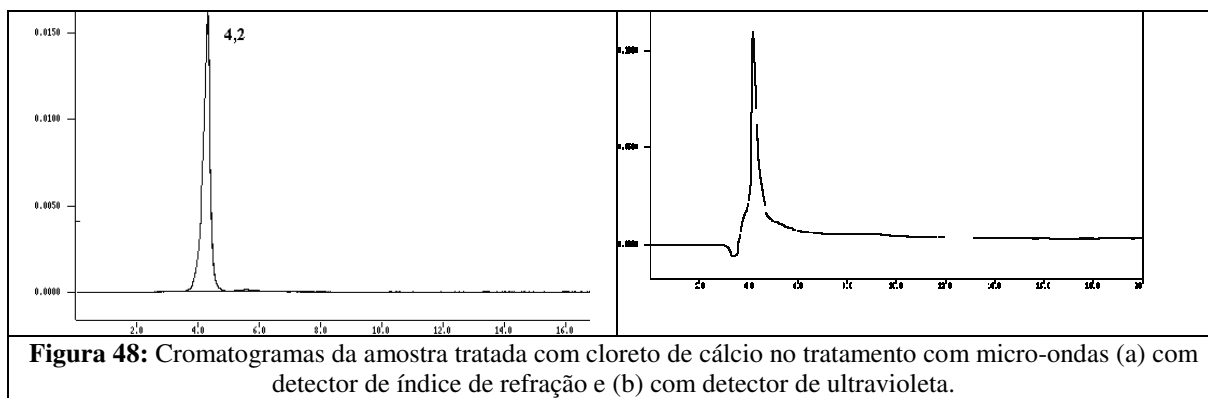




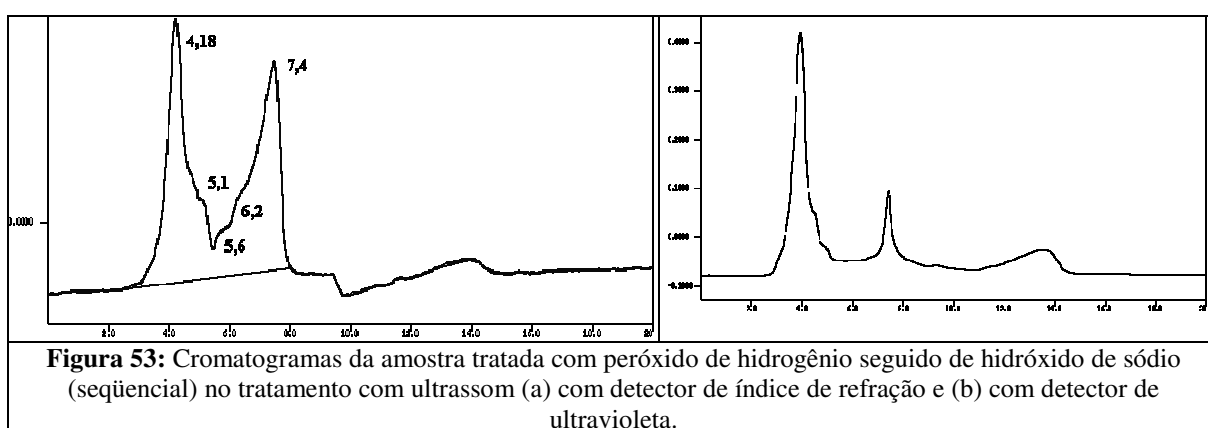
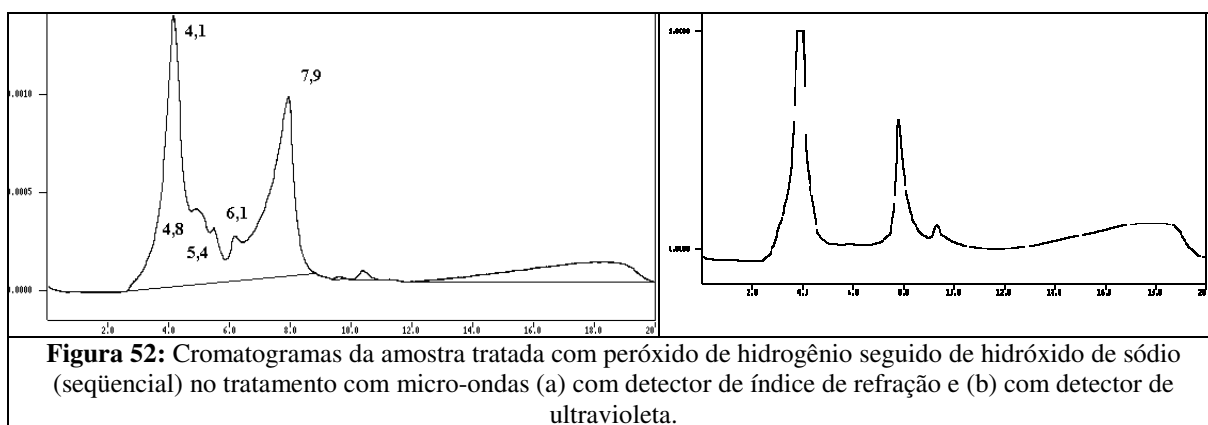
Com o uso do CaO associado as micro-ondas houve liberação de glicose e xilose (Figura 46) pela grande perda de massa da ordem de 45% ocorrida no pré-tratamento.

O tratamento com cloreto de cálcio não promoveu liberação de compostos com eluição dentro da faixa seguida na metodologia analítica embora se tenha obtido uma redução de 30,4% na massa da fibra com este pré-tratamento no micro-ondas (Figura 48 e 49).

Supõe-se que o entendimento para essa disparidade seja porque possivelmente os pré-tratamentos causem somente a desestruturação na fibra do bagaço de cana-de-açúcar devido à perda de massa obtida. O uso do iodeto de potássio não foi significativo segundo os cromatogramas, pois embora se tenha detectado um pico no detector de índice de refração, o mesmo pico foi encontrado no detector de ultravioleta demonstrando apenas presença de outros compostos podendo ser aromáticos ou fenólicos (Figura 50 e 51).



O tratamento sequencial com H₂O₂ seguido de NaOH promoveu somente liberação da celobiose, pelo tempo de retenção demonstrado nas Figura 52, para uso de micro-ondas e na Figura 53 para uso de ultrassom. A deslignificação da fibra ocorreu de forma efetiva, permitindo assim que a fração hemicelulósica fosse liberada liberando assim oligossacarídeos.



5.3. Análises Cromatográficas Quantitativas do Pré-tratado

Dentre todos os pré-tratamentos efetuados, somente os relacionados na Tabela 4 tiveram picos identificados com os padrões analíticos sendo quantificados pela avaliação cromatográfica de açúcares por HPLC-RI.

Pode-se observar que as duas amostras controle não indicaram liberação de monossacarídeos, confirmados com os resultados das análises por HPLC-RI; porém, houve perda de massa da ordem de 1,5 e 3% para ultrassom e micro-ondas, respectivamente. Esta perda de massa pode estar associada à solubilização de frações de polissacarídeos, principalmente xilana (LASER *et al.*, 2002), ou a deslignificação da fibra.

Tabela 4. Quantificação de Açúcares (mg/g) Liberados no Pré-tratamento.

Pré- Tratamentos	Glicose	Xilose	Celobiose	Açúcares Totais
<i>In natura</i>	-	-	-	-
Controle ^{us}	-	-	-	-
Controle ^{mo}	-	-	-	-
HCL ^{mo}	-	132,1	90,6	222,7
H ₂ SO ₄ ^{mo}	-	141,2	-	141,2
HNO ₃ ^{mo}	-	133,7	-	133,7
NaOH ^{mo}	-	254,9	-	254,9
Seqüencial ^{us}	-	-	86,0	86,0
Seqüencial ^{mo}	-	-	113,2	113,2
FeCl ₂ ^{mo}	-	84,8	92,73	177,5
Fe ₂ O ₃ ^{mo}	-	-	85,8	85,8
CaO ^{mo}	111,5	84,8	-	196,3

Pré-tratados resultantes de diversos pré-tratamentos com uso de micro-ondas e ultrassom com tempo de reação de 10 minutos. Resultados expressos em Mg/g : Mg de açúcar redutor e açúcar redutor total por grama de bagaço. (-) composto não identificado; (us) uso de ultrassom e (mo) uso de micro-ondas.

Os pré-tratamentos ácidos tiveram valores considerados altos, como o ácido clorídrico com 222,7mg/g de açúcares totais sendo, 132,1mg/g de xilose e 90,6mg/g de celobiose. De acordo com os resultados, o meio ácido favoreceu a hidrólise química parcial da fibra potencializada pela ação das altas temperaturas das micro-ondas que favoreceram a desestruturação liberando quantidades significativas de xilose, diferentemente dos pré-tratamentos ácidos com uso de ultrassom.

O pré-tratamento alcalino, comumente realizado para deslignificação de materiais lignocelulósicos (ADSUL *et al.*, 2005) resultou em liberação de 255mg/g de xilose e perda de massa de aproximadamente 18%, ou seja, primeiramente o pré-tratamento atuou na deslignificação e favoreceu a contínua ação do agente químico sobre a hemicelulose com liberação de quantidades significativas de xilose.

Já o tratamento seqüencial com H₂O_{2(aq)} seguido de NaOH_(aq.) proporcionou uma solubilização de 22% da massa da fibra, porém com a liberação de celobiose, no micro-ondas e no ultrassom, detectada por HPLC-RI, o que não é desejável, uma vez que a celobiose é um inibidor de β -glicosidades (LADISH *et al.*, 1983).

O uso de óxido de cálcio proporcionou uma perda de massa de 45,7% no micro-ondas, resultado este da mesma magnitude que os obtidos pelos ácidos minerais. Foi detectada a presença de glicose (111,5 mg/g) e também xilose (84,8 mg/g), totalizando 196,3 mg/g de açúcares totais. O processo de polpação com óxido de cálcio (FOELKEL; BARRICHELO, 1975) usado em resíduos agrícolas como palhas de cereais e bagaço de cana produz celulose

com tempo de cozimento de 2 horas à temperatura de 98°C. Uma vez que o CaO em meio aquoso produz Ca(OH)_2 , que em baixas concentrações não inibe o processo fermentativo, torna-se uma forma interessante para o processo de desestruturação das fibras destinadas à produção de etanol celulósico, porém, deve ser levado em conta a possibilidade de inibição enzimática pelos compostos gerados no pré-tratamento.

O FeCl_2 age como catalisador para o processo de degradação da lignina e pode favorecer a desagregação da fibra resultando em perda de massa 1,3% com uso de ultrassom, sem formação de açúcares e de 35,1% com uso do micro-ondas com liberação de açúcares como xilose e celobiose, pela possível deslignificação sofrida viabilizando a ação do agente químico para liberação dos açúcares encontrados.

O uso de óxido de ferro proporcionou liberação de 86 mg/g de celobiose, considerado um fator negativo pela alta inibição da β -glicosidase presente nos complexos enzimáticos. A deslignificação e ataque químico as fibras podem produzir outros compostos fenólicos inibidores da ação enzimática.

É importante salientar que independente da eficiência dos pré-tratamentos empregados ou do teor de açúcares obtidos, se ocorrerem formação de inibidores para a hidrólise enzimática ou posteriormente para a fermentação ou necessitem de etapas de purificação do hidrolisado, o processo será técnica e economicamente inviável (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996). Para verificar a viabilidade dos pré-tratamentos executados, os mesmos serão correlacionados com as eficiências ou inibições enzimáticas ocorridas durante a sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar.

5.4. Determinação das Atividades Enzimáticas dos Complexos NS50012 e NS50013

Foi observado que o complexo enzimático NS50012 encontra-se com bom perfil de atividade enzimática em pH na faixa de 3,3 – 5,5 e com temperatura entre 25 – 55°C. Para o complexo NS50013 temos pH de 4,5 – 6,5 e temperatura entre 45 – 60°C. Portanto, para uma eficiente hidrólise enzimática os ensaios foram efetuados com tampão em pH 5,0 e temperatura de 45°C em agitação constante. O perfil de atividade enzimática dos complexos empregados foi determinado pela quantificação de carboximetilcelulase, avicelase, β -glicosidase, xilanase, pectinase e lacase. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de produto por minuto.

As atividades enzimáticas foram expressas em U/ml. A Tabela 5 demonstra o perfil dos complexos enzimáticos NS50012 e NS50013.

Tabela 5. Perfil de atividades enzimáticas dos complexos NS50012 e NS50013 utilizados para hidrólise enzimática.

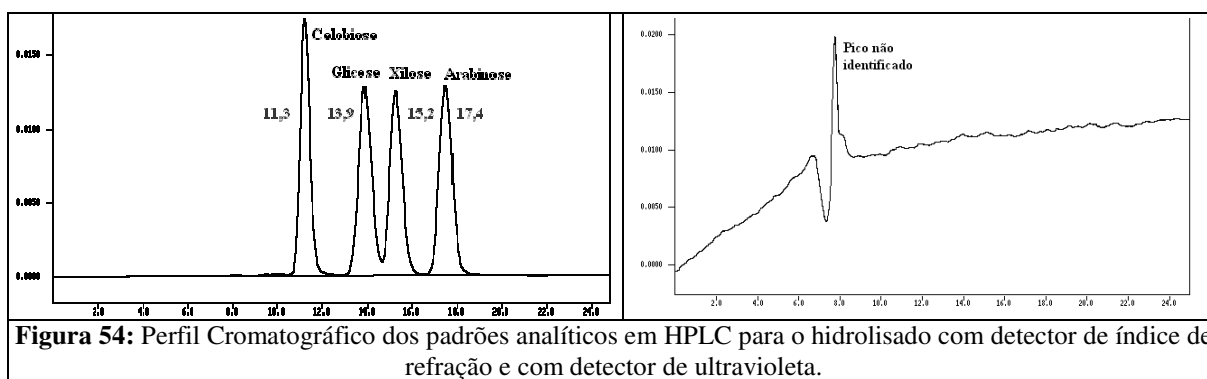
Atividades Enzimáticas	MultiComplexo NS50012 ((U/ml)	Complexo Celulolítico NS50013(U/ml)
Xilanase	18.783,07	1.135,45
Carboximetilcelulase	14.168,36	22.922,43
Avicelase	6.268,33	6.285,11
B- Glicosidase	122,30	300,84
Pectinase	703,02	197,75
Lacase	Ausente	Ausente

Para a utilização desses complexos enzimáticos na hidrólise da fibra foi feita a padronização em 300 U/ml de avicelase, sendo os extratos brutos diluídos em 20 vezes para posterior utilização. Após a determinação do perfil de atividades dos complexos enzimáticos, foi avaliada a sua aplicação na sacarificação de alíquotas de bagaço *in natura* e bagaços pré-tratados.

5.5. Ensaio Enzimático

Os hidrolisados foram obtidos a partir da ação enzimática sobre o bagaço de cana sem tratamento e pré-tratado. Como descrito no item 4.4., o material foi submetido à filtração e centrifugação para eliminação de partículas sólidas em suspensão e encaminhado para determinação de açúcares redutores totais pelo método Somogy-Nelson e identificação e quantificação de açúcares presentes com HPLC-RI. As análises foram realizadas em duplicata e correlacionadas com as curvas-padrão.

Na Figura 54 estão apresentados os cromatogramas do padrão de açúcares, utilizando detectores de índice de refração e ultravioleta.



5.5.1. Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais do Hidrolisado

A Tabela 6 apresenta os resultados da sacarificação com o multicomplexo enzimático NS50012. O teor de açúcares redutores e de açúcares redutores totais presentes nos complexos enzimáticos utilizados foram subtraídos nos cálculos, evitando-se assim falso positivo nos valores.

Tabela 6. Açúcares redutores e açúcares redutores totais resultantes da sacarificação enzimática do bagaço de cana (mg/g) com uso do multicomplexo enzimático NS50012.

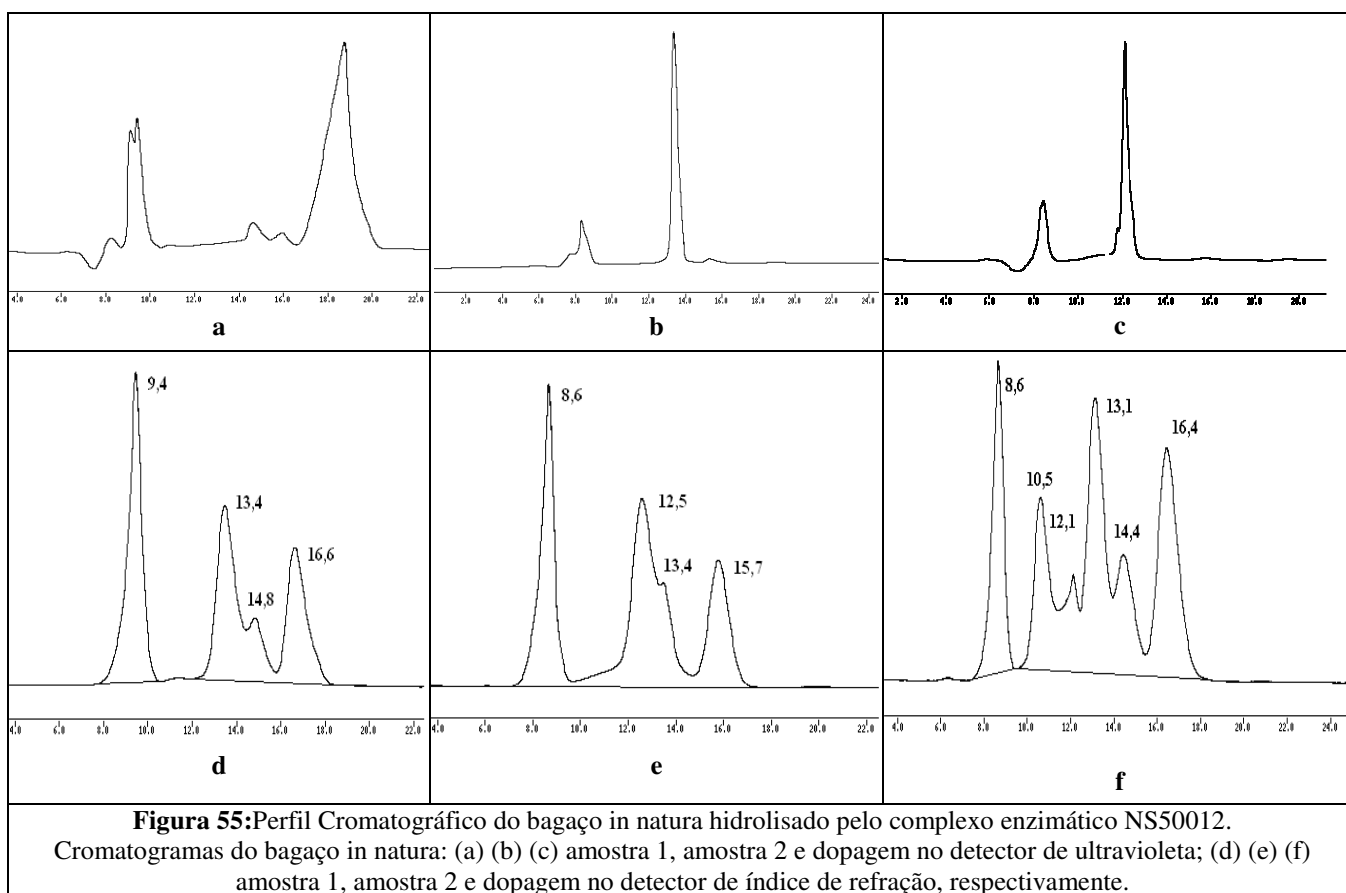
Hidrolisado - NS50012	Glicose	Xilose	Celobiose	Açúcares Redutores Totais
<i>In natura</i>	191,1	126,5	-	352,2
Controle ^{us}	213,7	-	-	313,0
Controle ^{mo}	259,2	-	-	266,1
HCl ^{us}	175,6	175,2	-	440,1
HCl ^{mo}	074,0	166,7	-	418,3
H ₂ SO ₄ ^{us}	189,2	189,8	-	389,1
H ₂ SO ₄ ^{mo}	200,6	192,6	-	388,1
HI ^{us}	108,3	122,0	-	455,3
HI ^{mo}	317,7	230,0	-	438,4
NHO ₃ ^{us}	363,9	-	-	423,7
HNO ₃ ^{mo}	108,3	122,0	-	392,2
NaOH ^{us}	262,0	127,6	-	325,7
NaOH ^{mo}	117,9	152,4	-	385,9
Sequencial ^{us}	384,5	-	-	463,3
Sequencial ^{mo}	317,0	-	-	412,5
NaOH + Met ^{us}	269,6	206,5	-	354,2
NaOH em Met ^{mo}	210,8	041,9	-	405,4
Fe ₂ O ₃ ^{us}	315,0	-	-	353,2
Fe ₂ O ₃ ^{mo}	110,7	-	-	409,5
FeCl ₂ ^{us}	275,8	044,8	-	458,3
FeCl ₂ ^{mo}	253,1	100,1	-	368,6
CaO ^{us}	150,9	234,2	-	491,8
CaO ^{mo}	112,5	214,0	-	557,0
CaCl ₂ ^{us}	321,7	-	-	421,6
CaCl ₂ ^{mo}	069,2	-	-	563,5
KI ^{us}	313,4	-	-	622,7
KI ^{mo}	244,1	-	-	643,8
NH ₄ SO ₄ ^{us}	112,3	015,2	-	524,3
NH ₄ SO ₄ ^{mo}	354,0	-	-	566,4
I ₂ em Etanol ^{us}	220,1	053,9	-	470,7
I ₂ em Etanol ^{mo}	318,3	-	-	538,9
I ₂ em Metanol ^{us}	416,8	-	-	543,9
I ₂ em Metanol ^{mo}	140,5	-	-	508,0
H ₂ O ₂ 10v ^{us}	037,8	016,3	-	513,6
H ₂ O ₂ 10v ^{mo}	325,2	013,0	-	465,4
H ₂ O ₂ 20v ^{us}	286,4	-	-	513,4
H ₂ O ₂ 20v ^{mo}	211,8	-	-	534,0
Enzima diluída	26,58	-	-	108,6

Hidrolisados obtidos após 24 horas de sacarificação: valores expressos em mg/g: mg de açúcar redutor ou açúcar redutor total por grama de bagaço de cana. (-) composto não identificado; (us) uso de ultrassom e (mo) uso de micro-ondas.

Os teores de açúcares obtidos na sacarificação do controle *in natura* comprovam a capacidade lignocelulolítica do complexo enzimático NS50012, que atuou tanto sobre a celulose liberando 191 mg_{glicose}/g_{bagaço}, quanto na hemicelulose liberando 126 mg_{xilose}/g_{bagaço}.

Era de fato esperado que o valor de ART superasse a soma dos teores de glicose e xilose, uma vez que no hidrolisado pode existir uma complexa mistura de carboidratos de ordem superior com terminações redutoras e que não foram detectados na análise cromatográfica, além de outras substâncias redutoras do meio que podem ser detectadas como falso positivo.

Encontra-se na Figura 55 os resultados cromatográficos em duplicata da amostra e a dopagem com mistura de padrões analíticos 0,3% para confirmação. A coluna cromatográfica empregada não permitiu a determinação da quantidade de celobiose presente nos hidrolisados.



A Tabela 7 apresenta valores referentes à sacarificação com o complexo celulolítico NS50013.

Tabela 7. Avaliação dos açúcares redutores e açúcares redutores totais (mg/g) resultantes da sacarificação enzimática do bagaço de cana com uso do complexo celulolítico NS50013.

Hidrolisado - NS50013	Glicose	Xilose	Celobiose	Açúcares Redutores Totais
<i>In natura</i>	138,1	-	-	227,5
Controle ^{us}	093,1	-	-	122,6
Controle ^{mo}	082,0	-	-	148,4
HCl ^{us}	137,3	-	-	214,7
HCl ^{mo}	215,2	-	-	305,8
H ₂ SO ₄ ^{us}	211,4	-	-	250,2
H ₂ SO ₄ ^{mo}	077,4	-	-	147,7
HI ^{us}	188,4	-	-	220,9
HI ^{mo}	222,3	-	-	260,6
NHO ₃ ^{us}	266,5	-	-	263,8
HNO ₃ ^{mo}	163,9	-	-	247,8
NaOH ^{us}	048,7	-	-	150,7
NaOH ^{mo}	059,6	-	-	224,0
Sequencial ^{us}	388,4	-	-	416,8
Sequencial ^{mo}	107,0	-	-	164,1
NaOH + Met ^{us}	262,3	-	-	314,7
NaOH + Met ^{mo}	343,2	-	-	477,7
Fe ₂ O ₃ ^{us}	076,6	-	-	153,7
Fe ₂ O ₃ ^{mo}	146,6	-	-	227,6
FeCl ₂ ^{us}	247,8	-	-	377,9
FeCl ₂ ^{mo}	306,4	-	-	360,6
CaO ^{us}	293,0	-	-	337,1
CaO ^{mo}	171,4	-	-	449,4
CaCl ₂ ^{us}	115,3	-	-	139,0
CaCl ₂ ^{mo}	233,2	-	-	221,4
KI ^{us}	121,2	-	-	161,9
KI ^{mo}	095,5	-	-	126,7
NH ₄ SO ₄ ^{us}	218,5	-	-	263,1
NH ₄ SO ₄ ^{mo}	124,4	-	-	154,0
I ₂ em Etanol ^{us}	086,4	-	-	107,5
I ₂ em Etanol ^{mo}	162,5	-	-	231,8
I ₂ em Metanol ^{us}	159,5	-	-	307,1
I ₂ em Metanol ^{mo}	182,5	-	-	234,6
H ₂ O ₂ 10v ^{us}	184,9	-	-	201,7
H ₂ O ₂ 10v ^{mo}	044,5	-	-	162,2
H ₂ O ₂ 20v ^{us}	181,6	-	-	166,6
H ₂ O ₂ 20v ^{mo}	177,6	-	-	250,3
Enzima diluída	08,08	-	-	115,6

Hidrolisados obtidos após 24 horas de sacarificação: valores expressos em mg/g: mg de açúcar redutor ou açúcar redutor total por grama de bagaço de cana. (-) composto não identificado; (u s) uso de ultrassom e (mo) uso de micro-ondas.

Observando-se a Tabela 7 verificou-se que com o complexo NS50013 houve liberação de glicose após hidrólise enzimática quantificada pelo HPLC-RI, provavelmente pela expressiva quantidade de celulasas presentes no extrato enzimático que atuaram sinergisticamente promovendo intensa degradação da fração celulósica da fibra, pois sabe-se que a avicelase ataca a celulose amorfa ao acaso, liberando fragmentos poliméricos menores, contribuindo portanto para a rápida diminuição da cadeia de celulose, a carboximetilcelulase atua na região amorfa da celulose liberando celooligossacarídeos à partir das extremidades não redutoras. A completa degradação da celulose, no entanto, é finalizada pela β -glicosidase que quebra celobiose e celooligossacarídeos, completando a degradação da celulose até glicose (GOMES, 2004).

Evidenciou-se que o complexo celulolítico NS50013 atuou de forma mais branda na sacarificação do bagaço, tendo uma capacidade de hidrólise menor, demonstrada pelos valores de ART inferiores aos encontrados para o complexo NS50012, podendo estar relacionado com o fato do complexo NS50012 ser um multicomplexo enzimático contendo celulasas, xilanases e hemicelulasas que em associação produzem uma melhor sacarificação do bagaço de cana. Fica claro que a ação sinérgica de diversas enzimas aumentam a eficiência global do processo hidrolítico (BEUKES *et al.*, 2008).

5.6. Avaliação da Interferência/Influência dos Diferentes Pré-Tratamentos na Sacarificação do Bagaço de Cana-de-açúcar.

Foi testada a influência dos diferentes pré-tratamentos frente à hidrólise enzimática após 24 horas de sacarificação. Os diferentes pré-tratamentos refletiram tanto positivo quanto negativamente na hidrólise enzimática.

Os controles demonstraram valores de ART menores que o bagaço *in natura*, nos dois complexos, porém foram observados maiores teores de glicose nos controles que no hidrolisado do bagaço *in natura* comprovando que o uso de ultrassom e micro-ondas podem auxiliar na desestruturação da fibra vegetal, criando condições do complexo enzimático atingir porções mais profundas na fibra e permitir maiores rendimentos em glicose.

A Figura 56 demonstra os cromatogramas do bagaço pré-tratado com ultrassom e hidrolisado pelo complexo enzimático NS50012 com presença de picos com áreas maiores no tempo de retenção da glicose quando comparados com os picos presentes nos cromatogramas do bagaço *in natura*.

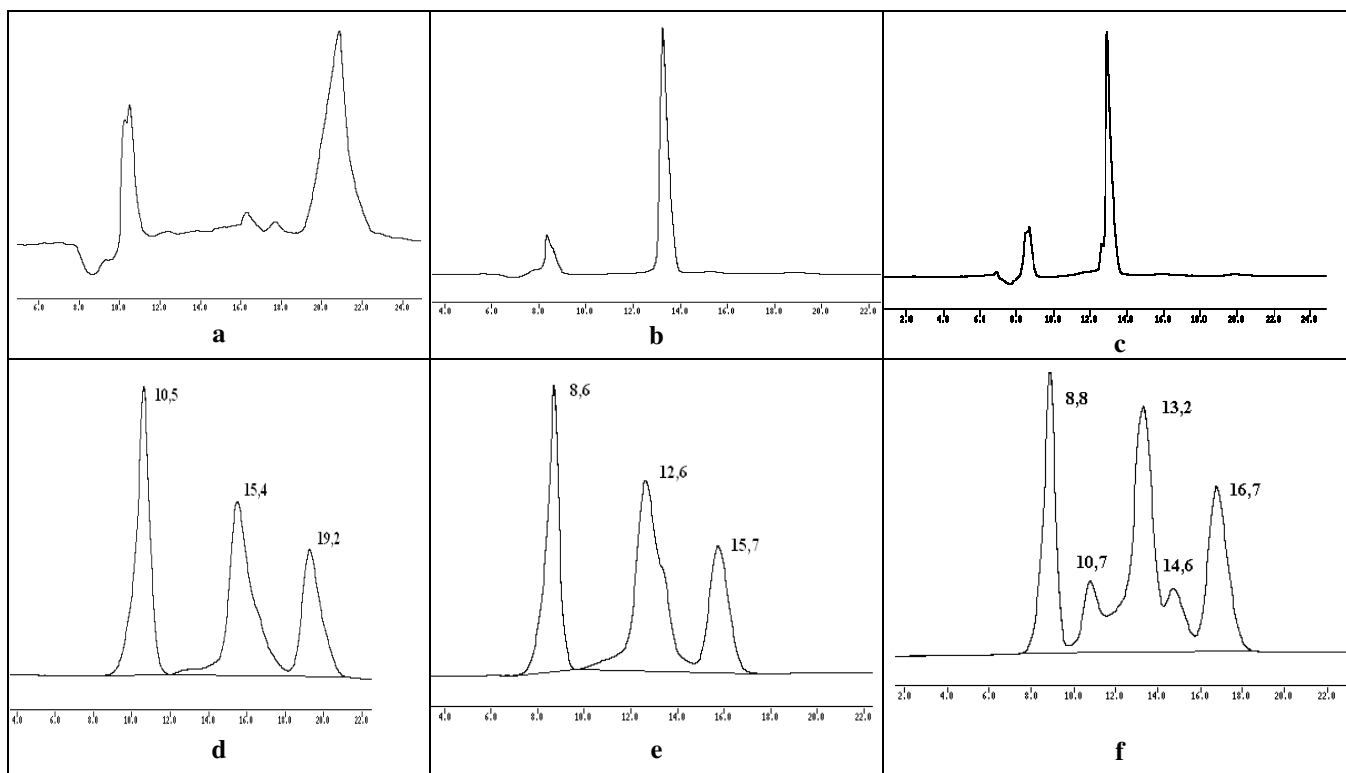


Figura 56: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com uso de Ultrassom hidrolisado pelo complexo enzimático NS50012.

Cromatogramas do bagaço pré-tratado com uso de Ultrassom: (a) (b) (c) amostra 1, amostra 2 e dopagem no detector de ultravioleta; (d) (e) (f) amostra 1, amostra 2 e dopagem no detector de índice de refração, respectivamente.

A interpretação dos efeitos dos pré-tratamentos sobre a ação enzimática é de alta complexidade, que pode ser constatada no caso do pré-tratamento com HCl em micro-ondas, que embora tenha sido provado sua alta capacidade de solubilização da fibra vegetal com perda de massa na ordem de 55,8%, apresentou 74 mg_{glicose}/g_{bagaço}, um dos menores teores de glicose obtido pela hidrólise enzimática com o complexo NS50012, sendo uma das possíveis explicações a liberação e/ou destruição dos carboidratos pela ação do ácido. Os teores de xilose foram significativos, na ordem de 166,7mg_{xilose}/g_{bagaço} demonstrando a ampla atuação do multicomplexo NS50012. Já com o complexo NS50013, que apresenta grande quantidade de celulasas, foi encontrado 215,2 mg_{glicose}/g_{bagaço}, demonstrando a especificidade deste complexo que aparentemente degradou a celulose desprendida no pré-tratamento, pois no pré-tratado foi quantificado apenas xilose e celobiose responsáveis pela liberação de 222,7 mg_{ART}/g_{bagaço}.

A grande quantidade de glicose liberada na sacarificação do bagaço de cana com o complexo NS50013 pode ser justificada pela maior quantidade de β -glicosidase existente no meio. Sabe-se que a β -glicosidase é responsável pelo controle da velocidade global da reação de hidrólise celulolítica, desempenhando assim, um efeito crucial na degradação enzimática da celulose, pois hidrolisa a celobiose que atua como inibidor enzimático (PARRY *et al.*,

2002; LEITE *et al.*, 2007) e por se apresentar em maior quantidade estas enzimas não sofreram significativa inibição como ocorrido com o multicomplexo NS50012.

Para o pré-tratamento com uso de ácido clorídrico no ultrassom, visto na Figura 57 verificou-se que não houve liberação de açúcares no pré-tratamento, mas foram coletados valores consideráveis de glicose na sacarificação sendo 175,6 mg_{glicose}/g_{bagaço} com o complexo NS50012 e 137,3 mg_{glicose}/g_{bagaço} com o complexo NS50013. Esta eficiência hidrolítica está relacionada com a desestruturação ocorrida na fibra vegetal durante o pré-tratamento, com perda de massa de 27%.

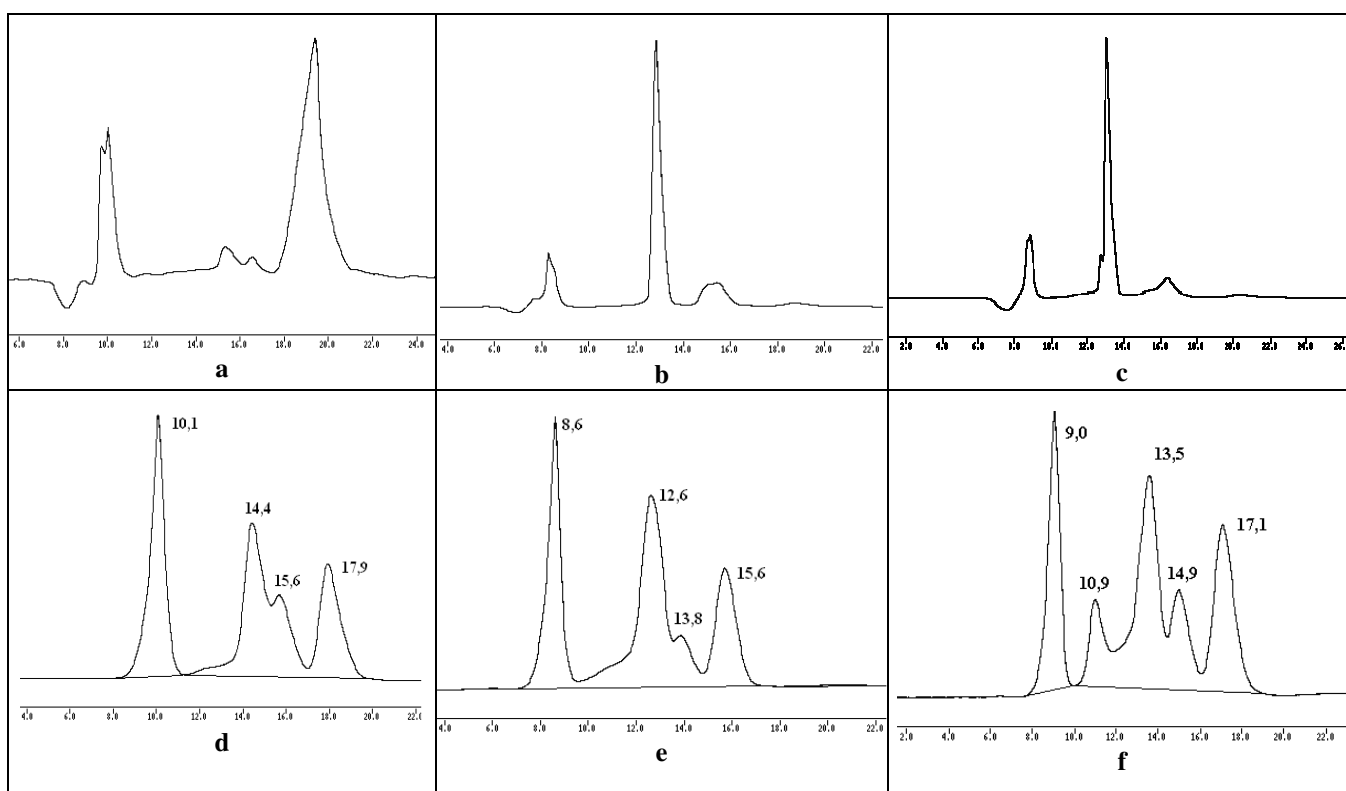


Figura 57: Perfil Cromatográfico do bagaço pré-tratado com HCl em ultrassom hidrolisado pelo complexo enzimático NS50012.

Cromatogramas do bagaço pré-tratado com HCl em Ultrassom: (a) (b) (c) amostra 1, amostra 2 e dopagem no detector de ultravioleta; (d) (e) (f) amostra 1, amostra 2 e dopagem no detector de índice de refração, respectivamente.

De forma geral, o uso de ácidos como pré-tratamento da fibra do bagaço resultaram em grandes perdas de massa, algumas favoráveis à atuação das enzimas outras extremamente inibitórias, como pode ser observado com o uso de HI e HNO₃ tanto em micro-ondas como em ultrassom, valores estes encontrados nas tabelas 6 e 7.

O uso de H₂SO₄ proporcionou valores superiores de ART na hidrólise usando o complexo NS50012, sendo liberados 189,2mg/g de glicose com uso de ultrassom e 200,0 mg/g de glicose com uso de microondas. Como comparação temos a hidrólise do farelo de trigo que foi submetido a processos de liquefação e sacarificação e foi observado que quando

submetida apenas à hidrólise enzimática, foram liberados 22,0g de açúcares redutores por 100g do sólido inicial, enquanto que a realização de um pré-tratamento em alta temperatura (170 °C) por 20 minutos associado com a hidrólise enzimática causou a liberação de 45,2g de açúcares redutores a partir de 100g do sólido inicial. A realização de hidrólise ácida com 1% de H₂SO₄ por 40 minutos a 130 °C provocou a liberação de 50,4g de açúcares redutores. Já a associação entre o pré-tratamento com 0,2% de H₂SO₄ por 20 minutos a 160 °C e hidrólise enzimática mostraram os melhores resultados, com liberação de 53,0g de açúcares redutores a partir de 100g do sólido inicial (PALMAROLA-ANDRADOS *et al.*, 2005).

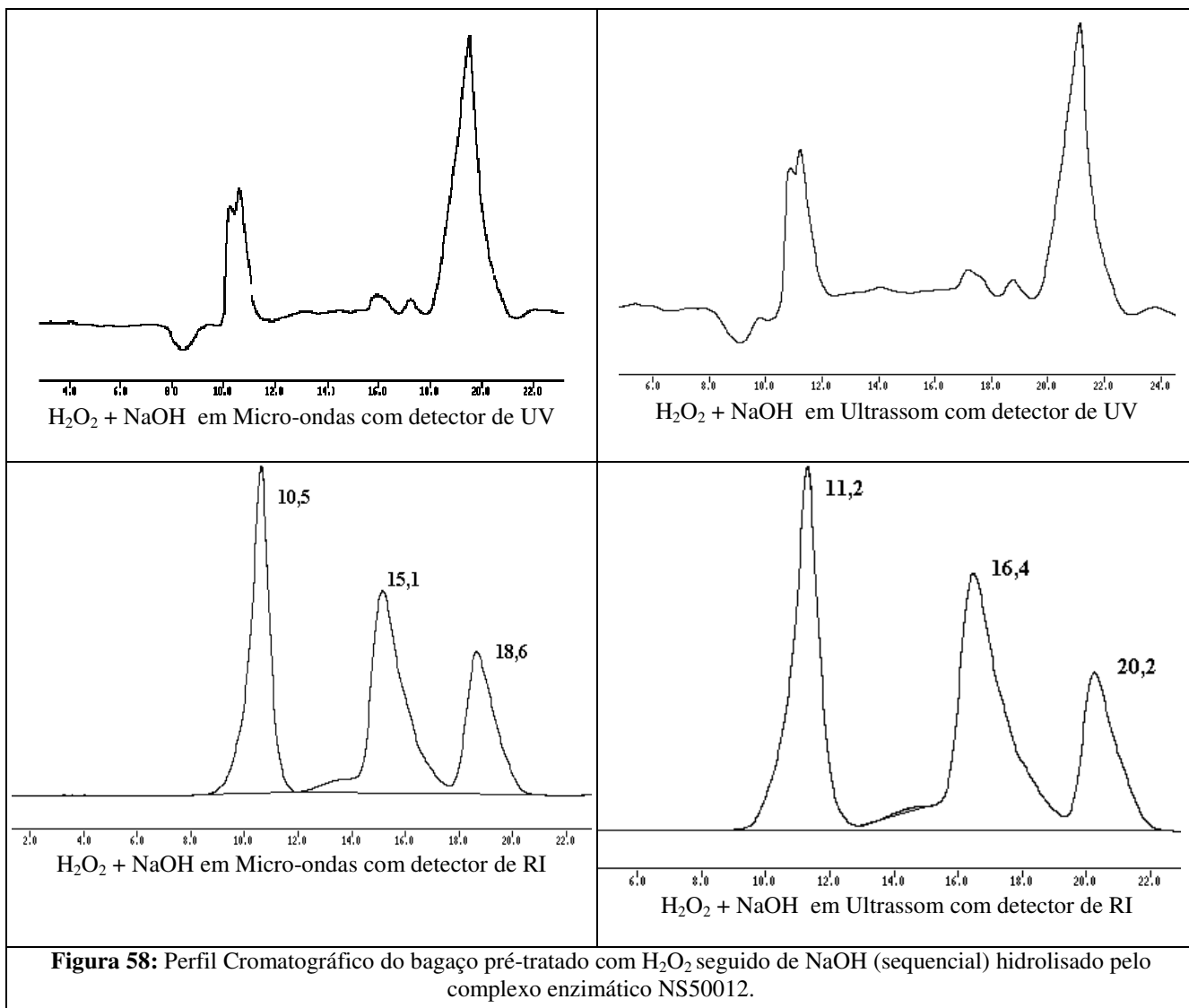
Segundo Pires; Reis e Carvalho (2006), foi comprovado a redução nos constituintes da parede celular com a adição de NaOH e o aumento na digestibilidade da matéria seca podendo aumentar a eficiência do ataque enzimático à fibra. Nas hidrólises enzimáticas, nas quais o bagaço foi tratado com NaOH, os valores de glicose obtidos com o uso de ultrassom para o multicomplexo NS50012 foram superiores, 262 mg_{glicose}/g_{bagaço}, àqueles gerados nos controles, 191,1 mg_{glicose}/g_{bagaço}, porém, o uso de NaOH com ultrassom para o complexo NS50013 apresentou valores baixos 48,7 mg_{glicose}/g_{bagaço}, provavelmente pelo NaOH ter causado grande deslignificação, comprovado pela ausência de açúcares no pré-tratado liberando a fração hemicelulósica da fibra. Devido ao complexo NS50013 ser celulolítico, pode ter ocorrido pequena atuação enzimática neste material pré-tratado.

O NaOH com o uso de micro-ondas para o complexo NS50012 apresentou valores menores (117,9 mg_{glicose}/g_{bagaço}) que o controle *in natura*, explicado pela liberação de compostos inibidores do processo hidrolítico devido à exposição da fibra ao aquecimento das micro-ondas. Baixos teores de glicose no hidrolisado com NaOH em micro-ondas e ultrassom em comparação ao hidrolisado *in natura* podem também ser observados na sacarificação com o complexo NS50013.

Este resultado é bastante significativo, pois confirma que o agente químico NaOH associado a processos físicos como micro-ondas causam desestruturação da fibra gerando fragmentos fenólicos de lignina que inibem não somente a fermentação alcoólica, mas também a própria hidrólise enzimática.

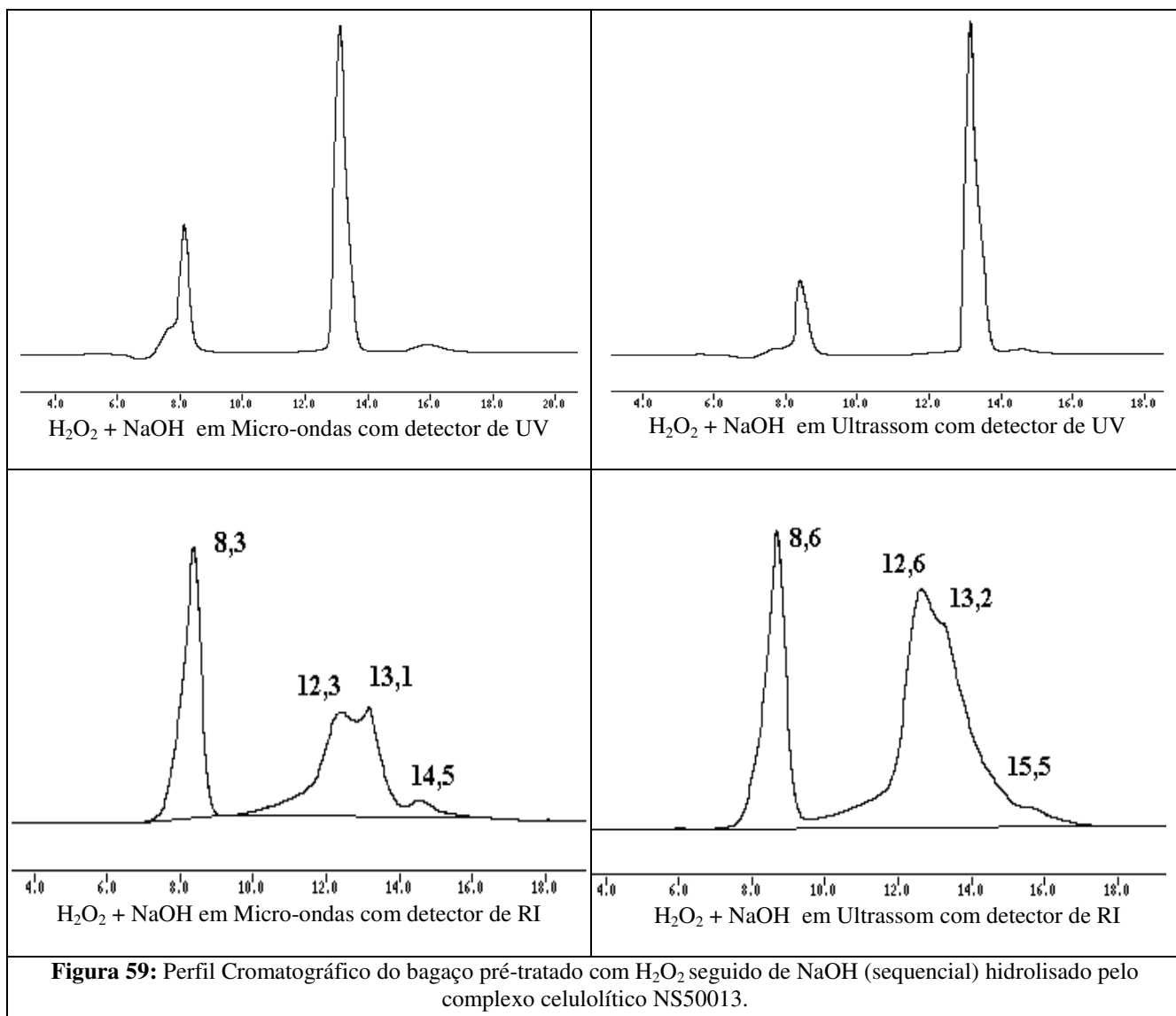
O maior teor de glicose produzido por hidrólise enzimática com o multicomplexo NS50012 foi obtido com o pré-tratamento usando iodo associado ao metanol em ultrassom com liberação de 416,8 mg_{glicose}/g_{bagaço}, seguido do pré-tratamento empregando NaOH seguido de H₂O₂ que demonstrou valores de glicose em 384,5 mg_{glicose}/g_{bagaço}. Seu perfil cromatográfico é demonstrado na Figura 58. Já com o uso das micro-ondas os valores para iodo com metanol foram de 317 mg_{glicose}/g_{bagaço} evidenciando que a melhoria na sacarificação

não tenha sido resultado somente dos pré-tratamentos físicos, e sim do uso do agente químico como potencializador da desestruturação da biomassa que permitiu um maior rendimento na hidrólise enzimática. Iodo com metanol em micro-ondas para o multicomplexo NS50012 apresentou valores relativamente inferiores ($140,5 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{bagaço}}$) aos obtidos com o uso do mesmo agente químico associado às micro-ondas.



Para o complexo NS50013, o uso de iodo com metanol gerou valores próximos ao controle *in natura* e com o uso do pré-tratamento sequencial demonstrou valores de $215,2 \text{ mg}_{\text{glicose}}/\text{g}_{\text{bagaço}}$ de glicose com micro-ondas (Figura 59), porém, valores menores que os obtidos com o multicomplexo enzimático NS50012. Constatou-se que o perfil do complexo enzimático influi diretamente na sacarificação, pois mantendo os mesmos pré-tratamentos e as mesmas condições são encontrados diferentes perfis de hidrólise. Fica evidente então a necessidade da ação sinérgica de várias enzimas, produzidas por microrganismos

diferentes, e o estudo de ação dos diferentes complexos enzimáticos com sua inibição ou favorecimento frente a certos compostos, pois assim as dificuldades e barreiras encontradas pelo complexo de um microrganismo são contornadas pela atividade de outro aumentando a eficiência global da hidrólise enzimática (BEUKES *et al.*, 2008).



Segundo Gould (U.S. Pat. N° 4,649,113; 1987), o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com peróxido alcalino dissolve a lignina e reduz bastante a cristalinidade da celulose, o que a torna mais susceptível ao ataque das enzimas na etapa de hidrólise. Além disso, causa menor degradação de açúcares do que nos processos ácidos (KIM; HOLTZAPPLE, 2005).

A atuação do peróxido de hidrogênio no pré-tratamento do hidrolisado com complexo NS50012 foi altamente eficiente, aumentando consideravelmente os valores de ART, tanto com uso de ultrassom como das micro-ondas, demonstrando o poder deslignificante do agente

químico. O aumento da concentração do H_2O_2 de 10 para 20 volumes com uso do micro-ondas teve efeito inibitório para a atuação enzimática, refletindo na obtenção de glicose, com perda de 34,9%, como observado na Tabela 6.

Para os hidrolisados do complexo NS50013, no pré-tratamento com H_2O_2 10V associado as micro-ondas observou-se à diminuição da eficiência hidrolítica resultando em 44,5mg de glicose e 162,2 mg/ART, valores estes muito próximos do hidrolisado in natura, como pode ser observado na Tabela 7. Os teores de glicose e ART com o uso do ultrassom apresentaram valores maiores que o controle in natura, porém são valores considerados médios se comparados com a eficiência do mesmo pré-tratamento com o multicomplexo NS50012.

O pré-tratamento com NaOH associado ao metanol apresentou valores de ART maiores com os dois complexos enzimáticos quando usado com micro-ondas, provavelmente pelo aquecimento e vaporização em refluxo do solvente, dando maior condição para a desestruturação da fibra. O uso de sulfato de amônio não foi um pré-tratamento com grandes liberações de glicose, porém, com o uso das micro-ondas a ação do complexo foi potencializada, principalmente com o uso do NS50012.

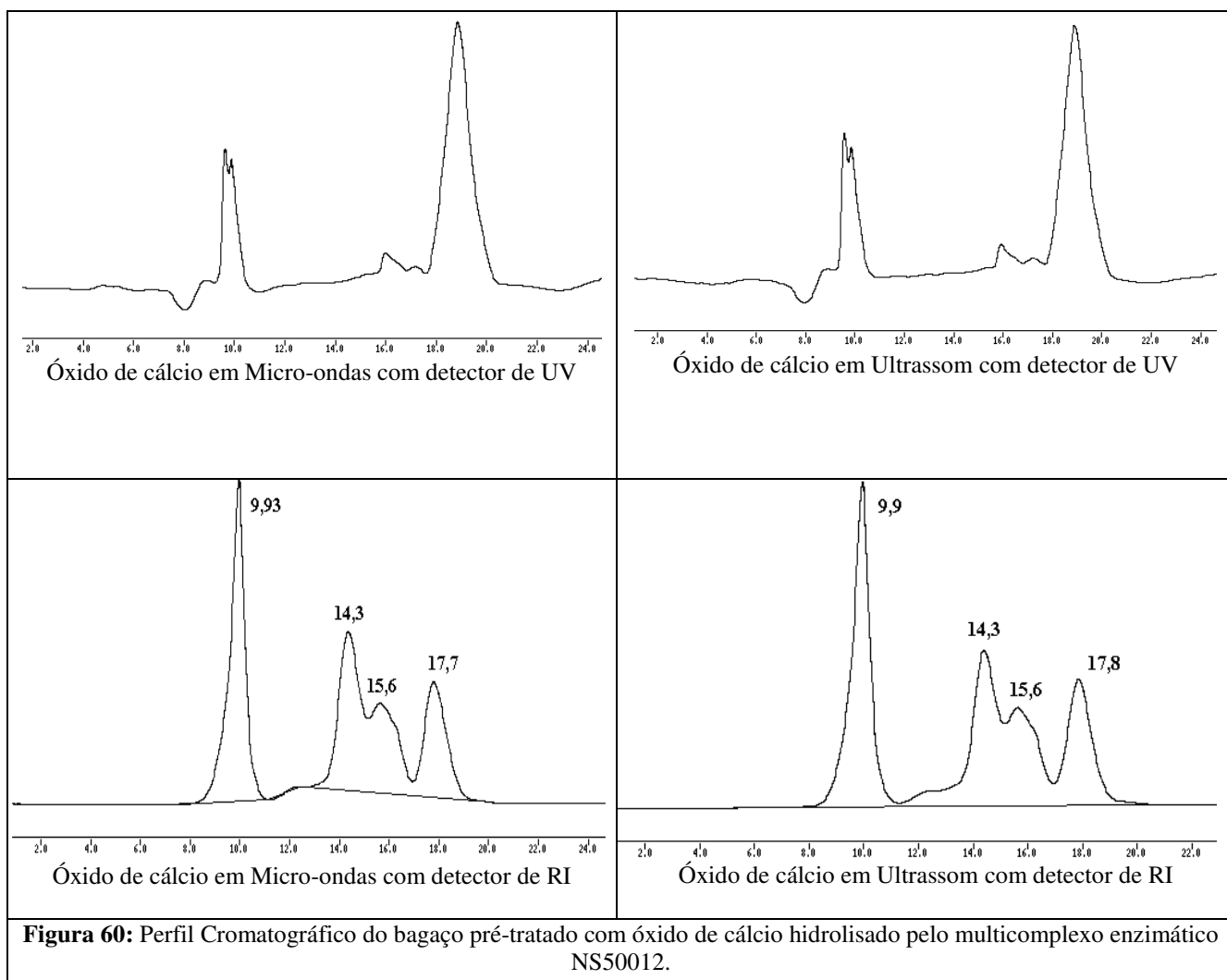
Valores de ART e teores de glicose considerados altos (tabelas 6 e 7) foram verificados com o pré-tratamento iodeto de potássio utilizando o complexo NS50012, no entanto, o mesmo comportamento hidrolítico não foi verificado com o complexo NS50013, demonstrando que cada complexo enzimático reage diferentemente aos compostos presentes no bagaço após o pré-tratamento.

O mesmo comportamento de inibição do complexo NS50013 foi verificado com o pré-tratamento iodo com etanol, em micro-ondas e ultrassom, demonstrando mais uma vez que o complexo NS50012 tem maior influência na sacarificação da fibra e menor taxa de inibição em relação aos pré-tratamentos estudados.

De acordo com Tokuyasu *et al.* (2008), o tratamento das fibras com cloreto de cálcio promove um aumento da área superficial potencializando a sacarificação enzimática da celulose, podendo ser confirmado com o aumento dos valores de ART na hidrólise enzimática quando comparados com o controle *in natura*. Os resultados de ART estão descritos na Tabela 6 para o multicomplexo NS50012 e na Tabela 7 para o complexo NS50013.

O uso de CaO proporciona deslignificação das fibras podendo produzir compostos fenólicos inibidores da ação enzimática, como foi de fato caracterizado pelo baixo teor de glicose (112,5 mg_{glicose}/g_{bagaço}) obtido com a enzima NS50012, sendo que a hidrólise do bagaço tratado em ultrassom rendeu 150,9 mg_{glicose}/g_{bagaço}, ou seja valores inferiores aos

obtidos com o bagaço *in natura*, conforme Figura 60.



O efeito negativo de algumas substâncias sobre a atividade enzimática, principalmente da β -glicosidase foi investigado e verificou-se que ampla faixa de enzimas foram fortemente inibidas pelo Hg^{2+} , Ag^{+} , Cu^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} tiveram suas atividades enzimáticas diminuídas na presença destas substâncias (PALMA-FERNANDEZ,2002). Como já discutido anteriormente, o uso de CaO mostrou-se eficiente como pré-tratamento, liberando grandes quantidades de ART, porém, quando quantificados por HPLC-RI observamos que ocorreu diminuição dos teores de glicose em relação ao controle *in natura*, no uso do micro-ondas e do ultrassom. Esse fato pode ser explicado pela forte inibição da β -glicosidase causada pela presença de metais nos pré-tratamentos.

O FeCl_2 age como catalisador para o processo de degradação da lignina e quando associado ao ultrassom e microondas pode favorecer a desagregação da fibra viabilizando a atividade do complexo enzimático NS50012 que, após a hidrólise, apresentou teores de

glicose consideráveis, sendo 275,8 mg_{glicose}/g_{bagaço} no ultrassom e 253,1 mg_{glicose}/g_{bagaço} no micro-ondas. Na sacarificação do bagaço de cana com o complexo NS50013 também foram observados teores de glicose satisfatórios sendo 306,4 mg_{glicose}/g_{bagaço} em micro-ondas e 247,8 mg_{glicose}/g_{bagaço} em ultrassom. Este processo poderá ser considerado como alvo para novos estudos pela eficiência demonstrada, possibilitando condições para novas pesquisas com diferentes concentrações do agente químico e tempos de exposição da fibra.

6 CONCLUSÃO

Foi constatado que ao submeter-se às fibras do bagaço de cana-de-açúcar aos pré-tratamentos ocorreu algum tipo de alteração gerando compostos desconhecidos, quando detectados no ultravioleta, podendo ser aromáticos ou fenólicos oriundos da provável deslignificação ou detectados no índice de refração, podendo ser açúcares redutores desprendidos durante o pré- tratamento.

Com relação ao estudo da perda de massa e os ensaios cromatográficos pode-se concluir que os tratamentos ácidos com micro-ondas foram extremamente efetivos na perda de massa e na desestruturação da fibra com liberação de açúcares como glicose e xilose, detectados por HPLC-RI, devido a altas temperaturas no meio acidificado, diferentemente dos pré-tratamentos com uso de ultrassom que demonstraram ter menor efetividade.

Fica evidente que uso de ultrassom e micro-ondas como pré-tratamentos, utilizados de forma isolada, não favorecem a hidrólise enzimática, justificado pela diminuição nos teores de ART em relação à hidrólise do bagaço *in natura*. Já quando se associa esses métodos físicos com uso de agentes químicos, o pré-tratamento exerce grande participação na desestruturação do bagaço de cana-de-açúcar, trazendo possíveis melhorias ou inibições para a sacarificação enzimática, de acordo com a ação de cada agente químico.

Em função dos dados obtidos, embora se constate que alguns tratamentos tenham proporcionado grandes variações de massas, por outro lado, os cromatogramas não apresentaram picos condizentes com os padrões analíticos testados, podendo assim inferir que os pré-tratamentos tenham atuação no processo de deslignificação da fibra ou uma hidrólise parcial do bagaço esteja produzindo oligossacarídeos, os quais não puderam ser analisados pela metodologia empregada. Foram determinados por HPLC-RI a liberação de açúcares como glicose, xilose e celobiose, sendo estes liberados após pré-tratamento com HCL, H₂SO₄, HNO₃, NaOH; Fe₂O₃ e CaO com uso de micro-ondas e pré-tratamento sequencial com uso de ultrassom e com às micro-ondas resultando em liberação de celobiose, considerado um fator negativo pela alta inibição da β -glicosidase presente nos complexos enzimáticos.

A eficiência do pré-tratamento e os teores de açúcares obtidos somente serão viáveis se não ocorrerem formação de inibidores para a hidrólise enzimática ou posteriormente para a fermentação. Os bagaços tratados foram submetidos à ação de complexos enzimáticos fornecidos pela empresa Novozymes para verificação da influência dos tratamentos efetuados sobre a ação destas enzimas no processo de despolimerização das fibras do bagaço de cana de açúcar e pode-se observar claramente que o complexo celulolítico NS50013 atuou de forma

mais branda na sacarificação do bagaço, tendo uma capacidade de hidrólise menor, demonstrada pelos valores de ART inferiores aos encontrados para o complexo NS50012, podendo estar relacionado com o fato do complexo NS50012 ser um multicomplexo enzimático contendo celulasas, xilanases e hemicelulasas que em associação produzem uma melhor sacarificação do bagaço de cana.

Na hidrólise enzimática com o multicomplexo NS50012, os maiores teores de glicose foram obtidos com o pré-tratamento iodo associado ao metanol no ultrassom, seguido do pré-tratamento empregando H_2O_2 seguido de NaOH. Já com o uso das micro-ondas, com o mesmo complexo, os valores evidenciaram que a eficiência na sacarificação tenha sido resultado do uso do agente químico, que com as micro-ondas formaram compostos inibidores o acarretaram menor rendimento na hidrólise enzimática. Para o complexo NS50013 o pré-tratamento sequencial também foi eficaz dando condições para a atuação enzimática e liberação de considerável quantidade de glicose.

Dentre todos os pré-tratamentos testados destacaram-se o HCl, o CaO e o sequencial, pelas altas perdas de massa apresentadas, tanto com uso de micro-ondas como com ultrassom. Com o uso do HCl, grandes quantidades de açúcares redutores totais foram liberados no pré-tratamento e possivelmente ocorreu a formação de compostos inibidores devido a hidrólise parcial ácida prejudicando assim a sacarificação, fato observado na atuação dos dois complexos enzimáticos.

Com o uso de ultrassom associado ao CaO não houve liberação de açúcares durante o pré-tratamento, no entanto, na hidrólise foram obtidos valores satisfatórios de glicose e de ART demonstrando a desestruturação na fibra causada pelo agente químico. Já com o uso das micro-ondas os valores de ART também foram maiores que aos valores do hidrolisado *in natura*, porém, houve pequena liberação de glicose, devido à formação de compostos inibidores gerados pela carga térmica da radiação associada ao óxido. A ocorrência de maior teor de glicose no pré-tratamento foi vista com uso de CaO em ultrassom, tanto com a utilização do complexo NS50012 como o uso do complexo celulolítico NS50013. Comportamento similar ao do pré-tratamento com CaO em micro-ondas ocorreu com o complexo NS50013 no pré-tratamento sequencial em micro-ondas, que apesar de elevadas perdas de massa, resultou em baixo rendimento hidrolítico.

O pré-tratamento sequencial com o uso de ultrassom mostrou-se muito promissor para ambos os complexos enzimáticos, no entanto, com menor potencialidade para o complexo NS50013, devido à especificidade do mesmo. Os valores de ART foram relativamente altos em relação ao hidrolisado *in natura*, sendo na sua totalidade teores de glicose demonstrando a

eficiência hidrolítica deste pré-tratamento e possibilidade de substrato para a fermentação alcoólica com uso de *Sacharomyces cerevisiae*, não necessitando de leveduras altamente específicas.

Fica evidente que a ação sinérgica de diversas enzimas aumentam a eficiência global do processo hidrolítico, porém, cada pré-tratamento responde diferentemente a alteração do complexo enzimático utilizado. Com o estudo detalhado sobre a efetividade dos pré-tratamentos e sua relação com o uso de complexos enzimáticos resistentes, acredita-se que essas informações possam ser utilizadas na otimização da hidrólise enzimática e consequentemente na produção de etanol através de materiais lignocelulósicos disponíveis atualmente como resíduos agroindustriais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADSUL, M. G.; GHULE, J. E.; SHAIKH, H.; SINGH, R.; BASTAWDE, K. B.; GOKHALE, D. V.; VARMA, A.J. Enzymatic hydrolysis of delignified bagasse polysaccharides. **Carboh. Polym.**,v. 62, p. 6-10, 2005.

AGUILAR, R.; RAMIREZ, J.A; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**,v.55,p.309-318,2002.

AMER, G. I.; DREW, S. W. in TSAO, G. T. Microbiology of lignin degradation. **Annual Reports on Fermentation Processes**. v. 4, cap.3, p. 67-103, 1980.

AMJED, M; JUNG, H. G.; DONKER, J. D. Effect of Alkaline Hydrogen Peroxide Treatment on Cell Wall Composition and Digestion Kinetics of Sugarcane Residues and Wheat Straw, **J. Anim. Sci.**, Vol. 70, pp. 2877-2884, 1992.

AMORIM, H.V., BASSO, L.C., LOPES, M.L. Evolution of ethanol production in Brazil, in distilled spirits – Tradition and Innovation, ed. Bryce, J. H. e Stewart, G.G., **Nottingham Univ. Press** (UK), v.1, n.1, p.143-148, 2004.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p.89-105, 2007.

BRANDAO, E. M. ; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros**. 1999, vol.9, n.3, pp. 38-44. ISSN 0104-1428.

BAUER, W. D., TALMADGE, K.W., KEEGSTRA, K., ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls II. The hemicellulose of the walls of suspension cultured sycamore cells. **Plant Physiol.**, v.51, p. 174-187, 1973.

BEG, Q. K., KAPOOR, M., MAHAJAN, L., HOONDAL, G.S. Microbial Xylanases and their applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, n. 3 / 4, p. 326-338, 2001.

BEUKES, N.; CHAN, H.; DOI, R., H.; PLETSCHE. Synergistic associations between *Clostridium cellulovorans* enzymes XynA, ManA and EngE against sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 492–498, 2008.

BIELY, P. Microbial xylanolytic systems. **Trends Biotechnol.**, v.46, p. 286-290, 1985.

BOCCHINI, D. A. Estudo da produção, indução e purificação da xilanase termoestável de *Bacillus* D1. **Dissertação (Doutor em Biotecnologia)** – Instituto de Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2004.

BOTHAST, R. J.; SAHA, B. C. Ethanol production from agricultural biomass substrates. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.4, p. 261-286, 1997.

BOURBONNAIS, R., PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochemistry Journal**, v.255, p.445-450, 1988.

CADDICK, S. Microwave assisted organic reactions. **School of Chemistry and Molecular Sciences**. v.51, E. 38, P.10403-10432, 1995.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Tradução de H. B. Fenema *et al.* Porto Alegre: Artmed, 751 p. 2000.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; GIULIETTI, M. Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol. 47º CBQ. Natal. RN. 17 de setembro de 2007. Disponível em: www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos.htm.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**, Ed. Elsevier Academic Press, ed.2, 588 f., 2001.

CHEFTEL, J. C.; CHEFTEL, H. **Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos**. Editorial Acribia Zaragoza, Espanha, v.1, 333 p, 1992.

CMADS. **Comissão de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável**. Disponível em: <http://www2.camara.gov.br/internet/comissoes/permanentes/cmads>. Acesso em: 08.06.2008.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology reviews**, v.29, p.3-23, 2005.

COLLMER, A.; RIED, J. L.; MOUNT, M. S. Assay Methods for pectic enzymes. **Methods Enzymol**, v.161, par 13, p. 329-335, 1988.

COUGHLAN, M. P. **Towards understanding of the mechanism of action of main chain cleaving xylanases**. In VISSER, J. Xylans and Xylanases. Amsterdam: Elsevier, 1992.

COUGHLAN, M. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Gen. Engin. Rev.**, v.3, p. 39-109,1985.

DA SILVA, R.; FRANCO, C. M. L., GOMES, E. Pectinases, hemicelulasese celulasas – ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: **Revisão. Bol. Soc. Brás. Ci. Tecnol. Alimentos**. 31, 249-260,1997.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on teh nol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobillis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 19, p. 220-225,1996.

DEMIRBAS, A. Aqueos glycerol delignification of wood chips and ground wood. **Bioresource Technology**, Britain, v. 63, p. 179-185,1998.

DIEN, B.S., LI, X.L., ITEN, L.B., JORDAN, D.B., NICHOLS, N.N., O'BRYAN, P.J., COTTA, M.A. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. **Enzyme and Microbial Technology**. Elsevier. United States. v.39, p. 1137-1144, February, 2006.

FAN, L. T., LEE, Y. H, GHARPURAY, M. M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis, **Adv. Biochem. Eng.** 23, 157-187, 1982.

FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan degrading enzyme system. **Bras. J. Med. Res.**, v.27, p.1093 – 1190, 1994.

FOCHER, B., MARZETTI, A., CRESCENZI, V. **Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications**, Gordon and Breach, Reading, UK. 413 p. ,1988.

FOELKEL, C. E.B.; BARRICHELO, L.E.G. *Tecnologia de celulose e papel*, Esalq, Piracicaba, 1975.

GARCA.P.M, CHAALA. A., ROY C. Vacuum pyrolysis of sugarcane bagasse. **Journal of Analytical and applied pyrolysis**, v.65, p.111-136, 2002.

GLAZER, A. N., NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. New York: W.H. Freeman and Company, p. 328-329, 1994.

GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification, **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, 1, pp. 46-52, 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues, **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, 3, pp. 225-231, 1985.

GOULD; J. M. Alkaline peroxide treatment of nonwoody lignocellulosics. **Int. Cl. C 13K1/02. U.S., PI 4,649,113**. March 10, 1987.

GOMES, E. Produção de enzimas despolimerizantes de material vegetal com aplicação industrial. (Tese para concurso de livre-docência) – Universidade estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. São José do Rio Preto: [s.n], 2004.

GOMES, E. ; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N. ; SILVA, R. D. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quím. Nova*, vol.30, n.1, pp. 136-145,2007.

GOMES, E.; SILVA, R. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, Ed. Legis Summa,cap.10, p.349-379, 2004.

HONGZHANG; F. Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Chemical metallurgy, **Chinese Academy of Sciences**, Beijing 100080, China.Agosto,2006

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

KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. I. Production of cellulose and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Biores. Technol.** v. 91, 153-156.

KARIMI, K., EMTIAZI, G., TAHERZADEH M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. Elsevier. Sweden. v.40, p. 138-144, 2006.

KASHYAP, D. R.; VOHRA, P. K.; CHOPRA, S.; TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Bioresource technology**, v.77, p.215-227, 2001.

KENNEDY, J.F., WHITE, C. A. The plant, algal and microbial polyssacharides. In KENNEDY J. F., **Carboydrate Chemistry**. Oxford: Clarendon Press, p. 220-262, 1988.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover, **Bioresource technology**, vol. 96, n° 18, pp.1994-2006, 2005.

KRISHNA, S. H.; PRASANTHI, K.; CHOWDARY, G. V.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol, **Process Biochemistry**, 33, 825-830, 1998.

KRISHNA, S.H.; REDDY,T.J.; CHOWDARY, G.V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to etanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource Tecnology**, Amsterdam, v.77, p. 193-196, 2001.

KURAKAKE, M.; KISAKA, W.; KOMAKI, T. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.90, p.251-259, 2001.

LADISH, M.R.; LIN, K. W.; VOLOCH, M.; TSAO, G. T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. **Enzyme Microb. Technol.** 1983, 5, 82.

LASER,M.;SCHULMAN,D.;ALLEN,S.G.;LYND,L.R.A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.**Bioresour Tecnol.** v.81, p.33-34, 2002.

LEATHERS, T.D., Bioconversions of Maize Residues to Value-Added Coproducts using Yeast-Like Fungi, **FEMS Yeast Research**, 3, 133-140, 2003.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol, **Journal of Biotechnology**, 56, 1-24, 1997.

LEITE, R. S. R.; BOCCHINI, D. A.; MARTINS, E. S.; SILVA, D.; GOMES, E.; SILVA, R. Production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes from *Aureobasidium pullulans* on solid state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 281-288, 2007.

LEWANDOWICZ, G., JANKOWSKI, T., FORMAL, J. Effect of microwave radiation on physico-chemical properties and structure of cereal starches. **Carbohydrate Polymers**. Elsevier. Poland. v.42, p. 193-199, 2000.

LI, C., YOSHIMOTO M., TSUKUDA N., FUKUNAGA K., NAKAO, K. A kinetic study on enzymatic hydrolysis of a variety of pulps for its enhancement with continuous ultrasonic irradiation, *Biochemical Engineering Journal*, 19, 155-164, 2004.

MACEDO, I. Estado da Arte e Tendências das Tecnologias para Energia, Secretaria Técnica do CT Energ, 2003. Disponível em: http://www.finep.gov.br/fundos_setoriais/ct_energ/documentos/ct-energ03estado_arte.pdf

MACMILLAN, J. D.; SHEIMAN, M. I. **Pectic enzymes**. Advanced Chemical Series, v.136, p. 101-130, 1974.

MARTÍN C.; KLINKE H. B.; THOMSEN A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**. Elsevier. Cuba. v. 40 p. 426-432, 2006.

MARTIN, C. G.; JONSSON, L.J. Comparison of the fermentability hydrolysates of sugar cane bagasse pre-treated by steam explosion using different impregnation agents. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.98/100, p.669-716, 2002.

MARTINES, M.A.U; DAVOLOS, M.R; JUNIOR, M.J. O efeito da ultrassom em reações químicas. **Química Nova**. v. 23, p. 251 – 256, Araraquara, 1999.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, v.18, p. 193-215, 1979.

MCT. **Secretaria do Desenvolvimento Tecnológico e Inovação do Ministério da Ciência e Tecnologia**. Disponível em: http://www.mct.gov.br/upd_bld/0001/1594.pdf. Acesso em: 06.07.2008.

MOSIER, N., WYMAN, C., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y. Y., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, **Bioresource Technology** 96, 673-686, 2005.

MURTY, M.V.S., CHANDRA, T.S. Fermentability of hemicelluloses extracted from municipal waste and commercial xylans by *Clostridium sp.* **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.47, p.212-217, 1997.

NELSON, N.A. A photometric adaptation of the somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry**, Baltimore, v. 153, p. 375-380, 1944.

NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v.23, p. 113-132, 1972.

PALMA-FERNANDEZ, E. R. Produção, purificação e caracterização bioquímica de β -glicosidases do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* Miehe. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Microbiologia Aplicada, Rio Claro, 2002.

PALMAROLA-ANDRADOS, B.; CHOTĚBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, e. 7, p. 843-850, 2005.

PANDA, T.; SUSHMA, R. N.; KUMAR, M. P. Regulation of synthesis of pectinolytic enzymes of *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.34, p.466-473, 2004.

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

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

PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresour. Tecnol.**, v.66, p. 25-40, 1998.

PARRY, N.S.J.; BEEVER, D.E.; OWEN, E.; NERINCKX, W.; CLAEYSSSENS, M. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 404, p. 243–253, 2002.

PIFERRI, P.G.; BUSKA, G.; MANENTI, I.; LO PRETI, A.; SPAGNA, G. Immobilization of pectinesterase on γ -alumina for the treatment of juices. Belgian. **Journal Food Chemistry Biotechnology**, v.44, p. 173-182, 1989.

PIRES, J. V.; REIS, R. A.; CARVALHO, G. Bagaço de cana-de-açúcar tratado com hidróxido de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.953-957, 2006.

PRADE, R. A. Xylanases: from Biology to Biotechnology. **Biotechnol. Gen. Eng. Rev.**, v.13, p. 101-131, 1995.

PRIMO-YÚFERA, E.; GIL-TORTOSA, C. I.; GARCÍA-BREIJO, F.J. Hydrolysis of corn-cob lignocellulosic residue from pentose preparation. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.52, p. 1-4, 1995.

RAMOS, L.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. In: Seminário Nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais, 2000, São Paulo, SP. **Anais** (Cd-rom). São Paulo, SP: Cetesb, 2000.

RÉCZEY, K.; KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z. Simultaneous saccharification end fermentation (SSF) of industrial waste for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**, v.20, p.103-110, 2004.

RILEY, C., Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass, **AIChE Spring Conference**, 2002. (http://www.ott.doe.gov/biofuels/pdfs/renewable_fuel.pdf)

ROSSEL, C. E. V., LAHR FILHO, D., HILST, A. G. P., *et al.* Saccharification of Sugarcane Bagasse for Ethanol Production Using the Organosolv Process, **Proc. ISSCT**, vol 25, 2005.

SALIBA, S. O. E.; RODRIGUEZ, M.N.; MORAIS. L.A.S; VELOSO. P.D. Ligninas: Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p.917-928, 2001.

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

SASAZI, M., ADSCHIRI.T.,ARAI.K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. **Bioresource Tecnology**.v.86, p.301-304,2003.

SASSNER, P., GALBE, M., ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated Salix at high dry-matter content. **Enzyme and microbial technology**. Elsevier. Sweden. v.39, p. 756-762,2006.

SCHULZE, E. Information regarding chemical composition of plant cell membrane. **Ber. Dtsch. Chem. Ges.**, v.24, p.2277-2287, 1981.

SILVA, D. Estudo da produção de pectinases por *Penicillium viridicatum* RFC3 através de fermentação semi-sólida de resíduos agrícolas. **Dissertação (Mestrado)** – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, F.C.; FERREIRA, V. F; SOUZA, M.C.B.V. Adaptação de forno de micro-ondas doméstico para realização de reações de transesterificação sob refluxo e catálise por argilas. Departamento de química orgânica. Universidade Federal Fluminense.Niterói-RJ,2006

SOARES, M. M. C. N. Isolamento de linhagens microbianas produtoras de pectinases e caracterização das enzimas. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, junho, 1999.

SOMOGYI, M. **A new reagent for the determination of sugars.** Laboratory of the Jewish Hospital of St. Louis, 1945.

SREENATH, H. K. ;KOEGL, R. G.; MOLDES, A. B.; JEFFRIES, T. W.; STRAUB, R. J. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1199 – 1204, 2001.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN R. C.; SU, Y. Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195-204, 2004a.

SUN, J. X.; XU, F.; SUN, X.F.;WU, S.B. Comparative study of lignins from ultrasonic irradiated sugar-cane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, 2004b.

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

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.17, p.39-67, 1997.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n° 5/6 , 367-375, 1996.

TABKA, M.G., GIMBERT, I.H., MONOD, F., ASTHER, M., SIGOILLOT, J.C. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulose xylanase and

feruloyl esterase treatment. **Enzyme and Microbial Tecnology**. Elsevier. France. v.39, p. 897-902, 2006.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **In: Fisiologia Vegetal**, 5ª ed., Artmed, 720 p., 2003.

TECHAPUN, C., POOSARAN, N., WATANABE, M., SASAKI, K. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulose-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. **Process Biochem.**, v.38, n.9, p.1327-1340, 2003.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H.A.Optimizing peracetic acid pretreatment condictiones for improved simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse to ethanol fuel. **Renew Energy**, v.16, p.1070-1073, 1999.

TOKUYASU, K.; TABUSE, M.; MIYAMOTO, M.; MATSUKI, J. Pretreatment of microcrystalline cellulose flakes with CaCl_2 increases the surface area, and thus improves enzymatic saccharification. **Carbohydrate Research** v.343 p. 1232–1236,2008.

UENOJO, M., PASTORE, M. G. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.388-394, 2007.

UFFEN, R. L. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.19, p. 1-6, 1997.

UNICA, **União Nacional da Agroindústria Canavieira**. Disponível em: <http://www.unica.com.br>. Acesso em: 02 de novembro 2009.

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

WILKIE, K. C. B. The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v.36, p. 215-264, 1979.

WILLIAMS, A.G. **Hemicellulose utilization by microorganisms in the alimentary tract of ruminant and not-ruminant animals.** In: COUGHLAN, M. P. *Enzyme Systems for lignocellulose degradation.* London: Elsevier Applied Science, p. 183-219, 1989.

WYMAN, C. E., *Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities and Commercial Challenges*, **Annu. Rev. Energy Environ.**, 24, 189-226, 1999.

WONG, K. K. Y., TAN, L. U. L., SADDLER, J. N. Multiplicity of β -1,4 xylanases in microorganisms: functions and applications. **Microbiological Rev.**, v.52, p. 305-317, 1988.

WOOD, T. M., McCRAE, S. I. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma Konigii*. **J. Gen. Microbiol.**, v.128, p. 2973-2982, 1982.

WOOD, T.M., SADDLER. J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Meth. Enzymol.**, v.160, p. 3-11, 1988.

WOODWARD, J. Fungal and other β -D-glucosidases – their properties and applications. **Enz. Microb. Technol.**, v.4, p.73-79,1982.

XIN, Z.; YINBO, Q.; PEIJI, G. Acceleration of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with β -glucosidase. **Enz. Microb. Technol.**, v.15, p. 62-65,1993.

YU, E. K. C., TAN, L. U. L., CHAN, M. K. H. Production of thermostable xylanase by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.9, p. 16-24, 1987.

ZHU, S; WU, Y; YU, Z; ZHANG, X; LI, H; GAO, M. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource Technology.** v.97, p.1964-1968, 2006a.

ZHU,S.D; WU,Y.X.; YU,Z.; CHEN,Q.M.;WU,G;WANG,C,; JIN,S.Microwave-assisted alcali pre treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. **Bios. Enginee.** v.94, p. 1278- 1286, 2006b.

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

ANEXO 1

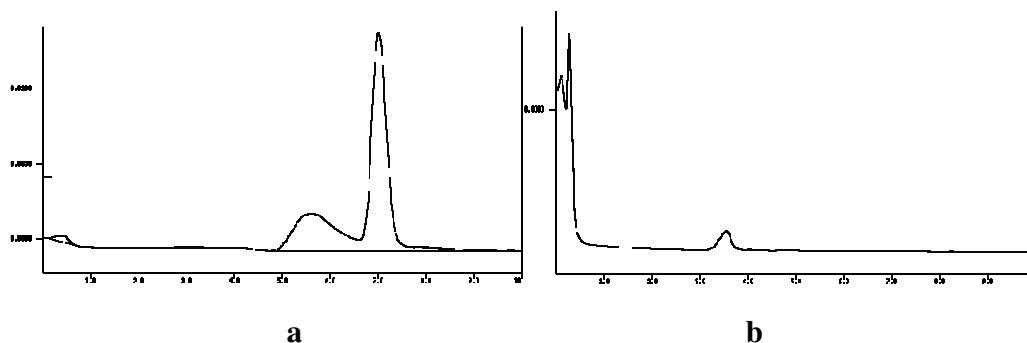


Figura A. Cromatogramas do padrão de glicose (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta do pré-tratamento.

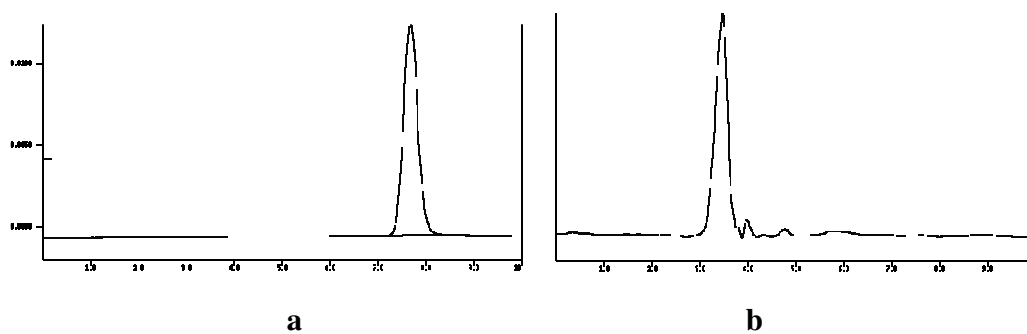


Figura B. Cromatogramas do padrão de xilose (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta do pré-tratamento.

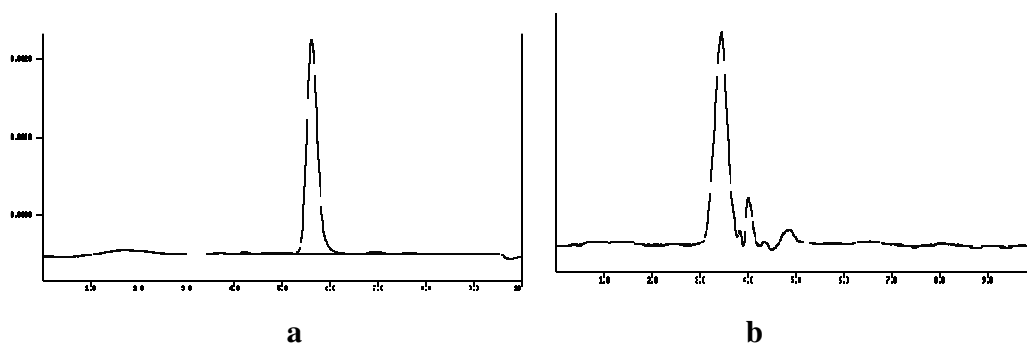


Figura C. Cromatogramas do padrão da celobiose (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta do pré-tratamento.

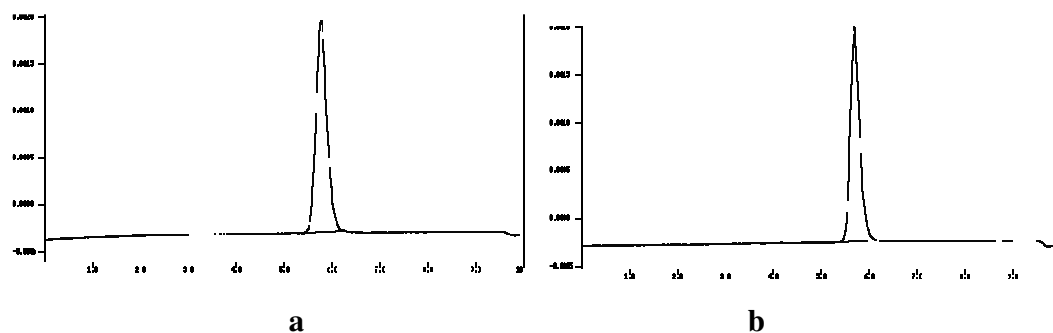


Figura D. Cromatogramas do padrão de maltose (a) e sacarose (b) com detector de índice de refração do pré-tratamento.

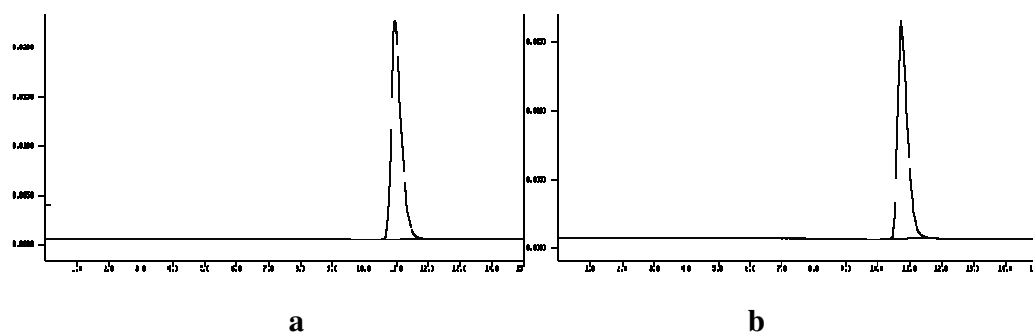


Figura E. Cromatogramas do padrão de etanol (a) com detector de índice de refração e padrão de metanol (b) com detector de índice de refração do pré-tratamento.

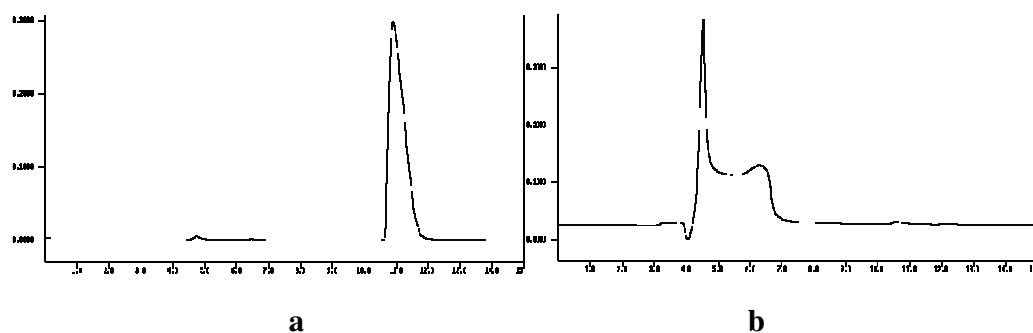


Figura F. Cromatogramas do padrão de iodo em metanol (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta do pré-tratamento.

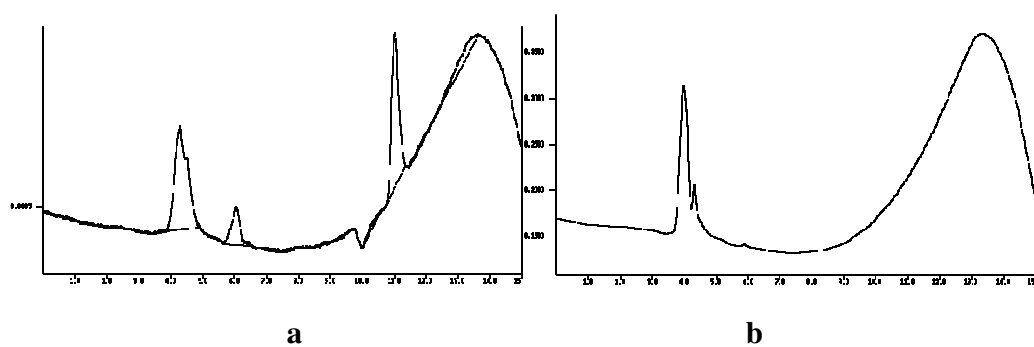


Figura G. Cromatogramas do padrão de NaOH em metanol (a) com detector de índice de refração e (b) com detector de ultravioleta do pré-tratamento.