



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E DESENVOLVIMENTO  
SUSTENTÁVEL**

**SÂMELA PARANAGUÁ VIEGAS VASCONCELOS**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA  
POSTERIOR OBTENÇÃO DE ÁLCOOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**VITÓRIA**

**2015**

**SÂMELA PARANAGUÁ VIEGAS VASCONCELOS**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA  
POSTERIOR OBTENÇÃO DE ÁLCOOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável.

Área de Concentração: Gestão Sustentável e Energia

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti

**VITÓRIA**

**2015**

**SÂMELA PARANAGUÁ VIEGAS VASCONCELOS**

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR PARA  
POSTERIOR OBTENÇÃO DE ÁLCOOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia e Desenvolvimento Sustentável.

Aprovada em

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientadora**

---

**Prof. Dr. Sérgio Túlio Cassini**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Examinador interno**

---

**Prof. Dr. Fernando Vicentini**  
**Centro Universitário Norte do Espírito**  
**Santo**  
**Examinador externo**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Aquele que eu adoro, exalto e glorifico todos os dias da minha vida por ter me sustentado me dando a força de Sansão, a sabedoria de Salomão, a coragem de Davi e a fé de Abraão. Eu O agradeço de todo coração, pois se cheguei até aqui toda honra, glória e louvor sejam dados a Ti.

Ao meu esposo Gimenes, pela enorme paciência, compreensão e amor. Por tantas vezes que deixei de viajar ou partilhar algo muito importante e mesmo triste você sempre me retribuiu um sorriso de incentivo. Você foi meu grande confidente, fez das minhas lágrimas o incentivo para o sucesso.

Aos meus pais, Abraão e Laudicéia, que superaram comigo cada batalha vivida, me dando força, ouvindo minhas lamentações e me encorajando quando eu mais precisava. Obrigada por acreditarem em mim. E também as minhas lindas avós, que oraram por mim sem cessar e que me dedicaram tanto amor e carinho.

À minha orientadora Laura M. Pinotti, pela confiança, orientação e ensinamentos. Agradeço a Deus por ter tido como orientadora alguém presente, capacitada, responsável e dedicada ao trabalho. Nesses dois anos tive ensinamentos que levarei para sempre.

Aos meus amigos Fernando, Cibele, Aline e Maria de Lourdes, por estarmos sempre compartilhando e ajudando um ao outro. E Claro, a minha enorme gratidão aos meus dois grandes amigos de trabalho e rotina, Juliano e Rogério. Deus colocou vocês no meu caminho, isso eu posso afirmar! Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprendi o que ensina (Cora Coralina).

A toda equipe do laboratório de processos biotecnológicos da CEUNES e do laboratório de Saneamento (LABSAN) da UFES, especialmente, ao professor Sérgio Túlio, pelo apoio e oportunidade.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização do meu projeto, os meus sinceros agradecimentos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

O etanol celulósico, também chamado de álcool de segunda geração, tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo em razão da escassez, da alta dos preços dos combustíveis fósseis e da poluição por eles causadas, tornando necessário investir no desenvolvimento de tecnologias de energias renováveis. Neste contexto de inovação, uma nova oportunidade de aproveitamento de biomassa lignocelulósica se conjectura, em especial na indústria da cana, para produção de etanol de 2ª geração. Mediante esse cenário, o objetivo do trabalho foi estudar a hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar para obtenção de açúcares fermentescíveis para posterior obtenção de álcool de segunda geração. Contudo, é preciso que se faça um pré-tratamento para reduzir a recalcitrância da biomassa *in natura* e tornar a celulose mais acessível ao ataque enzimático. Nesse trabalho foi realizado o tratamento com solução ácido e base e com peróxido de hidrogênio alcalino. Além do tratamento, também foram estudadas as variáveis de processos, como a concentração enzimática de 10, 15 e 20 FPU/g, o tempo de hidrólise de 6, 24 e 48h e temperatura de 40, 45 e 50°C, de acordo com um planejamento experimental do tipo 3<sup>3</sup> para amostras de bagaço de cana *in natura* e pré-tratadas com as duas diferentes metodologias. Após análise estatística foi possível verificar que o pré-tratamento do bagaço com ácido e base foi determinante na liberação das fibras e remoção da lignina, apresentando resposta em açúcar redutor total (ART) muito superior à apresentada na hidrólise para o bagaço *in natura* e no bagaço pré-tratado com peróxido. Ainda foi possível obter os valores que maximizam a produção de ART para o bagaço pré-tratado com ácido e base, os quais foram concentração enzimática de 20 FPU/g, tempo de 48h e temperatura de 50°C.

Palavras-chave: Hidrólise enzimática. Bagaço da cana-de-açúcar. Pré-tratamento.

## ABSTRACT

Cellulosic ethanol, also called second generation ethanol, has been considered an alternative to reduce environmental and energy problems in the world because of the shortage and high prices of fossil fuels and pollution caused by them, making it necessary to invest in developing renewable energy technologies. In this innovation context, a new use opportunity of lignocellulosic biomass is conjectured, especially in the sugarcane industry for second generation ethanol production. Under this scenario, the objective was to study the enzymatic hydrolysis of bagasse from sugarcane to obtain fermentable sugars for subsequent obtaining of second generation ethanol. However, it is necessary to make a pretreatment to reduce the recalcitrance of biomass *in natura* and make the cellulose more accessible to enzymatic attack. In this work the treatment was carried out with acid and base solution and alkaline hydrogen peroxide. Besides treatment were also studied the process variables such as enzyme concentration of 10, 15 and 20 FPU/g, the hydrolysis time of 6, 24 and 48 hours and a temperature of 40, 45 and 50°C according to an experimental design type 3<sup>3</sup> for sugarcane bagasse samples *in natura* and pretreated with two different methodologies. After statistical analysis it found that pretreatment of bagasse with acid and base was instrumental in the release of fibers and lignin removal, with response in total reducing sugar (ART) far superior to that presented in the hydrolysis for bagasse *in natura* and for bagasse pretreated with peroxide. Still it was possible to obtain values that maximize the production of ART to bagasse pretreated with acid and base, which were enzyme concentration of 20 FPU/g, 48 hours and 50°C.

Keywords: Enzymatic hydrolysis. Bagasse from sugarcane. Pretreatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Área plantada entre o ano de 2012 a 2014 (em mil.ha) .....	23
Figura 2 - Bagaço da cana-de-açúcar .....	25
Figura 3 - Estrutura Lignocelulósica e seus componentes .....	26
Figura 4 - Precusores da Lignina .....	27
Figura 5 - Estrutura de um fragmento de celulose .....	28
Figura 6 - Conversão do bagaço da cana em etanol.....	31
Figura 7 - Reação geral de hidrólise da celulose .....	38
Figura 8 - Representação da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose .....	39
Figura 9 - Fluxograma do processo de produção de açúcares redutores a partir da biomassa lignocelulósica.....	45
Figura 10 - Peneiras Tyler para ajuste da granulometria do resíduo fibroso .....	46
Figura 11 - (a) Bagaço pós-tratamento e seco; (b) Bagaço pré-tratado, porém úmido .....	47
Figura 12 - Sistema sob-refluxo para determinação da lignina .....	48
Figura 13 - Resíduo depois de lavado com água a 5°C .....	49
Figura 14 - (a) Holocelulose em atmosfera inerte pelo N <sub>2</sub> ; (b) Precipitação após três dias.....	50
Figura 15 - (a) Na respectiva ordem: hidrolisados com ácido/base, peróxido e <i>in natura</i> ; (b) Hidrolisados sendo filtrados .....	53
Figura 16 - Bagaço da cana-de-açúcar <i>in natura</i> - (a) Amostra para secagem; (b) Amostras sendo preparadas para o processo de secagem em estufa a 55°C.....	56
Figura 17 - Resposta do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio .....	57
Figura 18 - Pré-tratamento com ácido e base - (a) Tratamento com ácido sulfúrico; (b) Tratamento com hidróxido de sódio.....	58
Figura 19 - Resultado do pré-tratamento com ácido e base - (a) Bagaço seco e peneirado; (b) Bagaço após pré-tratamento, ainda úmido .....	59
Figura 20 - Caracterização química para o bagaço pré-tratado com ácido e base ...	59

Figura 21 - Caracterização química para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio.....	60
Figura 22 - Caracterização química para bagaço <i>in natura</i> .....	60
Figura 23 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana <i>in natura</i> .....	64
Figura 24 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço da cana <i>in natura</i> - (a) Normalidade dos ensaios experimentais; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independentes.....	66
Figura 25 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço <i>in natura</i> . Análises de ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo .....	67
Figura 26 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio.....	69
Figura 27 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço tratado com peróxido de hidrogênio - (a) Normalidade dos ensaios experimentais; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independente.....	71
Figura 28 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço pré-tratado com peróxido. Análise de ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo .....	72
Figura 29 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado com ácido e base.....	74
Figura 30 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço de cana tratado com ácido e base. (a) Normalidade dos ensaios; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independentes .....	75
Figura 31 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço pré-tratado com ácido e base. Análise ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo .....	76
Figura 32 - Comparação do efeito do pré-tratamento na formação de açúcares redutores totais com o tempo de hidrólise.....	78

Figura 33 - Comparação entre as respostas para diferentes amostras de bagaço e diferentes concentrações enzimáticas .....	79
Figura 34 - Representação gráfica dos meios marginais e limites de confiança para os tipos de tratamento.....	80
Figura 35 - Comparação do consumo total do bagaço da cana após 48 horas de hidrólise para as amostras do bagaço em estudo .....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perspectiva da produção de etanol .....	19
Tabela 2 - Oferta da biomassa da cana-de-açúcar (milhões de toneladas) .....	24
Tabela 3 - Composição física média do bagaço da cana-de-açúcar .....	24
Tabela 4 - Composição química dos resíduos agrícolas (%) .....	26
Tabela 5 - Variáveis e níveis utilizados nos experimentos .....	54
Tabela 6 - Níveis codificados das variáveis (V1, V2 e V3) .....	55
Tabela 7 - Determinação da umidade do bagaço da cana-de-açúcar utilizado para secagem realizada durante 44h a 55°C .....	56
Tabela 8 - Caracterização química da biomassa .....	60
Tabela 9 - Verificação da atividade enzimática com o decorrer do tempo .....	62
Tabela 10 - Resultados de formação de açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana <i>in natura</i> .....	63
Tabela 11 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço da cana <i>in natura</i> , extraídas do software Statistica® 7 .....	64
Tabela 12 - Resultados de formação dos açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio ..	68
Tabela 13 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço da cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio, extraídas do software Statistica® 7 .....	69
Tabela 14 - Resultados de formação de açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana pré-tratado com ácido e base .....	73
Tabela 15 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço de cana pré-tratado com ácido e base, extraídas do software Statistica® 7	74
Tabela 16 - Massa de bagaço de cana consumida na hidrólise enzimática para os experimentos realizados no tempo de 48 horas .....	81

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- ALCON – Companhia de Álcool Conceição da Barra
- ART – Açúcares Redutores Totais
- CEUNES – Centro Universitário Norte do Espírito Santo
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- CTBE – Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol
- CTC – Centro de Tecnologia Canavieira
- DNS – Ácido Dinitrosalisílico
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- ES – Espírito Santo
- FPU – Filter paper Units
- IAA – Instituto do Açúcar e do Álcool
- NATT – Núcleo de Absorção e Transferência de Tecnologia
- NREL1 – National Renewable Energy Laboratory
- RIDESA – Rede Interinstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro
- UFAL – Universidade Federal de Alagoas
- UFES – Universidade Federal do Espírito Santo
- UFPR – Universidade Federal do Paraná
- UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco
- UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
- UFS – Universidade Federal de Sergipe
- UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
- UFV – Universidade Federal de Viçosa
- UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1. ENERGIAS RENOVÁVEIS.....	18
3.2. CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL.....	20
3.3. BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	23
3.4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA .....	25
3.4.1. LIGNINA.....	26
3.4.2. HEMICELULOSE .....	27
3.4.3. CELULOSE .....	28
3.5. PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	29
3.5.1. POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO DO BAGAÇO DA CANA EM AÇÚCARES REDUTORES E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	31
3.5.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR.....	32
3.5.2.1. Pré-tratamento com ácido/base .....	36
3.5.2.2. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino .....	37
3.5.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	37
3.5.3.1. Celulases.....	40
3.5.3.2. Sinergia entre enzimas.....	42
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1. MATÉRIA PRIMA .....	44
4.2. CELULASES .....	44

<b>5. METODOLOGIA .....</b>	<b>45</b>
5.1. PREPARO DA MATÉRIA PRIMA.....	45
5.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	46
5.2.1. <i>PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO / BASE .....</i>	<i>46</i>
5.2.2. <i>PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....</i>	<i>47</i>
5.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA .....	47
5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA - MÉTODO DA FPASE.....	51
5.4.1. <i>DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES .....</i>	<i>52</i>
5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....	52
5.5.1. <i>PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....</i>	<i>54</i>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
6.1. PREPARO DA MATÉRIA PRIMA.....	56
6.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	57
6.2.1. <i>PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO .....</i>	<i>57</i>
6.2.2. <i>PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO E BASE.....</i>	<i>58</i>
6.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA .....	59
6.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE .....	61
6.4.1. <i>TESTE DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO..</i>	<i>61</i>
6.5. RESULTADOS OBTIDOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS DIFERENTES BAGAÇOS DE CANA ESTUDADOS .....	62
6.5.1. <i>COMPARAÇÃO DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS E IN NATURA UTILIZADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....</i>	<i>77</i>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>83</b>
<b>8. RECOMENDAÇÕES: .....</b>	<b>86</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A - Curva Padrão - Método DNS .....</b>	<b>96</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte da energia consumida é proveniente da queima de combustíveis fósseis. Esses combustíveis não renováveis são responsáveis por grandes quantidades de emissões de gases que dão origem a chuva ácida, smog fotoquímico, aquecimento global e efeito estufa, além de danos a saúde. Não obstante aos problemas ambientais, Oliveira et al. (2008) relatam a grande necessidade de diminuir a dependência em relação ao petróleo devido aos seus preços em constante crescimento e a possibilidade de esgotamento dessa fonte. A previsão mais otimista é de que as jazidas atuais existentes de petróleo sejam suficientes para, pelo menos, mais 40 anos.

Devido a essas preocupações é necessário que se encontrem fontes alternativas sustentáveis para suprir a demanda energética atual sem causar danos ambientais. Nesse contexto surgem os biocombustíveis, que são combustíveis produzidos a partir da biomassa. Dentre essas fontes têm-se a cana-de-açúcar para a produção de etanol, o qual na oferta interna de energia representa 16,1% das energias renováveis (BEM, 2014). No estado do Espírito Santo, no primeiro levantamento da safra de 2014/2015, a área destinada para a plantação da cana-de-açúcar foi de 73,25 (mil.ha), com produtividade de 55,025 (Kg/ha), de acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014).

Nos últimos anos a produção de etanol tem aumentado significativamente devido a este ser considerado o mais promissor bicomcombustível de fonte renovável (DIAS, 2012). No Brasil, a indústria de etanol é bem expressiva já que boa parte dos automóveis é abastecida com etanol. Na safra 2013/2014 foram moídas 658,8 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo 360,9 milhões de toneladas para a produção de etanol, apresentando um acréscimo de 11,9% quando comparada a safra 2012/2013 (CONAB, 2013).

Dentre os subprodutos da produção de etanol e açúcar têm-se o bagaço da cana que possui a capacidade de agregar valor à produção, pois é um subproduto rico em celulose e pode ser utilizado na obtenção de álcool de segunda geração. A utilização desse bagaço permite o aumento da oferta de combustível e possibilita o aproveitamento integral da cana-de-açúcar já que fornece fonte de carboidratos

fermentáveis para produção de etanol. De acordo com Filho (2008), o bagaço é visto como subproduto gerado nas usinas que desponta como solução para aumentar o rendimento da produção de álcool em relação à matéria-prima sem que haja a necessidade de se expandir a área de plantio, favorecendo assim toda a cadeia produtiva e preservando o meio ambiente.

Uma empresa do estado do Espírito Santo demonstra que para produzir 450 mil litros/d de etanol, a quantidade de bagaço da cana gerado por dia é de 2100 ton. Para cogear 7MW, a mesma empresa utiliza 960 ton/dia de bagaço. O bagaço excedente fica depositado para uma eventual parada da indústria e para no final da safra dar continuidade a cogeração para venda da energia, até acabar o que ficou estocado<sup>1</sup>.

Essa matéria prima apresenta uma composição média de 40 a 50% de celulose, 25 a 35% de hemicelulose e 7 a 29% de lignina (CASTRO et al., 2010) e um dos grandes desafios é conseguir que a celulose esteja exposta favorecendo a ação das enzimas. De acordo com Rabelo (2010), é necessário que os constituintes da biomassa vegetal passem por um pré-tratamento que resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva a abertura da estrutura da celulose (PANDEY et al., 2000).

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo e pode ser hidrolisada pela enzima denominada celulase a qual se encontra como um complexo multienzimático (BAYER; LAMED, 1992). São as celulases que possuem capacidade de romper as ligações glicosídicas de microfibrilas da celulose. Durante o processo de degradação da celulose são produzidos açúcares que podem ser fermentados por leveduras para a produção de etanol (SUN; CHENG, 2002). Assim, após a fermentação, o açúcar da celulose é convertido em álcool. Estudos indicam que uma destilaria capaz de produzir 1 (um) milhão de litros de etanol a

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal de Nerzy Dalla Bernardina – Diretor da empresa Alcon, em 30 de setembro de 2014, recebida por correio eletrônico.

partir do caldo poderá ter um acréscimo inicial de 150 mil litros, podendo chegar até 400 mil litros em 2025 com o avanço da tecnologia de aproveitamento da biomassa que seria desperdiçada (CÉZAR, 2007).

A hidrólise enzimática de materiais celulósicos tem sido um tema recorrente de intensas pesquisas. Conforme Ryu e Mandels (1980) o desenvolvimento de um processo industrial de bioconversão ajudaria a reduzir os problemas urbanos da dependência de combustíveis fósseis. Com o desenvolvimento dessa tecnologia, todo o bagaço da cana-de-açúcar atualmente utilizado na geração de energia elétrica poderá ser também destinado à produção de álcool (LEE, 1997).

Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar o processo de hidrólise enzimática do bagaço da cana utilizando enzimas comerciais. Melhores rendimentos de hidrólise resultam em maiores quantidades de açúcares fermentescíveis e conseqüentemente em maior produção de álcool.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a influência de variáveis de processo no rendimento da hidrólise enzimática da celulose utilizando como matéria prima o bagaço da cana-de-açúcar para posterior produção de álcool de segunda geração.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar o comportamento do bagaço *in natura* e a influência do bagaço pré-tratamento com ácido/base e com peróxido de hidrogênio alcalino na hidrólise da celulose;
- b) Estudar a influência das variáveis (tempo, temperatura e concentração enzimática) no rendimento da hidrólise enzimática com o auxílio de um planejamento experimental do tipo fatorial  $3^3$ ;
- c) Analisar os resultados obtidos na hidrólise enzimática com o auxílio do Software STATISTICA 7.0.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. ENERGIAS RENOVÁVEIS

Energia renovável é originária de fontes naturais que possuem a capacidade de renovação, ou seja, não se esgotam. Elas causam menores impactos ao meio ambiente, sendo assim, são ótimas alternativas para o sistema energético tradicional, principalmente na situação do aumento do crescimento global. Em 2013, a participação de renováveis na matriz energética brasileira foi de 41% e manteve-se entre as mais elevadas do mundo, com apenas uma pequena redução se comparada ao ano de 2012 devido à menor oferta de energia hidráulica (BEM, 2014).

No entanto, a maior parte das energias atualmente exploradas não é renovável e estão presentes na natureza. Todavia, são quantidades limitadas, ou seja, não podem ser recuperadas caso venham a acabar e levam muitos anos para se formarem novamente. Exemplos dessas fontes de energias não renováveis: Petróleo, gás natural, carvão mineral e combustíveis nucleares (MMA, 2014).

Material oleoso e inflamável, o petróleo é atualmente a principal fonte de energia. Em setembro de 2014 a expansão da produção fez com que a extração diária de petróleo no mundo superasse em 2,8 milhões de barris comparado aos níveis de setembro de 2013. Os Estados Unidos e a China estão entre os principais responsáveis por este aumento (AIE, 2014).

As advertências ambientais devido à exploração de fontes não renováveis e grandes concentrações de emissões de CO<sub>2</sub> impulsionaram e tornaram a busca por outras fontes de energia cada vez mais imperiosa. Desta forma, Santos (2012) destaca que no século XXI a indústria química é obrigada a passar por uma grande transformação recorrendo à biotecnologia para realização de transformações químicas e ao uso de recursos renováveis como matéria-prima básica.

Devido à crescente demanda mundial por energia, à limitação dos recursos petrolíferos, aos impactos ambientais e à disputa de preço, há um aumento no interesse em combustíveis alternativos, especialmente os combustíveis líquidos. O

bioetanol é uma das alternativas a ser considerada importante devido à adaptabilidade dos motores existentes a este combustível e por este ser um combustível mais “limpo”, com maior octanagem que a gasolina (WHEALS et al., 1999; GRAND, 2006).

A Tabela 1 demonstra a progressão na produção de etanol para os próximos anos, indicando que no período de 2020/2021 serão produzidos 65,3 milhões de toneladas de etanol, sendo 49,6 milhões de toneladas voltados para o consumo interno e 15,7 milhões de toneladas à exportação (COGEN, 2009).

**Tabela 1 - Perspectiva da produção de etanol**

	2008/2009	2015/2016	2020/2021
Produção de cana-de-açúcar (milhões de toneladas)	562	829	1.038
Etanol (bilhões de litros)	27,0	46,9	65,3
Consumo interno	22,0	34,6	49,6
Excedente para exportação	4,8	12,3	15,7

Fonte: Cogen (2009).

Atualmente, tem-se ainda como alternativa de combustível líquido o etanol a partir da biomassa lignocelulósica. Esse etanol é particularmente promissor porque pode capitalizar o poder da biotecnologia para reduzir drasticamente os custos. Ele é derivado de matéria prima de baixo custo e abundante, podendo assim alcançar altos rendimentos, alta octanagem e outras propriedades desejáveis de combustível, sendo ambientalmente favorável (WYMAN, 2007). Nesse contexto, os materiais lignocelulósicos têm recebido atenção como fonte alternativa de carboidratos para produção de etanol.

A Presidente da União das Indústrias de Cana-de-Açúcar (UNICA), em 2014 constatou que a produção brasileira de etanol, reconhecida internacionalmente, não compromete a de alimentos. Se por um lado cresceu a produção de cana, a de carnes e grãos também evoluiu. Um produto não limita o outro no Brasil<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Elizabeth Farina, presidente da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA), durante participação no “3º Sugar & Ethanol Summit – Brazil,” evento realizado no dia 18 de julho de 2014, em Londres.

Conforme a UNICA (2014), o Brasil se destaca em 1º lugar como produtor mundial de açúcar, responsável por 25% da produção mundial e 50% das exportações mundiais, e em 2º lugar como produtor mundial de etanol sendo responsável por 20% da produção mundial e 20% das exportações mundiais.

### 3.2. CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL

A cana-de-açúcar é uma das principais fontes de geração de energia em discussão desde o Brasil Colônia devido ao alto valor do açúcar no mercado internacional. Recentemente, o álcool favoreceu ainda mais a cultura devido a sua importância estratégica como nova matriz energética.

Na safra 2014/2015 estão sendo produzidas quase 38 milhões de toneladas de açúcar e 28 milhões de metros cúbicos de etanol segundo o governo federal (CONAB, 2014). Esse aumento no quadro produtivo é resultado de inovações políticas, institucionais e científico-tecnológicas implementadas pelos setores público e privado.

As principais inovações aparecem com maior destaque a partir da década de 1970 através do Programa de Modernização da Agroindústria Canavieira, do Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA). A capacidade de produção aumentou de 5,4 para 11,4 milhões de toneladas de açúcar por safra, com foco no mercado internacional (RIDESA, 2005).

O álcool era visto como um produto secundário dentro da cadeia produtiva da cana, no entanto, se tornou estratégico após a Crise do Petróleo, em 1973. Com a crise, em 1975, o governo federal criou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) com o objetivo de incentivar a produção de álcool a partir de várias matérias-primas, dentre elas a cana-de-açúcar. Essa foi, possivelmente, uma das maiores inovações visando o aumento da produção da cana-de-açúcar na história do país.

O Proálcool pode ser dividido em três fases: a implantação de destilarias de álcool junto às usinas de açúcar, que proporcionaram o crescimento da produção do tipo anidro; a implantação de destilarias autônomas em novas áreas de produção de

álcool, iniciando a produção do álcool hidratado para automóveis; e a eficiência industrial e os aprimoramentos dos diversos aspectos do consumo (ITURRA, 2006).

O governo investiu no Proálcool cerca de US\$ 7 bilhões até 1989. Este investimento foi feito em subsídios e pesquisas visando ajudar a equilibrar as contas externas, a diminuição de desempregos, o aumento da arrecadação fiscal, a diminuição da poluição ambiental e o desenvolvimento de tecnologia nos setores agrícola e industrial (LIMA et al., 1995).

A partir de 1987, o setor sucroalcooleiro nacional é impactado negativamente por meio das mudanças políticas como a desregulamentação do setor, a extinção do IAA, a liberação dos preços (da cana, do açúcar e do álcool), a política de combate à inflação, que gerou novas crises, e no fechamento de aproximadamente 130 usinas (IEL, 2005).

A saída do Estado do setor incentivou as empresas a adotarem diferentes estratégias de concorrência por meio do avanço tecnológico, por isso, nos anos 90, os produtores deste setor decidiram se reorganizar em virtude da dificuldade com a demanda de álcool no país para buscar alternativas. O acréscimo da adição de álcool anidro na gasolina trouxe novas oportunidades de negócio para os produtores rurais e industriais, e junto com as novas oportunidades houve também a necessidade do aumento da produção para atender a demanda.

O avanço de novas tecnologias empregadas no setor agrícola desencadeou um aumento na obtenção de produtos. Pesquisas estão sendo direcionadas para a utilização dos subprodutos como o bagaço da cana-de-açúcar, que é gerado em grande quantidade pela agroindústria brasileira como alternativa para produção de biocombustível (RIDESA, 2005).

O Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), em São Paulo, e o Núcleo de Absorção e Transferência de Tecnologia (NATT), em Maceió, são entidades que foram criadas pela iniciativa privada a fim de gerar e transferir tecnologias para serem empregadas na cana e seus derivados.

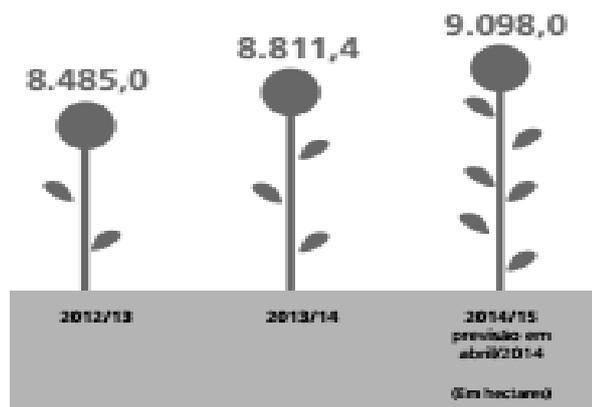
No campo das inovações institucionais, a busca pelo aumento de produtividade da cana determinou, por exemplo, a criação de instituições como a Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Alagoas. Com a extinção do IAA, o seu acervo e recursos humanos foram transferidos para as Universidades Federais em Alagoas (Ufal), Pernambuco (UFRPE), Sergipe (UFS), São Paulo (UFSCar), Paraná (UFPR), Minas Gerais (UFV) e Rio de Janeiro (UFRRJ), que hoje formam a Rede Interinstitucional de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA).

Além disso, a competitividade na cadeia produtiva da cana-de-açúcar está diretamente relacionada com as inovações políticas e institucionais que levaram o Brasil a ser o maior produtor mundial da cultura. A criação e a articulação de instituições de pesquisa públicas e privadas contribuíram para a destacada produção atual de 387 milhões de toneladas de cana (RIDESA, 2005).

Após 30 anos desde o seu início, o setor comemorou o elevado aumento da produção atingindo a quantia de 410 milhões de toneladas no mundo todo (esta estimativa considera as várias matérias-primas utilizadas na produção de etanol) (WHEALS et al., 1999).

No Brasil, a cana-de-açúcar utilizada principalmente na produção de álcool e açúcar, é uma das culturas agrícolas mais importantes, gerando diversos recursos e empregos diretos e contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento com melhores fontes de renda.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra 2014/2015 a previsão de área plantada por cana-de-açúcar no Brasil é de 9.098 mil hectares, na região sudeste 5.592 mil hectares e no estado do Espírito Santo 73 mil hectares. A Figura 1 confirma o crescimento da área plantada entre o ano de 2012 a 2014.



**Figura 1 - Área plantada entre o ano de 2012 a 2014 (em mil.ha)**

Fonte: Conab.

Conforme a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), na produção de etanol, cerca de 28% da cana é transformada em bagaço. Em termos energéticos, o bagaço equivale a 49,5%, o etanol a 43,2% e o vinhoto a 7,3%. Mesmo com esse alto valor energético, o bagaço ainda é pouco explorado nas usinas. Neste contexto, o bagaço da cana-de-açúcar apresenta-se como um dos materiais com maior potencial para a obtenção de diversos produtos de interesse comercial.

### 3.3. BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Ao produzir o álcool e o açúcar, são gerados vários resíduos como o bagaço, a palha, a vinhaça, a torta de filtro e as águas residuárias. Esses resíduos podem ser aproveitados de modo a reduzir os impactos ambientais e proporcionarem benefícios econômicos.

Estima-se que para o ano de 2030, a produção do bagaço da cana-de-açúcar será de 153,9 milhões de toneladas, como consta na Tabela 2. Esse resíduo é um pó fino e claro, e boa parte dele, atualmente, é utilizado na cogeração de energia nas usinas de etanol. O bagaço é considerado uma fonte energética e algumas usinas já possuem termoelétricas acopladas, o que as tornam autossuficientes em energia elétrica e vapor (RABELO, 2010).

**Tabela 2 - Oferta da biomassa da cana-de-açúcar (milhões de toneladas)**

	2005	2010	2020	2030
Produção de cana	431	516	849	1.140
Biomassa Produzida	117,8	141,9	233,5	313,5
Bagaço	57,8	69,7	114,6	153,9
Palha	60,0	72,2	118,9	159,6
Biomassa ofertada	57,8	73,3	132,3	185,8
Uso do bagaço - %	100	100	100	100
Recuperação da palha - %	0	5,0	14,9	20,0
<b>Destinação da biomassa</b>				
Produção de etanol	0,0	0,3	17,7	18,7
Produção de eletricidade	57,8	73,0	114,6	167,1

Fonte: Mme (2007).

Já as usinas que não realizam a cogeração de energia acabam ficando com grande quantidade de bagaço acumulado no pátio, gerando assim problemas como incêndios, poluição e ocupação do espaço. A proposta é a utilização desse bagaço para geração de combustíveis avançados.

A estrutura do bagaço é constituída por 65% de fibras e 35% de material não fibroso, como mostra a Tabela 3. As fibras possuem um alto coeficiente de expansão e contração sob processos de umedecimento e secagem, e as células da medula são de forma e tamanhos irregulares com a razão diâmetro/crescimento de aproximadamente 5. (RABELO, 2007).

**Tabela 3 - Composição física média do bagaço da cana-de-açúcar**

<b>Fibras</b>	Casca	50%
	Vasos e vasculares	15%
<b>Material não fibroso</b>	Medula	30%
	Epiderme não fibrosa	5%

Fonte: Caraschi (1997), apud Rabelo (2007).

A importância de se discutir o aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar está na possibilidade da geração de receita e redução de custos para as usinas sucroalcooleiras e, concomitantemente, a diminuição do impacto ambiental, uma vez que o resíduo poderá ser totalmente eliminado ao ser utilizado como combustível.

Oliveira (2012) ainda afirma que se todos os polissacarídeos presentes nele fossem convertidos em etanol, chegaria a 100% a mais, ou seja, dobraria a produção de etanol com a mesma área plantada, considerando o uso de todo o bagaço gerado no setor sucroalcooleiro. A Figura 2 demonstra o excedente de bagaço em uma usina sucroalcooleira.



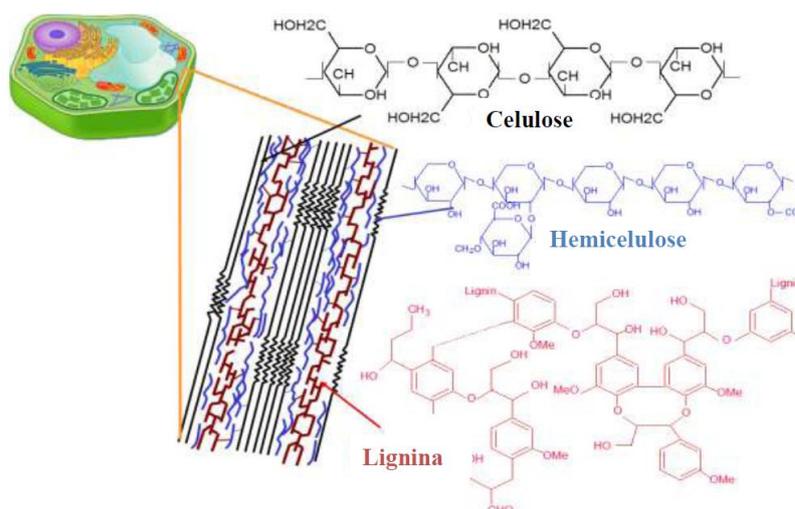
**Figura 2 - Bagaço da cana-de-açúcar**

Fonte: Pereira (2006).

### 3.4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

A lignocelulose é a principal componente da biomassa, incluindo cerca da metade do material vegetal produzido pela fotossíntese e que representa o mais abundante recurso orgânico renovável (ZAMPIERI, 2011). A Figura 3 demonstra a composição da biomassa.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente pelos compostos estruturais, celulose, lignina e hemicelulose, no entanto, outros constituintes menores também se mostram presentes. Dentre estes, incluem compostos orgânicos chamados de extrativos (ésteres, álcoois, esteroides e outros) e inorgânicos (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio). A hemicelulose e celulose são estruturas duras e fibrosas, entremeadas por uma macromolécula composta por álcoois aromáticos, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (LEE, 1997).



**Figura 3 - Estrutura Lignocelulósica e seus componentes**

Fonte: Camassola (2011).

Segundo Lewin e Goldstein (1991), as proporções entre os constituintes dependem do tipo de material. Por exemplo, a celulose e hemicelulose são os principais polissacarídeos existentes na parede celular das madeiras, palhas, gramíneas e outras plantas naturais na terra (ZHANG et al., 2014). A Tabela 4 indica a composição química básica de alguns dos principais resíduos lignocelulósicos.

**Tabela 4 - Composição química dos resíduos agrícolas (%)**

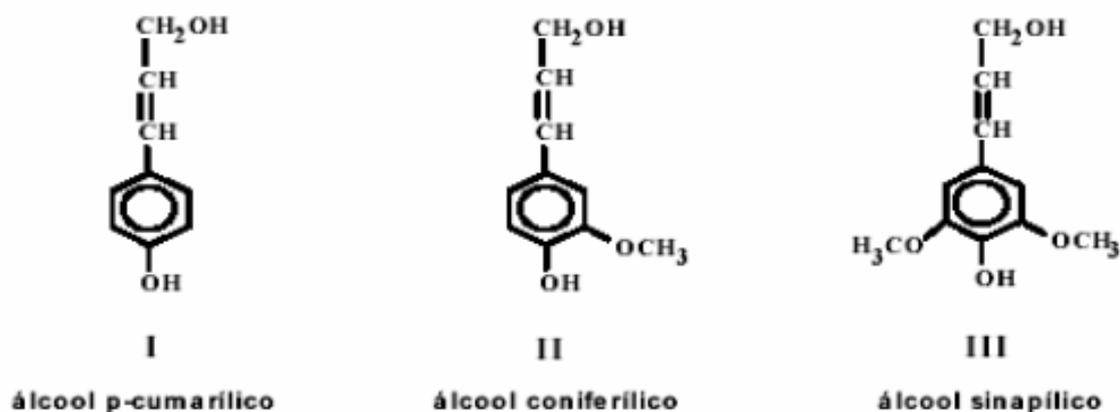
Resíduos	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Proteínas	Cinzas
Palha de arroz	32-47	19-27	5-24	-	12,4
Palha de trigo	35-47	20-30	8-15	3,1	10,1
Palha de milho	42,6	21,6	8,2	5,1	4,3
Bagaço de cana-de-açúcar	33-36	28-30	18,4	3	2,4

Fonte: Sarkar et al. (2012).

### 3.4.1. LIGNINA

A lignina é composta por uma estrutura complexa que proporciona resistência mecânica as plantas. É bastante resistente à degradação química e enzimática e, por recobrir os outros polissacarídeos, representa um obstáculo ao se tentar utilizar o bagaço da cana-de-açúcar para obtenção de etanol.

É uma macromolécula formada principalmente pela polimerização radicalar de unidades fenil-propano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico). A Figura 4 demonstra os percussores da biossíntese da lignina.



**Figura 4 - Precusores da Lignina**

Fonte: Fengel; Wegener (1989).

A lignina envolve as microfibrilas celulósicas conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (CANILHA et al., 2011).

### 3.4.2. HEMICELULOSE

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos que, ao contrário da celulose, podem ser formados por diversos açúcares (pentoses e hexoses) dando origem a cadeias moleculares mais curtas e com alto grau de substituição (MAYRINK, 2010).

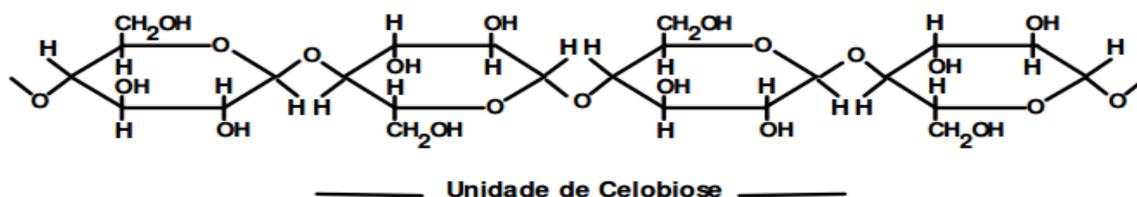
Cada heteropolissacarídeo geralmente apresenta uma cadeia principal formada por uma única unidade, podendo apresentar diversas outras unidades como substituintes (D'ALMEIDA, 1988).

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se, principalmente, nas camadas primária e secundária onde estão ligadas covalentemente à celulose e lignina. Por causa do baixo grau de

polimerização e de sua natureza amorfa, as hemiceluloses são degradadas mais facilmente que a celulose (MAYRINK, 2010).

### 3.4.3. CELULOSE

De acordo com Saad (2010), a celulose é um homopolímero linear composto por moléculas de glicopirranose unidos por ligações  $\beta$ -glicosídicas (1 $\rightarrow$ 4) de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Em sua estrutura, as moléculas de glicose se ligam por meio dos carbonos 1 e 4, formando a celobiose. Essa ligação (1 $\rightarrow$ 4) ocorre com a hidroxila na posição B (posição equatorial). Como se pode observar na Figura 5, a celulose é uma cadeia polimérica no qual a unidade repetitiva é a celobiose.



**Figura 5 - Estrutura de um fragmento de celulose**

Fonte: Fengel; Wegener (1989).

Estudos indicam que a celulose possui um grau de polimerização médio de 9.000 - 10.000, podendo em alguns casos atingir números muito maiores do que este. A cadeia de celulose está estruturalmente ligada à hemicelulose e a lignina, não sendo um substrato facilmente acessível. É formada por microfibrilas, que possuem regiões ordenadas (cristalinas), alternadas com regiões menos ordenadas (amorfas), as quais formam as fibrilas, que por sua vez coordenam-se para formar as sucessivas paredes celulares (RAMOS, 2003).

A forma cristalina apresenta maior número de ligações intra e intermoleculares, como as ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila. Estas tornam a celulose insolúvel e resistente ao ataque químico e a degradação microbiana. Sob condições normais, a celulose é extremamente insolúvel em água, o que é necessário para sua própria função como sustentação estrutural nas paredes

celulares vegetais (CANILHA et al., 2011). Enquanto isso, a forma amorfa é mais facilmente hidrolisada, possui menos interação de hidrogênio, sendo assim primeiramente atacada e degradada por ser mais acessível às enzimas (D'ALMEIDA, 1988; RAMOS, 2003).

Dos três polímeros estudados, a lignina é o único que não apresenta interesse no processo de produção de etanol de segunda geração (OLIVEIRA, 2014; SANTOS, 2013). Já a celulose é a de maior interesse por gerar monômeros de glicose, passíveis de fermentação pelo mesmo processo já empregado nas plantas sucroalcooleiras nacionais (MONTAÑO, 2013).

### 3.5. PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O etanol de segunda geração (etanol 2G) ou etanol celulósico pode ser considerado uma inovação de ruptura no setor sucroenergético. Ele torna a cadeia produtiva do álcool mais sustentável com o aproveitamento do bagaço, que normalmente é descartado.

Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação alcoólica dos carboidratos presentes, como por exemplo, no caldo da cana-de-açúcar, a segunda geração consiste na produção do etanol celulósico a partir da quebra dos polissacarídeos presentes na parede celular vegetal dos resíduos lignocelulósicos (PITARELO et al., 2012).

A viabilização dessas novas tecnologias que empregam a biomassa para produção do etanol de segunda geração representa uma importante alternativa à consolidação de um modelo sustentável. Por essa questão, é importante estimular o investimento no desenvolvimento de rotas de produção de baixo custo que produzam um combustível competitivo com o mercado (RAMOS, 2003; PITARELO et. al., 2012).

Hoje, o maior centro de pesquisa da cana-de-açúcar do mundo é o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), situado em Piracicaba - São Paulo, que busca cada vez mais avanços tecnológicos para produzir o etanol de segunda geração.

Quem também está na corrida para resultados no etanol de segunda geração é a GRANBIO, empresa de biotecnologia que já deu início à produção de etanol de segunda geração (2G) desenvolvido à base de palha e bagaço da cana-de-açúcar. Trata-se da primeira unidade produtora em escala comercial do hemisfério sul. A empresa em questão está investindo R\$ 350 milhões em uma unidade industrial em São Miguel dos Campos, Alagoas. O projeto ainda prevê o desenvolvimento de uma “super-cana”, com quatro vezes mais celulose que a convencional (FAPESP, 2014). Ainda recentemente, o presidente da GRANBIO prometeu investimentos de R\$ 4 bilhões nos anos seguintes para a instalação de dez novas plantas que produzirão 1 bilhão de litros de etanol 2G até 2022<sup>3</sup>.

A Petrobras S.A, igualmente, vem se destacando com uma das empresas brasileiras que mais investem em biorrefinarias, em especial a partir de resíduos da cana-de-açúcar (PETROBRAS, 2011). A estratégia da empresa é se tornar competitiva e expandir a participação no mercado de biocombustíveis liderando a produção nacional de biodiesel e ampliando a participação no negócio de bioetanol.

Já a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), possui grandes reservas de plantas energéticas com grandes chances de serem utilizadas para a produção do etanol de segunda geração, sendo a cana-de-açúcar a espécie mais pesquisada.

Recentemente também, foi criado o Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE) que investe em pesquisa básica e inovação tecnológica para viabilização de fontes renováveis de energia que aliem alta produtividade ao aproveitamento máximo da biomassa lignocelulósica com sustentabilidade (SANTOS, 2012).

No entanto, apesar de alguns estudos, investimentos e produção, uma grande questão para a produção do etanol de segunda geração é a competitividade frente ao valor do álcool de primeira geração. Sendo que os maiores desafios na produção do etanol de

---

<sup>3</sup> Bernardo Grandi - Presidente da GranBio em depoimento no veículo de comunicação online – Novacana.com em 26 de setembro de 2014.

segunda geração estão, principalmente, nos custos de cada etapa de produção versus o rendimento global do processo.

### 3.5.1. POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO DO BAGAÇO DA CANA EM AÇÚCARES REDUTORES E ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Além do desenvolvimento de tecnologias para a produção do álcool de segunda geração, um aspecto primordial para disponibilização para a indústria e para a sociedade é a análise da viabilidade técnico-econômica do processo. Grande parte destes estudos, até o momento, foi realizada nos Estados Unidos, sobretudo pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL1), e na Europa. Apesar de o Brasil ser um país com destaque a nível mundial para a produção de etanol, não existem muitos estudos de avaliação da aplicabilidade da tecnologia do etanol de segunda geração considerando-se a disponibilidade de matéria-prima, viabilidade técnica e os custos de produção.

Apresentados na reportagem exibida pela revista Nova Cana em 2015, a transformação estequiométrica do bagaço *in natura* e seu potencial máximo de produção de etanol estão expostos na Figura 6. Para este cálculo, foram considerados somente os açúcares redutores potencialmente recuperáveis da hemicelulose e da celulose.



Figura 6 - Conversão do bagaço da cana em etanol

Fonte: Revista Nova Cana (2015).

Ainda segundo a EMBRAPA, é preciso investir em tecnologias que proporcionem a redução dos custos, que evite formação de inibidores e que resulte no aumento da exposição das fibras de celulose, sendo esses aspectos cruciais para a implantação em larga escala de produção.

Segundo Santos (2013), para a obtenção desse álcool de segunda geração é necessário cumprir quatro etapas necessárias, sendo essas: pré-tratamento do bagaço, hidrólise da celulose, fermentação e destilação. A fermentação e a destilação são as mesmas do álcool de primeira geração, diferenciando apenas nas duas primeiras etapas, que serão descritas abaixo.

### *3.5.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR*

As biomassas vegetais possuem grandes quantidades de celulose além de outros polissacarídeos hidrolisáveis em glicose para fermentação a etanol combustível ou para a produção de produtos de interesse. Na natureza, o processo de biodegradação é bem mais lento, pois a lignina limita o acesso de enzimas hidrolíticas aos componentes dos polissacarídeos. Sendo assim, é necessário um pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (CHANG et al., 1998).

O pré-tratamento aumenta a área de superfície da biomassa da cana e a porosidade dos materiais, além de reduzir a cristalinidade da celulose. Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios: evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação dos produtos da degradação que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos e minimizar a demanda de energia (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1999). Por isso, o pré-tratamento é visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis e, portanto, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (LEE et al., 1997; LYND et al., 2002)

De acordo com Carli et al. (2011), diversos métodos de pré-tratamento vêm sendo estudados visto a necessidade de tornar a celulose mais disponível para a etapa de hidrólise e que não haja um acréscimo muito grande no investimento industrial. Desse modo, são esperáveis as seguintes características para a etapa de pré-tratamento:

- Ter um material pré-tratado facilmente hidrolisável;
- Não degradar a celulose;
- Não formar inibidores;
- Requerer nenhuma ou pouca redução granulométrica do material;
- Gerar o mínimo de resíduos possível;
- Trabalhar com equipamentos de baixo custo;
- Ser simples e eficaz.

Entre os pré-tratamentos, são destacados os pré-tratamentos ácidos, alcalinos e com explosão a vapor. No entanto, o pré-tratamento químico têm recebido uma maior atenção já que os pré-tratamentos físicos são relativamente ineficientes no aumento da digestibilidade da biomassa (FAN et al., 1982) e os tratamentos combinados raramente têm digestibilidade melhorada quando comparados aos tratamentos simples (GHARPURAY et al., 1983).

Segundo Rabelo (2007), o pré-tratamento químico remove a lignina e a hemicelulose sem degradar a cadeia celulósica. Ele pode ser realizado com peróxido de hidrogênio e ácido/base. O pré-tratamento ácido promove a hidrólise da fração hemicelulósica permitindo seu aproveitamento para fermentação de pentoses e maior produção de etanol, contudo, o uso de ácidos concentrados é pouco estudado visto a necessidade de equipamentos especiais que permitam operar em condições extremas de pH. Já os ácidos diluídos, apesar de amplamente estudados e difundidos, apresentam o risco de formação de furfural, composto que inibi a etapa de fermentação (OLIVEIRA et al, 2012; PEREIRA., et al, 2006; SANTOS et al., 2011)

Já o tratamento alcalino resulta na remoção de parte da fração da lignina expondo as fibras de celulose tornando mais acessível ao ataque enzimático (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Além disso, o tratamento alcalino está associado ao

menor custo. O gasto com reagentes e com equipamentos tende a ser muito menor para a maioria dos materiais lignocelulósicos quando realizado por etapas básicas (CARLI et al., 2011; NASCIMENTO, 2011).

Foram encontrados alguns trabalhos na literatura que destacam estudos sobre pré-tratamento da biomassa.

Silva (2009) estudou o pré-tratamento e a sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de açúcar redutor. Um dos objetivos foi verificar o efeito do pré-tratamento e da deslignificação no aumento da conversão enzimática da celulose da biomassa da palha da cana, do bagaço da cana e do pseudocaule da bananeira. Nos resultados foi verificado que ocorreu alteração na estrutura química de cada biomassa estudada proporcionada pelo pré-tratamento. O pré-tratamento com ácido sulfúrico 1,0% (m/v), seguido deslignificação com NaOH 1,0% (m/v) promoveu solubilização de 88,8% de hemicelulose e 77,9% de lignina para a palha da cana e 79,3% de hemicelulose e 62,3% de lignina para o pseudocaule da bananeira. Já o pré-tratamento do bagaço foi realizado por meio do pré-tratamento hidrotérmico em reator que proporcionou uma solubilização de 95,8% de hemicelulose e 80,9% de lignina. Os ensaios de conversão enzimática dos materiais lignocelulósicos mostraram que a conversão celulósica aumentou consideravelmente para todos os materiais após o pré-tratamento.

Rabelo (2007) avaliou o desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática do bagaço da cana-de-açúcar. Planejamentos fatoriais  $3^2$  foram realizados para avaliar a influência do tempo de pré-tratamento (h), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino ( $\text{H}_2\text{O}_2$  alcalino) (%) no desempenho da hidrólise, que foi medido pela liberação de glicose e açúcares redutores totais (ART). O autor chegou à conclusão que as condições ótimas de pré-tratamento são de 1h de reação, temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$  e concentração de 7,355% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e os resultados de massa de ART e glicose após 48h de hidrólise foram 0,4899 g/g biomassa bruta seca e 0,3740 g/g biomassa bruta seca, respectivamente. O rendimento de glicose no ponto ótimo foi de 84,07%.

Nascimento (2011) estudou o pré-tratamento com hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) diluído para a produção de etanol utilizando como matéria

prima o bagaço da cana. O pré-tratamento foi realizado com o bagaço *in natura* e avaliado a influência do tempo de pré-tratamento e concentração da base e do ácido na liberação de açúcares após a hidrólise. Como resultados foram obtidos 75,3% de eficiência na etapa de hidrólise com uma máxima produção de glicose de 61,4g/l e eficiência de 90% de fermentação.

Ramos (2003) estudou alguns dos métodos de pré-tratamento desenvolvidas para aumentar a conversão de lignocelulose os quais constatou a importância do pré-tratamento na eficiência da hidrólise. O autor afirma que o pré-tratamento de materiais ligno-celulósicos é essencial para bioconversão em virtude das várias barreiras físicas e químicas que inibem consideravelmente a sua susceptibilidade à bioprocessos tais como a hidrólise e a fermentação. O objetivo do trabalho foi rever alguns dos métodos de pré-tratamento mais importantes desenvolvidos até a data para melhorar a conversão de lignocelulose. O mesmo chegou à conclusão que a escolha do pré-tratamento precisa ser eficaz, e necessita que não ocorra perda de celulose que acometem no processo de hidrólise a formação de açúcares. Para isso, no pré-tratamento vários parâmetros devem ser levados em consideração e discutidos com detalhes, tal como a temperatura de pré-tratamento, susceptibilidade da biomassa pré-tratada a bioconversão e concepção do processo.

Souza (2014) estudou diferentes sequências de tratamento do bagaço da cana para a extração de açúcares fermentáveis. Foi realizado o pré-tratamento alcalino com o hidróxido de sódio (NaOH) e a hidrólise ácida com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) em diferentes concentrações. O pré-tratamento alcalino adotado utilizou três concentrações distintas: 1, 10 e 20% m/v. A hidrólise com ácido foi realizada com duas concentrações distintas 0,07% m/v e 55,2% m/v. A hidrólise com ácido concentrado mostrou-se a mais promissora quando realizada em bagaço tratado com NaOH 10%, apresentando 8,62% de glicose, 3,68% de xilose e 3,13% de arabinose. A hidrólise com ácido diluído mostrou-se a mais promissora quando realizada em bagaço tratado com NaOH 1%, resultando em 13,42% de glicose, 4,46% de xilose e 1,27% de arabinose.

Neste presente trabalho será realizado o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e com o uso de solução ácido/base, que serão melhores descritos abaixo.

### 3.5.2.1. *Pré-tratamento com ácido/base*

O pré-tratamento com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) diluído consiste em conseguir a solubilização da hemicelulose e deixar a celulose mais acessível. Esse pré-tratamento pode alcançar elevadas taxas de reação, com isso atingindo o objetivo de melhorar a hidrólise da celulose (SUN; CHENG, 2002).

Segundo Rabelo (2007), a temperatura interfere significativamente no processo. Temperaturas abaixo de  $160^\circ C$  são consideradas baixas temperaturas e acima de  $160^\circ C$  altas temperaturas, sendo a temperatura menor que  $160^\circ C$  mais eficiente ao tratamento. Outro fator a ser observado, conforme verifica Nascimento (2011), é que utilizar ácido concentrado não é uma condição atrativa para produção de etanol já que geram risco de produção de componentes inibidores pela degradação de carboidratos e corrosão de equipamentos.

Já o pré-tratamento com hidróxido de sódio tem como efeito a diminuição da cristalinidade e a ruptura da lignina através da quebra das ligações aril-éter (NASCIMENTO, 2011).

Ainda conforme Nascimento (2011), a vantagem de se utilizar uma base no pré-tratamento são as condições mais amenas, como temperaturas e pressões mais baixas e menos degradação de açúcares, além da remoção da fração de lignina sem a degradação de outros componentes. A eficiência da base depende da quantidade de lignina presente nos materiais (McMILLIAN, 1994).

Em concordância com o descrito acima, pode-se observar que para melhor resultado no pré-tratamento do bagaço e para maior disposição da celulose e ao ataque das celulases, é possível associar o tratamento ácido/base a fim de aprimorar os resultados.

### 3.5.2.2. *Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino*

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é colocado em contato com o bagaço da cana com o objetivo de reagir com a estrutura vegetal de maneira a dissolver a lignina, que posteriormente pode ser recuperada e utilizada para outros fins.

O processo de adição do hidróxido de sódio (NaOH) ao peróxido de hidrogênio torna a solução efetiva na deslignificação e solubilização da hemicelulose devido à formação do ânion hidroperóxido ( $HOO^-$ ), formado em pH alcalino, que se apresenta como a principal espécie ativa no peróxido. Em contrapartida, o peróxido de hidrogênio é instável nas condições alcalinas e se decompõe em radical hidroxil (OH) e superóxido ( $O_2^-$ ) (RABELO, 2007).

Estes radicais são responsáveis pela oxidação da estrutura da lignina, a qual ataca os grupos hidrofílicos quebrando algumas ligações e, eventualmente, levando a dissolução da lignina e hemicelulose (PAN et al., 1988).

Conforme Gould (1984) e Rabelo (2007), o começo da deslignificação pelo peróxido de hidrogênio depende do valor do pH da solução, com máxima deslignificação ocorrendo a pH 11,5 para cima, com pH menor que 10 apresenta baixa digestibilidade da biomassa. Nunes et al. (2011) também ressalta a importância de se observar o PH do meio. Os autores sugerem que o pH seja ajustado adicionando-se hidróxido de sódio (5M) até atingir 11,5. Segundo eles, a eficiência da hidrólise enzimática na conversão de celulose a glicose depende do valor do pH no decorrer do pré-tratamento.

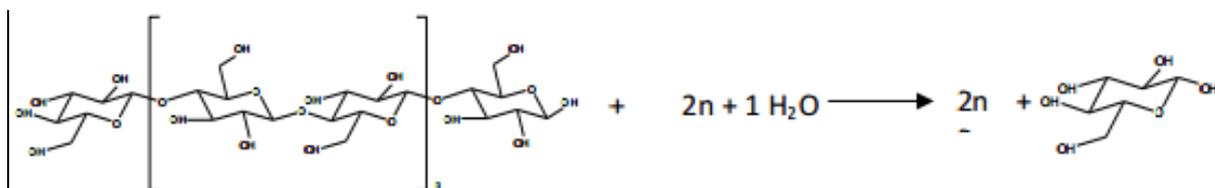
### 3.5.3. *HIDRÓLISE ENZIMÁTICA*

Segundo Saad (2010), a hidrólise enzimática da celulose ocorre pela absorção de enzimas celulasas sobre a superfície da celulose e em seguida pela biodegradação de celulose em açúcares fermentáveis.

A reação química da hidrólise enzimática consiste na catálise provocada por uma enzima que utiliza água para quebrar uma molécula em outras menores. Um dos produtos receberá um grupo de (OH-) e o outro o (H+).

De acordo com Zhang et al. (2014), o mecanismo de hidrólise enzimática não é bem compreendido devido à heterogeneidade estrutural e morfológica do substrato que necessita de um pré-tratamento. Nesta ordem, após o pré-tratamento do bagaço ocorrerá a hidrólise enzimática. Nesta etapa, as enzimas digerem a parede celular vegetal liberando os açúcares C<sub>6</sub> e C<sub>5</sub> que serão convertidos em etanol de 2G durante o processo de fermentação. Diferentemente do produto convencional, o etanol de segunda geração não é extraído diretamente do açúcar retirado da cana, ele é gerado a partir da celulose e hemicelulose existentes nas fibras vegetais do bagaço de cana (NOVA CANA, 2015).

A Figura 7 apresenta a reação geral de hidrólise da celulose sendo destacado entre colchetes a unidade de repetição, celobiose.



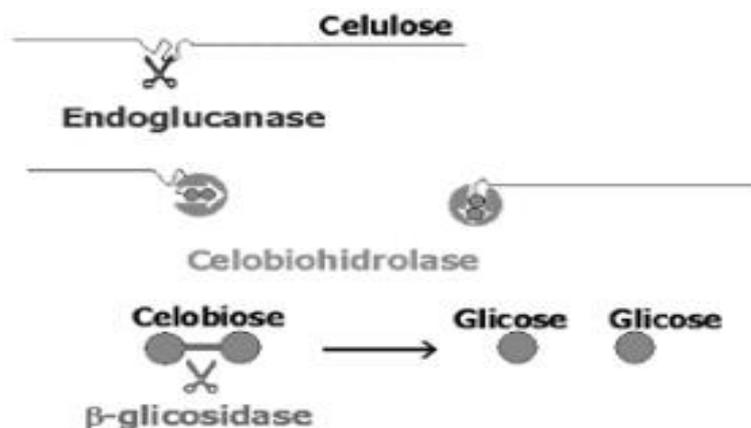
**Figura 7 - Reação geral de hidrólise da celulose**

Fonte: Ribeiro et al. (2012).

O efeito do complexo de enzima-celulase na degradação da celulose conforme demonstrado na Figura 8, é expresso pela ação sinérgica das três principais enzimas, endoglicanases, celobiohidrolases (exoglicanases) e  $\beta$  – glicosidases, que nesse sistema precisa ser mantido estável com altas atividades celulolíticas para eficiência da hidrólise da celulose (LEE, 1997; LYND et al., 2002).

O desenvolvimento de tecnologias que empregam a via enzimática tem ganhado atenção visto que a hidrólise ácida traz amplas desvantagens ambientais e altos custos de processo. Quando comparadas, a hidrólise enzimática se sobressai por permitir a operação em condições brandas de pH e temperaturas, rendimentos mais

elevados, menores custos de implantação e manutenção e a possibilidade de executar a fermentação simultânea à sacarificação (TONON FILHO, 2013).



**Figura 8 - Representação da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre a celulose**

Fonte: Ogeda (2010).

Diversos estudos demonstram a obtenção de hidrolisados por meio da hidrólise enzimática do material lignocelulósico.

Carli et al. (2011) estudaram a hidrólise das amostras de bagaço deslignificado até atingir 64% de conversão. Na fermentação, empregando os hidrolisados com 15% e 20% de sólidos foram obtidos respectivamente 0,45g de etanol/g de glicose e 0,48g de etanol/g de glicose. O rendimento após a fermentação corresponde a 88% e 93%, respectivamente. Uma observação foi que após a etapa de pré-tratamento o bagaço teve uma redução de 85% em hemicelulose e 80% em lignina. A perda de celulose foi de 33%.

Nunes et al. (2011) ao fazerem a hidrólise perceberam que a concentração de glicose liberada na etapa de hidrólise foi maior quando se utilizou concentração enzimática de 10 FPU/g de bagaço resultando em 0,413g de glicose/g de bagaço. O pré-tratamento foi feito com peróxido de hidrogênio o que foi determinante na liberação das fibras e remoção da lignina. No bagaço sem pré-tratamento praticamente não houve liberação de açúcares.

Lima e Gouveia (2011) analisaram os efeitos de quatro fatores sobre a hidrólise enzimática para simulação das condições utilizadas na sacarificação e fermentação

simultânea do bagaço da cana-de-açúcar para a produção de Etanol. Foi aplicado planejamento fatorial  $2^4$  com os fatores e níveis: temperatura (50 e 37°), agitação (80 e 150 rpm), concentração de etanol (0 e 1% (v/v)), e números de etapas de adição de enzimas (1 e 2). Após os tratamentos estatísticos dos efeitos, apenas o número de etapas de adição de enzimas celulases e  $\beta$ -glicosidase foram significativos para a velocidade da hidrólise enzimática.

Candido et al. (2011) estudaram a influência do pré-tratamento na etapa de hidrólise enzimática, no entanto, a matéria prima utilizada foi a palha da cana que se comporta semelhante ao bagaço. A palha foi submetida a uma série de pré-tratamentos em cadeia. Após cada etapa, o material obtido foi caracterizado quimicamente e realizado a etapa de hidrólise enzimática. Os autores notaram que depois de cada etapa o teor de lignina foi diminuindo e a conversão de celulose em glicose foi aumentando, além de perceberem que houve perda de celulose durante os tratamentos.

### 3.5.3.1. Celulases

A celulase refere-se a uma classe de enzimas catalisadoras da hidrólise da celulose em monômeros de glicose produzida por grandes variedades de microorganismos como bactérias e fungos (GUTIERREZ-CORREA et al., 1999). Essas enzimas apresentam diferentes especificidades para hidrolisar as ligações glicosídicas  $\beta$  - (1→4) na celulose, no entanto, comumente, o mais estudado se baseia na especificidade do substrato e nas semelhanças estruturais da enzima, sendo assim divididas em três classes: endoglucanases (CBHs), celobiohidrolases (EGs) e a terceira classe de enzima que trabalha em conjunto com as CBHs e EGs que são as  $\beta$ -glicosidades (BG), formando um complexo enzimático com ação sinérgica para hidrolisar a celulose (GUTIERREZ- CORREA et al., 1999).

**ENDOGLUCANASES (EGS):** A endoglucanase, ou endo- $\beta$ -(1→4)-glicanase (EC 3.2.1.4), catalisa aleatoriamente a hidrólise das ligações nas regiões amorfas da celulose e celulose modificada quimicamente, como a carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose, por apresentarem maior presença de regiões amorfas. Estas

enzimas são responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas, conseqüentemente, produzindo novos lugares de ataque ocupados pelas exo-glucanases (LYND et al., 2002).

**CELOBIOHIDROLASES (CBHS):** As exo-glucanases (ou CBHs) agredem gradualmente as extremidades reductoras e não reductoras da cadeia de celulose dando origem a unidades de celobiose, além de glicose (ZANDONÁ, 2001). Não são muito intensas contra a celulose cristalina, contudo exibem ação sinérgica altamente cooperativa na presença de endoglucanases. As EGs e as CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto. A celobiose apresenta um efeito inibidor nas enzimas maior que a glicose (HOLTZAPPLE et al., 1990).

**$\beta$ -GLICOSIDADES (BGS):** As  $\beta$ -glicosidase tem um papel fundamental para degradação de materiais lignocelulósicos. A celobiose, principal substrato pra  $\beta$ -glicosidase, é um potente inibidor de exocelulases, e a inibição dessa enzima diminui o potencial do processo de sacarificação de biomassas. Portanto, as  $\beta$ -glicosidases não são apenas responsáveis pela produção de glicose a partir de celobiose, mas permitem também a ação eficiente da endoglicanase e exoglicanase (KAUR et al., 2007).

As  $\beta$ -Glicosidades hidrolisam a celobiose e celooligossacarídeos solúveis a glicose (SAAD, 2010). Ainda de acordo com o autor, atualmente o mercado oferece muitos complexos de celulases que contem níveis baixos de  $\beta$ -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos. Como a celobiose apresenta um poder inibidor mais forte do que a glicose e sua hidrólise ocorre através da ação das enzimas  $\beta$ -glicosidases, é indicado que se adicione no meio racional uma pequena quantidade desta enzima pura. Isto, com o fim de que haja uma diminuição na concentração de celobiose no meio reacional e um aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

Diversas pesquisas têm sido realizadas na busca de enzimas capazes de hidrolisar a celulose de maneira mais efetiva, seja pela otimização de processos fermentativos, pela combinação de enzimas para a obtenção de complexos celulósicos mais eficientes ou pelo melhoramento de espécies por meio de métodos de engenharia genética (IMAI et al., 2004; KANG et al., 2004). O desenvolvimento

da atuação da produção destas enzimas é influenciado por vários parâmetros incluindo o pH do meio, a natureza do substrato celulósico, disponibilidade de nutrientes, temperatura de fermentação, entre outros.

### 3.5.3.2. Sinergia entre enzimas

O sinergismo é um fenômeno por meio do qual a ação de uma mistura de dois ou mais componentes das celulasas individuais é maior que a soma da ação de cada componente (SAAD, 2010). O efeito desse complexo enzimático é expresso pela ação sinérgica de três diferentes enzimas, endoglicanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase (LEE, 1997).

Os tipos mais comum de sinergismo são as endo – e exo-glucanases (sinergismo endo-exo) ou a ação de duas exo-glucanases complementares atuando nas cadeias terminais redutoras e não redutoras da celulose (sinergismo exo-exo) (HENRISSAT et al., 1985).

Segundo Saad (2010), as ações sinérgicas são mais expressivas na celulose microcristalina e menos sobre a celulose amorfa, e não há sinergismo quando se utiliza derivados de celulose solúveis.

Uma boa degradação da celulose exige a ação sinérgica do complexo celulolítico, como é o caso do complexo produzido pelos fungos do gênero *Thicoderme reesei*, o qual é formado por diversas endo – e exo –glucanases e dois tipos de  $\beta$ -glicosidases (HENRISSAT et al.,1998).

O fungo *T.reesei* é o microorganismo mais utilizado industrialmente para a produção de celulasas, entretanto, como desvantagem, a sua produção de  $\beta$ -glicosidase é relativamente pequena (SAAD, 2010). Assim, a aplicação de extrato enzimático proveniente de *T. reesi* para a degradação da celulose gera altas concentrações de oligômeros e baixas de glicose. Dessa forma, para se obter um sistema mais eficiente é necessário um suplemento de  $\beta$ -glicosidase. Essa enzima é essencial para diminuir o efeito inibitório.

Outro fungo em destaque é o *Penicillium echinulatum* que também é apontado como produtor de enzimas importantes na hidrólise de material lignocelulósico. Conforme Ribeiro et al. (2012), o *Penicillium echinulatum* tem sido o foco de atenção devido ao seu potencial para produzir grandes quantidades de celulases a baixos custos. Também tem sido considerado uma linhagem promissora para a indústria de bioetanol.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Processos Biotecnológicos do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) em São Mateus, e no Laboratório de Saneamento da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em Vitória, através de procedimentos experimentais e de natureza quantitativa, tendo como finalidade utilizar os resultados adquiridos em aplicações práticas voltadas para a solução de problemas no setor energético.

### 4.1. MATÉRIA PRIMA

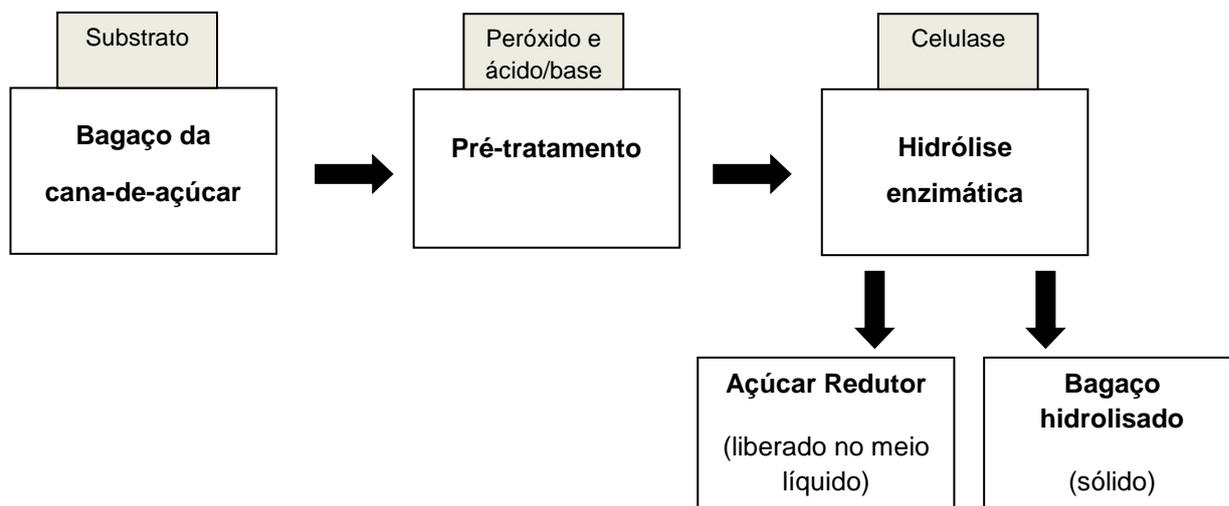
O bagaço da cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi proveniente da Companhia de Álcool Conceição da Barra (Alcon), situada no Norte do Espírito Santo.

### 4.2. CELULASES

A enzima utilizada foi a celulase da empresa “SIGMAALDRICH” proveniente do microrganismo *Trichoderma ATCC 26921*. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de diferentes marcas comerciais.

## 5. METODOLOGIA

A produção de açúcares fermentescíveis por meio da hidrólise enzimática seguiu a metodologia descrita na Figura 9.



**Figura 9 - Fluxograma do processo de produção de açúcares redutores a partir da biomassa lignocelulósica**

Nota: Elaboração do autor.

### 5.1. PREPARO DA MATÉRIA PRIMA

O bagaço foi seco em estufa a temperatura fixa de 55°C até peso constante baseado na metodologia de Nunes et al. (2011). Nessa etapa foi determinado o teor de umidade por meio da Equação:

$$U\% = \frac{\text{Massa do bagaço úmido} - \text{massa do bagaço seco}}{\text{Massa do bagaço úmido}} \times 100$$

Onde  $U$  representa o teor de umidade do material.

Após a secagem, o material foi peneirado em peneiras *tyler* com diâmetro entre 0,8 a 2,0mm de acordo com a metodologia descrita por Fernandes (2007) e demonstrado pela Figura 10. Depois de seco e peneirado o bagaço foi armazenado em sacos plásticos e mantidos a temperatura de -4°C para posterior utilização.



**Figura 10 - Peneiras Tyler para ajuste da granulometria do resíduo fibroso**

Nota: Elaboração do autor.

## 5.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

O pré-tratamento consiste em dois métodos químicos: um com peróxido de hidrogênio e o outro com ácido e base. Os pré-tratamentos puderam ser avaliados de acordo com a quantidade de compostos lignocelulósicos presentes na biomassa através do método de caracterização química do bagaço da cana-de-açúcar.

### 5.2.1. PRÉ-TRATAMENTO ÁCIDO / BASE

O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Carli et al. (2011), o qual destaca que primeiro faz-se a utilização de um ácido e depois de uma base.

Sendo assim, o bagaço foi submetido a uma solução de 1% (m/v) de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ), na proporção de 1,0L para cada 50g de bagaço por 30min a  $120^\circ C$ . Em seguida, o material foi filtrado e lavado com água destilada (a quente) até pH neutro. Em seguida foi realizado o tratamento alcalino, sendo empregado solução de NaOH 7% (m/v) por 30min a  $102^\circ C$ , na mesma proporção do ácido. Logo, foi realizada a filtração e lavagem do material a quente até pH neutro obtendo-se o material

demonstrado pela Figura 11. A amostra foi levada a estufa durante 48h a 45°C. Depois foi armazenado em sacos plásticos a 4°C.



**Figura 11 - (a) Bagaço pós-tratamento e seco; (b) Bagaço pré-tratado, porém úmido**

Nota: Elaboração do autor.

### *5.2.2. PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO*

O pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar foi realizado de acordo com a metodologia adaptada de Nunes et al. (2011). Para tanto, foram utilizados 15g de bagaço peneirado para 600mL de solução contendo peróxido de hidrogênio 7,3% (v/v). O pH do meio foi ajustado para 11,5 através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 5M. O tempo de contato foi de 1h, sendo mantido o sistema sob agitação e com temperatura controlada (25°C). Após o tempo de pré-tratamento o bagaço foi lavado com uso de água destilada por aproximadamente doze vezes sucessivas e levado para estufa a 45°C por 48h. Em seguida, foi armazenado para conservação em sacos plásticos a 4°C.

## 5.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

### **Lignina Klason**

Depois de realizado as etapas de pré-tratamento foi feita a caracterização química da biomassa adaptada a metodologia de Morais et al. (2010). Para tanto, 1,00g da amostra, livre de extrativos, foi transferida para um balão onde foram adicionados

30mL de ácido sulfúrico (72%) lentamente e sob agitação. A amostra foi mantida durante 2h em um banho à temperatura de 25°C sob agitação. Ao conteúdo do balão foi adicionado 560mL de água destilada. O sistema foi então mantido sob refluxo, conforme Figura 12, à uma temperatura de 100°C para que não ocorresse perda de água por evaporação e conseqüentemente, alteração na concentração da solução de ácido.



**Figura 12 - Sistema sob-refluxo para determinação da lignina**

Nota: Elaboração do autor.

Após 4h, o sistema foi deixado em repouso para sedimentação do material insolúvel. Este material foi filtrado em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavado com 500mL de água destilada quente. Em seguida, foi seco em estufa a 105°C por 12h e pesado para a quantificação do resíduo insolúvel (Lignina Klason).

### **Obtenção da holocelulose**

Para obtenção da holocelulose foi adicionado 5,00g da amostra em um balão e acrescentado 100mL de água destilada. O balão foi colocado em banho-maria a 75°C e foi adicionado 2,0mL de ácido acético e 3,00g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o balão para não ocorrer a perda do gás produzido na reação.

Após 1h, foi adicionado novamente 2,0mL de ácido acético e 3,00g de clorito de sódio. Esse processo foi repetido por mais duas vezes (total de 4 adições de hora em hora). A mistura, então, foi resfriada a 10°C (em banho de gelo), filtrada em funil de placa porosa, previamente tarado, e lavada com água destilada a 5°C (água gelada) até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada demonstrado pela Figura 13. O funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105°C por 6h, resfriado em dessecador e pesado para se quantificar o rendimento da holocelulose.



**Figura 13 - Resíduo depois de lavado com água a 5°C**

Nota: Elaboração do autor.

### **Obtenção da celulose**

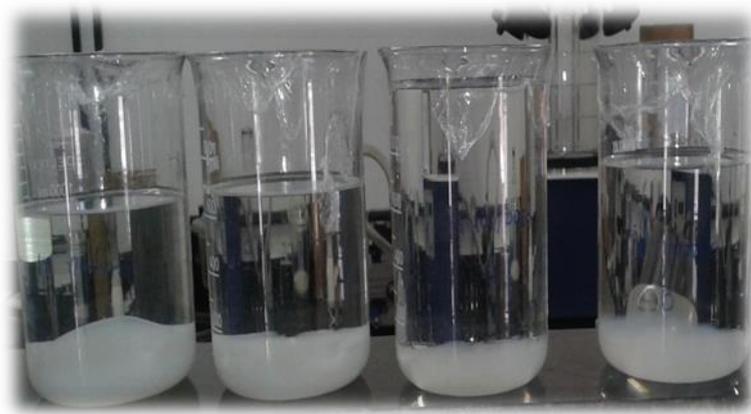
A fração de hemiceluloses solubilizada pelo hidróxido de potássio 5% é designada hemicelulose A, a fração solubilizada pelo hidróxido de potássio 24% é designada hemicelulose B, e o resíduo fibroso após as duas extrações é designado celulose.

Para tanto, 3,00g de holocelulose foram transferidos para um erlenmeyer de 250mL, adicionando 100mL de solução de KOH (5%) em uma atmosfera inerte pela passagem de gás nitrogênio durante os cinco minutos iniciais da extração para evitar a oxidação da celulose, conforme mostra a Figura 14(a). O erlenmeyer foi vedado e mantido sob agitação constante por 2h. A mistura então foi filtrada em funil de placa porosa, lavada com 50 mL de solução de KOH (5%) e em seguida com 100mL de água destilada. O filtrado foi recolhido em um erlenmeyer de 1L e precipitado com

uma solução de partes iguais (400 ml) de ácido acético e etanol (completando-se o volume do erlenmeyer) e obtendo-se assim a hemicelulose A. Após três dias de precipitação da solução de partes iguais o que ficou no funil foi filtrado e obteve-se a hemicelulose A, conforme Figura 14(b).



(a)



(b)

**Figura 14 - (a) Holocelulose em atmosfera inerte pelo N<sub>2</sub>; (b) Precipitação após três dias**

Nota: Elaboração do autor.

Para a obtenção da hemicelulose B, o resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o erlenmeyer de 250mL e foi realizado o mesmo procedimento para a obtenção da hemicelulose A. Foi utilizado solução de KOH (24%). Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil foi utilizado 25mL de solução de KOH (24%), 50mL de água destilada, 25mL de ácido acético (10%) e 100mL de água destilada, respectivamente. O filtrado foi recolhido em erlenmeyer de 1L e precipitado com uma solução de partes iguais de ácido acético e etanol (completando-se o volume do erlenmeyer). No final, tinha-se a hemicelulose B.

O resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. Em seguida, foi lavado com 50mL de acetona, seco a 105°C e pesado. Esse resíduo é, portanto, a celulose.

#### 5.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA - MÉTODO DA FPASE

O método baseia-se na dosagem dos açúcares redutores liberados pela atividade das celulasas sobre o substrato celulósico de papel filtro.

Para a determinação da atividade de celulase total (FPASE) utilizou-se o procedimento recomendado por Adney e Bake (1996), tendo sido empregado como substrato o papel de filtro Whatman n° 1 cortado em tiras de 1x6cm e enrolados em espiral. O substrato foi então inserido em tubos com capacidade de 12,5mL. Em seguida foi adicionado 2 mL de tampão citrato a 50mM, pH 4,8, e colocados por 1 minuto em banho termostatizado a 50°C.

Depois foi adicionado no tubo de ensaio 1,0mL do extrato enzimático. A reação enzimática ocorreu a 50°C durante 60min. Ao final desse tempo foi retirado 1ml da amostra e distribuídos em tubos com 2ml de ácido dinitrosalicílico (DNS). A quantidade de açúcares redutores liberados foi dosada pela reação com o ácido dinitrosalicílico, conforme Miller (1959). Essa determinação de açúcar pode ser melhor compreendida no item 5.4.1.

Para realização da atividade enzimática utilizaram-se tubos de amostras controle, sendo esses:

Branco: O objetivo foi zerar o espectrofotômetro para então dar-se início a leitura. Foi necessário acrescentar nesse tubo 1ml de água destilada e 2ml de DNS.

Tempo zero: Imprescindível para realizar a determinação da concentração inicial de açúcares redutores no extrato enzimático, para depois ser descontado dos valores de absorbância obtidos nas outras amostras.

A determinação da atividade é expressa em FPU (“Filter Paper Unity”) que corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de açúcar redutor por minuto nas condições do teste por volume de enzima original, de acordo com o direcionamento dado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC (ADNEY; BAKER, 1996; GHOSE, 1987).

O cálculo da atividade enzimática se dá pela seguinte fórmula:

$$\bullet \text{ FPU} = \frac{\text{Diluição} \times \text{Concentração } (\mu\text{mol/ml}) \times \text{vol. total da mistura reacional (ml)}}{\text{Tempo (min.)} \times \text{Vol. do sobrenadante (ml)}}$$

Considerar: Tempo = 60min; Volume Total da mistura reacional = 3ml; e Volume do sobrenadante = 1ml.

#### 5.4.1. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

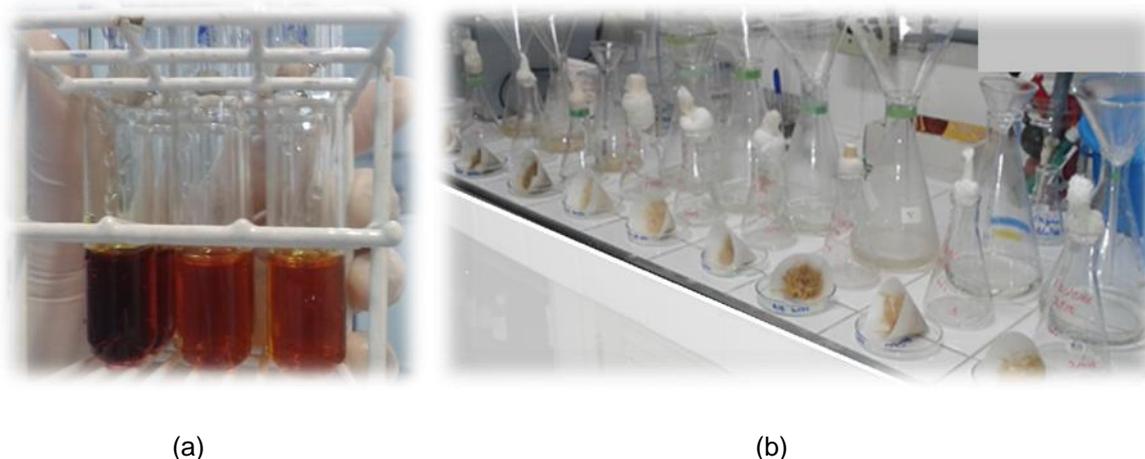
Para realizar a determinação de açúcares redutores utilizou-se um método baseado na redução do ácido dinitro-3,5-salicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico com o desenvolvimento da coloração avermelhada. Através dessa mudança de coloração foi possível medir a quantidade de açúcares relacionando a quantidade de DNS reduzido. A leitura foi realizada utilizando o espectrofotômetro a uma faixa de 540nm e depois comparadas a uma curva padrão (APÊDICE A) previamente elaborada com glicose. Usando essa curva padrão foi possível determinar a concentração de açúcar liberada em cada reação enzimática.

#### 5.5. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática do bagaço foi realizada com o bagaço não tratado (*in natura*) e com bagaços pré-tratados com peróxido de hidrogênio e solução ácido e base. Os bagaços utilizados foram previamente secos e peneirados até atingir granulometria entre 0,8 e 2,0mm de diâmetro.

Os experimentos foram realizados com 3g de bagaço de cana, 300mL de solução tampão citrato de sódio 0,05mol/L em pH 4,8 e enzima comercial. Conforme metodologia empregada por Cândido (2011), o sistema permaneceu sob agitação de 100rpm em incubadora de movimento rotatório.

Após o término da reação enzimática os hidrolisados foram levados a banho com água fervente, resfriados e avolumados, sendo posteriormente filtrados em papel de filtro Whatman nº1, como apresentado nas Figuras 15(a) e 15(b).



**Figura 15 - (a) Na respectiva ordem: hidrolisados com ácido/base, peróxido e *in natura*; (b) Hidrolisados sendo filtrados**

Nota: Elaboração do autor.

Após a coleta do líquido reacional nos tempos de estudos, os resíduos restantes que ficaram no erlenmeyer e no filtro foram lavados com água corrente até que todo o açúcar fosse retirado do resíduo (aproximadamente 5 lavagens). As amostras de resíduo foram levadas para a estufa, secas a temperatura de 100°C, pesadas e armazenadas na geladeira em plásticos previamente identificados.

Nessa etapa foi utilizado um planejamento experimental  $3^3$  para estudar o efeito do tempo de hidrólise (6, 24, 48h), concentração enzimática (10, 15, e 20FPU/g) e temperatura (40, 45, 50°C) para os três tipos de bagaço: *in natura*, pré-tratado com peróxido de hidrogênio e pré-tratado com ácido e base.

O rendimento da hidrólise foi acompanhado pela determinação de açúcares redutores, conforme descrito no item 5.4.1.

### 5.5.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O planejamento experimental foi baseado em princípios estatísticos sendo representado como planejamento fatorial  $3^k$ . Nesse planejamento, tem-se k fatores avaliados em três níveis denotados por baixo (-1), médio (0) e alto (+1).

Foram avaliados três fatores do processo: tempo de contato (h), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração enzimática (FPU/g). Desse modo, foi realizado um planejamento fatorial do tipo  $3^3$  com duas repetições do ponto central. Os valores decodificados dos níveis de cada uma das variáveis nos experimentos são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Variáveis e níveis utilizados nos experimentos**

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Conc. Enzimática (FPU/g)	10	15	20
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	45	50
Tempo (h)	6	24	48

Nota: Elaboração do autor.

A Tabela 6 representa as combinações dos níveis em cada um dos experimentos realizados para as amostras de bagaço *in natura* e pré-tratados. A avaliação do efeito do pré-tratamento na resposta (ART) foi avaliada, posteriormente, por meio de avaliação estatística de blocos, uma vez que não se pode quantificar os tipos de tratamentos em níveis. Os resultados foram tratados no software Statistica®7 que permite avaliar a validade do modelo, a influência das variáveis estudadas no processo e a influência dos níveis.

Também foi quantificada a massa de bagaço ao final do processo, no tempo de 48h, a fim de verificar a quantidade de biomassa consumida na etapa de hidrólise enzimática. Essa massa foi tomada pela diferença entre a massa seca inicial e final.

Tabela 6 - Níveis codificados das variáveis (V1, V2 e V3)

Experimento	V1 (tempo)	V2 (conc. enz.)	V3 (temperatura)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	+1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	+1
7	-1	+1	-1
8	-1	+1	0
9	-1	+1	+1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	+1
13	0	0	-1
14	0	0	0
15	0	0	+1
16	0	+1	-1
17	0	+1	0
18	0	+1	+1
19	0	-1	-1
20	+1	-1	0
21	+1	-1	+1
22	+1	0	-1
23	+1	0	0
24	+1	0	+1
25	+1	+1	-1
26	+1	+1	0
27	+1	+1	+1
28	0	0	0
29	0	0	0

Nota: Elaboração do autor.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. PREPARO DA MATÉRIA PRIMA

Para avaliação da massa seca foram realizadas três medidas consecutivas até peso constante. Os valores de umidade para o bagaço da cana *in natura* encontram-se na Tabela 7.

**Tabela 7 - Determinação da umidade do bagaço da cana-de-açúcar utilizado para secagem realizada durante 44h a 55°C**

Massa úmida (g)	Massa seca (g)	Teor de umidade (%)	Teor de umidade médio (%)
5,0031	2,9430	41,176	38+- 3
5,0023	3,1980	36,069	
5,0138	3,1209	37,754	

Nota: Elaboração do autor.

De acordo com as informações apresentadas, pode-se notar que o bagaço cedido para estudo apresentou teor de umidade de 38%. Segundo Carli (2011) e Oliveira (2014), o teor de umidade do bagaço da cana que deixa as moendas é de 40-50%. Comparando o valor encontrado no trabalho de 38% com o descrito na literatura, pode-se notar que o teor de umidade se encontra próximo da faixa descrita.

Na Figura 16 são apresentadas amostras do bagaço da cana-de-açúcar *in natura*, sem seleção granulométrica, sendo preparadas para o processo de secagem.



(a)



(b)

**Figura 16 - Bagaço da cana-de-açúcar *in natura* - (a) Amostra para secagem; (b) Amostras sendo preparadas para o processo de secagem em estufa a 55°C**

Nota: Elaboração do autor.

## 6.2. PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

### 6.2.1. PRÉ-TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Após realização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio verificou-se uma perda de massa de 25%. Possivelmente essa perda de massa é devido a retirada das substâncias lignina e hemicelulose, os quais são substratos de ataque do peróxido de hidrogênio, de acordo com o explicitado no item 3.5.2.2.

Também foi verificada uma mudança na coloração do bagaço pois sua cor ficou esbranquiçada no final do tratamento, podendo ser observada na Figura 17. Essa mudança na cor demonstra a possível redução do teor de lignina que tem estreita relação com a liberação de oxigênio pelo peróxido de hidrogênio. Estes radicais desprendidos são responsáveis pela oxidação, principalmente, da lignina.

Nesse mesmo contexto Nunes (2011) ressaltou que as lavagens realizadas no final do tratamento não acarretam perda de celulose na amostra, tendo sido eliminados nesta etapa outras frações do bagaço da cana-de-açúcar, principalmente a lignina.



**Figura 17 - Resposta do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio**

Nota: Elaboração do autor.

### 6.2.2. PRÉ-TRATAMENTO COM ÁCIDO E BASE

O emprego do pré-tratamento com ácido e base possivelmente proporcionou uma perda significativa da massa do material lignocelulósico devido à remoção de frações de hemicelulose e lignina. O bagaço foi seco após o pré-tratamento e sua massa foi tomada, apresentando-se cerca de 40% menor.

As etapas ácida e alcalina do pré-tratamento são exibidas sequencialmente na Figura 18.

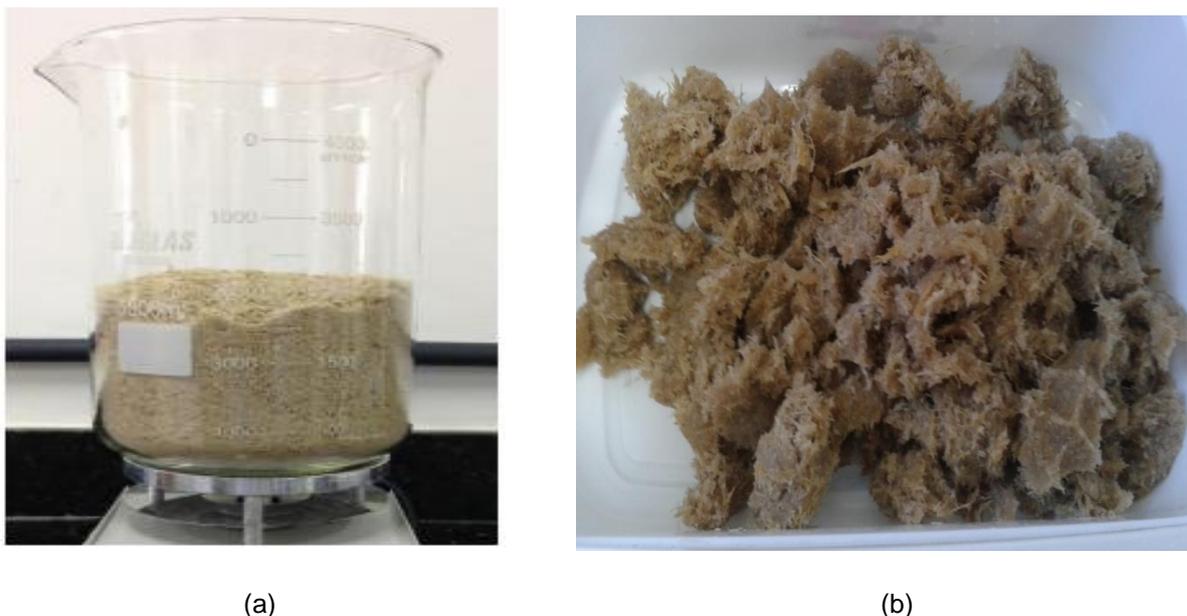


**Figura 18 - Pré-tratamento com ácido e base - (a) Tratamento com ácido sulfúrico; (b) Tratamento com hidróxido de sódio.**

Nota: Elaboração do autor.

Através da análise das figuras foi possível perceber distintas colorações para cada uma das etapas. Segundo Carli (2011), o pré-tratamento ácido promove a remoção da hemicelulose por solubilização, enquanto o pré-tratamento alcalino permite a remoção da lignina, resultando num efluente escuro (FIGURA 18b), com aparência similar ao licor negro presente nos processamentos de indústrias de papel e celulose.

A Figura 19 demonstra o bagaço antes do pré-tratamento ácido e base e pós-tratamento.

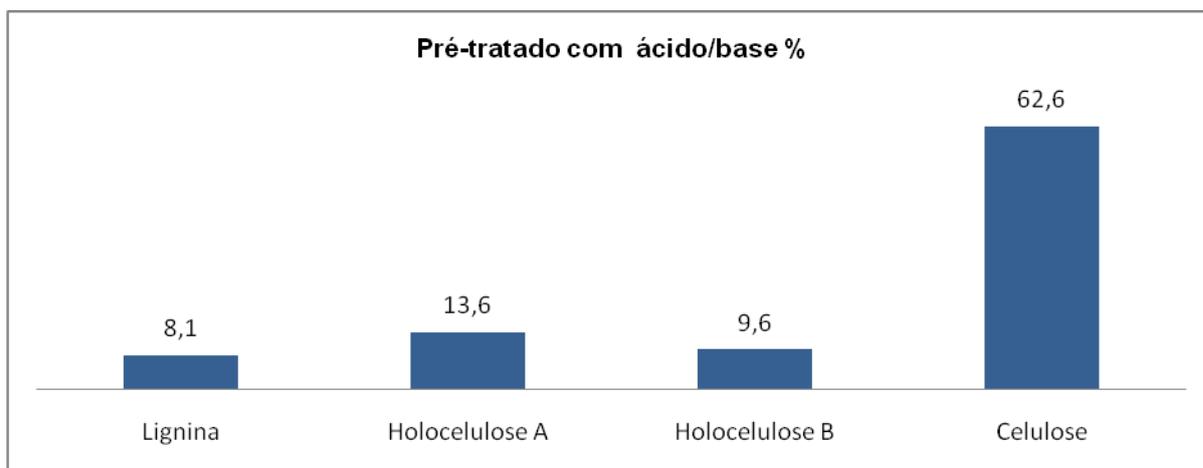


**Figura 19 - Resultado do pré-tratamento com ácido e base - (a) Bagaço seco e peneirado; (b) Bagaço após pré-tratamento, ainda úmido**

Nota: Elaboração do autor.

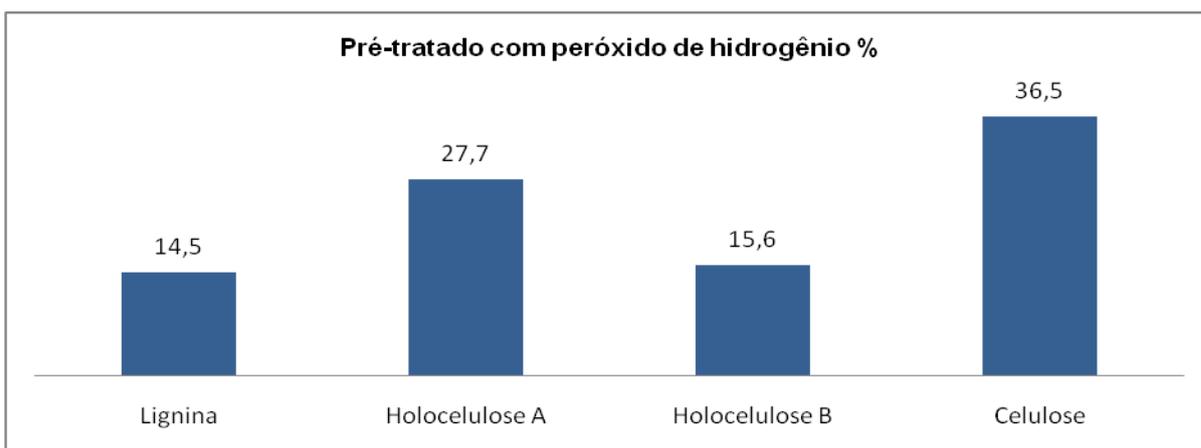
### 6.3. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA

A quantidade de lignina (insolúvel), de hemicelulose (holocelulose A e B) e celulose encontrada nas amostras estão representadas nas Figuras 20, 21 e 22 para cada tipo de bagaço pré-tratado e *in natura* e sumarizadas na Tabela 8.



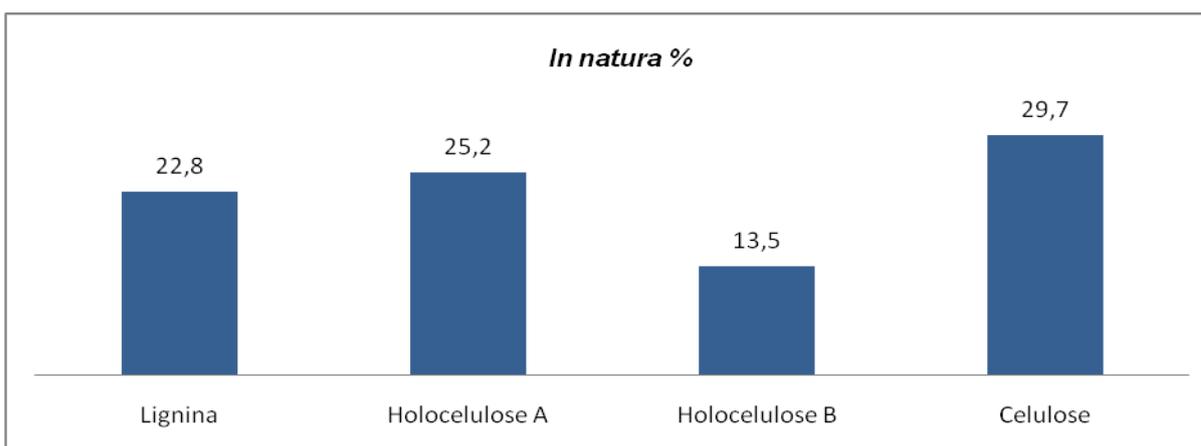
**Figura 20 - Caracterização química para o bagaço pré-tratado com ácido e base**

Nota: Elaboração do autor.



**Figura 21 - Caracterização química para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio**

Nota: Elaboração do autor.



**Figura 22 - Caracterização química para bagaço *in natura***

Nota: Elaboração do autor.

**Tabela 8 - Caracterização química da biomassa**

	Ácido/base	Peróxido	<i>In natura</i>
Lignina	8,1	14,5	22,8
Celulose	62,6	36,5	29,7
Hemi A	13,6	27,7	25,2
Hemi B	9,6	15,6	13,5
<b>TOTAL</b>	<b>93,9</b>	<b>94,3</b>	<b>91,2</b>

Nota: Elaboração do autor.

Na literatura (CARLI et al., 2011; GOUVEIA et al., 2009; LUZ, 2008), a caracterização foi realizada para o bagaço sem tratamento e bagaço pré-tratado. Para as amostras do bagaço *in natura* foi apresentada uma quantidade em média de celulose de 29,8 a 44,69%, de hemicelulose de 29,4 a 38,73% e de lignina de 21,4 a 27,35%. Para o bagaço pré-tratado, a composição do material em média de celulose foi de 63,1 a 70,2%, de hemicelulose de 13,1 a 25% e de lignina de 8,2 a 12,4%. Mediante comparação com os nossos resultados, viu-se que os valores encontrados para a caracterização final para cada tipo de bagaço se aproximam dos valores encontrados pelos autores acima.

É possível observar que o tratamento ácido e base foi o pré-tratamento que resultou em maior quantidade de celulose (62,6%), matéria prima primordial para a hidrólise enzimática. Também se pode observar que essa metodologia de tratamento foi a que retirou maiores quantidades de lignina e hemicelulose, o qual facilita o procedimento de hidrólise.

#### 6.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

##### 6.4.1. TESTE DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

Durante o estudo da atividade celulolítica foram realizados vários testes para determinar a diluição enzimática que resultasse em um ótimo valor de atividade enzimática. A enzima foi diluída em tampão citrato 50mM pH 4,8 e os testes evidenciaram que a melhor diluição foi de 1/100.

Após a escolha da melhor diluição foram realizados testes enzimáticos para verificar o comportamento do extrato enzimático com o decorrer do tempo, com o intuito de se saber o tempo que o extrato enzimático poderia ficar armazenado, sem perder a atividade. Foram realizados testes até 48 horas e os resultados são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Verificação da atividade enzimática com o decorrer do tempo

Tempo 0h	Tempo 6h	Tempo 24h	Tempo 48h
FPU/ml	FPU/ml	FPU/ml	FPU/ml
11,046	10,828	5,011	3,692

Nota: Elaboração do autor.

Os resultados apresentados na Tabela 9 mostram que o extrato enzimático apresenta perda de atividade no decorrer do tempo. Esse resultado pode ser observado a partir do tempo de 6h. Dessa forma, anteriormente aos processos de hidrólises foram realizadas as devidas diluições, realizada a determinação de atividade enzimática e adicionados os FPU's necessários nos frascos de hidrólise.

#### 6.5. RESULTADOS OBTIDOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS DIFERENTES BAGAÇOS DE CANA ESTUDADOS

Foram realizados estudos de hidrólise enzimática com o bagaço da cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio e com ácido e base, além do bagaço sem tratamento (*in natura*). A variável resposta para esse teste foi à quantidade de açúcares redutores totais (ART) liberados durante as reações hidrolíticas. No texto abaixo são apresentados os resultados para os diferentes tipos de bagaço.

##### **Bagaço *in natura***

Os resultados dos experimentos de hidrólise enzimática para o bagaço *in natura* são apresentados na Tabela 10.

Os resultados desses experimentos foram tratados por análise estatística, por meio do software Statistica® 7. Para essas análises foi atribuído o nível de significância de 95%, assim, a variável só exerce influência sobre a resposta quando o p-valor é menor do que 5%, significando que a média das concentrações obtidas estará dentro desse intervalo (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

**Tabela 10 - Resultados de formação de açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana *in natura***

Concentração Enzimática (FPU/g)	Temperatura (°C)	Tempo de Hidrólise (h)	ART ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Erro ( $\mu\text{mol/mL}$ )
10	40	6	0,250	$\pm 0,003$
10	45	6	0,294	$\pm 0,004$
10	50	6	0,378	$\pm 0,003$
15	40	6	0,376	$\pm 0,007$
15	45	6	0,525	$\pm 0,004$
15	50	6	0,545	$\pm 0,005$
20	40	6	0,598	$\pm 0,004$
20	45	6	0,761	$\pm 0,006$
20	50	6	0,828	$\pm 0,003$
10	40	24	0,336	$\pm 0,003$
10	45	24	0,354	$\pm 0,003$
10	50	24	0,519	$\pm 0,004$
15	40	24	0,505	$\pm 0,001$
15	45	24	0,629	$\pm 0,004$
15	50	24	0,630	$\pm 0,002$
20	40	24	0,692	$\pm 0,003$
20	45	24	0,828	$\pm 0,007$
20	50	24	0,901	$\pm 0,003$
10	40	48	0,365	$\pm 0,005$
10	45	48	0,363	$\pm 0,002$
10	50	48	0,532	$\pm 0,003$
15	40	48	0,534	$\pm 0,002$
15	45	48	0,649	$\pm 0,003$
15	50	48	0,658	$\pm 0,002$
20	40	48	0,719	$\pm 0,003$
20	45	48	0,841	$\pm 0,006$
20	50	48	0,914	$\pm 0,003$
15	45	24	0,658	$\pm 0,002$
15	45	24	0,627	$\pm 0,004$

Nota: Elaboração do autor.

Os dados do efeito e do p-valor, extraídos da tabela de ANOVA, estão apresentados nas tabelas de “Estimativas de efeitos” como apresentado na Tabela 11 para o bagaço sem tratamento.

**Tabela 11 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço da cana *in natura*, extraídas do software Statistica® 7**

Fatores	Efeito	p-fator	Coefficiente
Mean/interaction	0,5800	0,0000	0,5800
Concentração enzimática (L)	0,4102	0,0000	0,2051
Concentração enzimática (Q)	-0,0137	0,3348	-0,0069
Temperatura (L)	0,1700	0,0000	0,0850
Temperatura (Q)	0,0186	0,1936	0,0093
Tempo (L)	0,1133	0,0000	0,0567
Tempo (Q)	0,0519	0,0012	0,0260

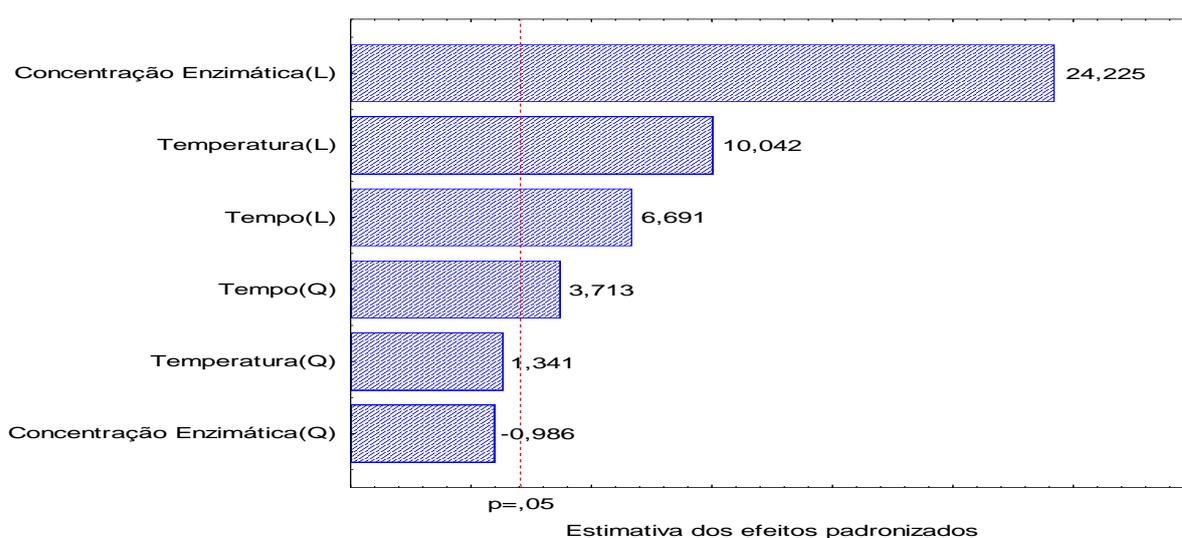
Nota: (L) coeficiente do fator linear da equação do modelo e (Q) efeito quadrático.

Nota<sup>2</sup>: Elaboração do autor.

A partir da leitura da Tabela 11 pode-se perceber que para o bagaço *in natura* os efeitos lineares (L) da concentração enzimática, temperatura e tempo, e o efeito quadrático do tempo, foram significativos. Isto indica que esses parâmetros exercem influência no processo de hidrólise do bagaço. Assim, este estudo resultou na equação:

$$ART = 0,580 + 0,205C + 0,085T + 0,057t + 0,026 t^2$$

A partir do diagrama de pareto é possível observar graficamente os fatores que foram significativos para a resposta (ART formado) através da Figura 23.



**Figura 23 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana *in natura***

Nota: Dados extraídos do software Statistica® 7.

Conforme Barbosa (2009), a sensibilidade dos parâmetros estudados sobre a resposta de interesse é observada por meio do Diagrama de Pareto. Essa ferramenta admite indicar quais os parâmetros e interações têm influências expressivas sobre a variável resposta considerada. Também cabe notar que os fatores apresentados na análise estatística da Tabela 11 concordaram com os apresentados pelo Diagrama de Pareto.

Para estes experimentos, de acordo com a análise estatística realizada, os valores que maximizaram a resposta estimada foram:

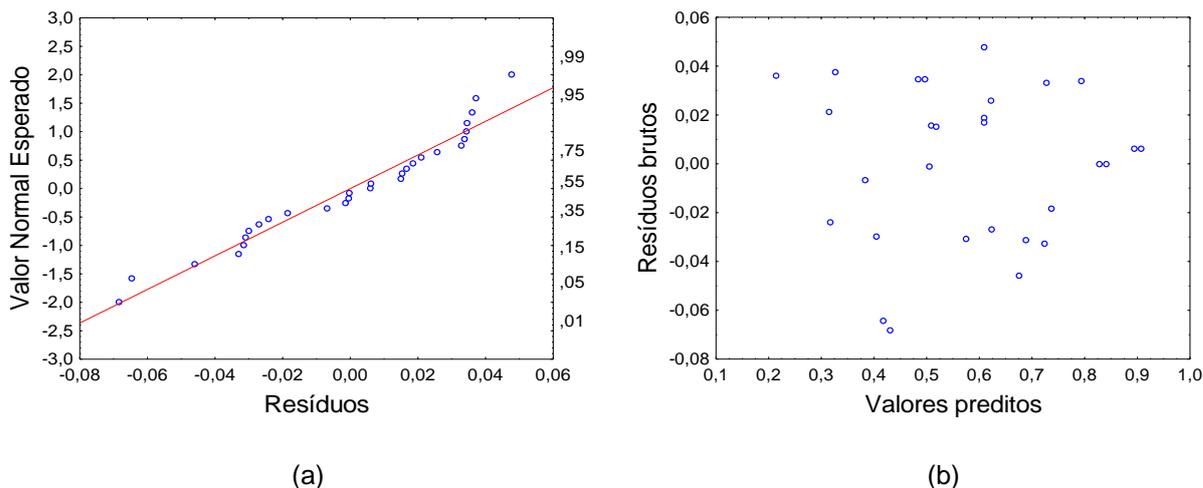
Concentração enzimática: 51,032 FPU/g

Temperatura: 56,4 °C

Tempo: 38,2 horas.

Quando esses valores propostos são manipulados na equação acima, o resultado em açúcar redutor formado também é máximo. Contudo, apenas o tempo estimado como máximo foi avaliado no presente estudo, sendo interessante avaliar também maiores concentrações enzimáticas e maiores temperaturas para, de fato, validar os valores aqui preditos.

Outro importante resultante foi à análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço da cana *in natura*, ilustrado na Figura 24. O gráfico da probabilidade normalizada, Figura 24(a), apresentou pontos próximos à reta normal. Esta observação garante que os dados se ajustem devidamente ao modelo matemático encontrado, caracterizando uma distribuição normal. Simultaneamente, o gráfico de resíduos apresentado na Figura 24(b) apresentou pontos perfeitamente aleatórios, o que também garante que os dados experimentais se ajustaram corretamente ao modelo matemático proposto.



**Figura 24 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço da cana *in natura* - (a) Normalidade dos ensaios experimentais; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independentes**

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

A seguir serão apresentados os gráficos de superfície para as variáveis que apresentaram efeito significativo.

Observando a Figura 25(a) pode-se notar que a associação de maiores temperaturas com maiores concentrações enzimáticas proporcionou uma melhor resposta em ART formado. Dessa forma, vê-se que para o bagaço da cana *in natura* são necessários maiores gastos com conteúdo enzimático e energético para aumentar o grau de rendimento na hidrólise.

Através da Figura 25(b) foi possível observar que o tempo de hidrólise quando comparado com o efeito da concentração enzimática empregada apresentava uma possibilidade de otimização através da localização de um ponto de maximização do açúcar redutor formado. Como se pode perceber, para qualquer concentração enzimática empregada observa-se uma baixa variação no total de ART acima de 30 horas.

Por fim, na Figura 25(c) foi percebido que para o estudo da combinação do tempo e da temperatura de hidrólise, os resultados na formação de ART demonstraram ter alcançado um limite na formação dos mesmos, a partir do qual, aumentar a temperatura ou o tempo da reação não resultaria em efeito mais significativo no resultado.

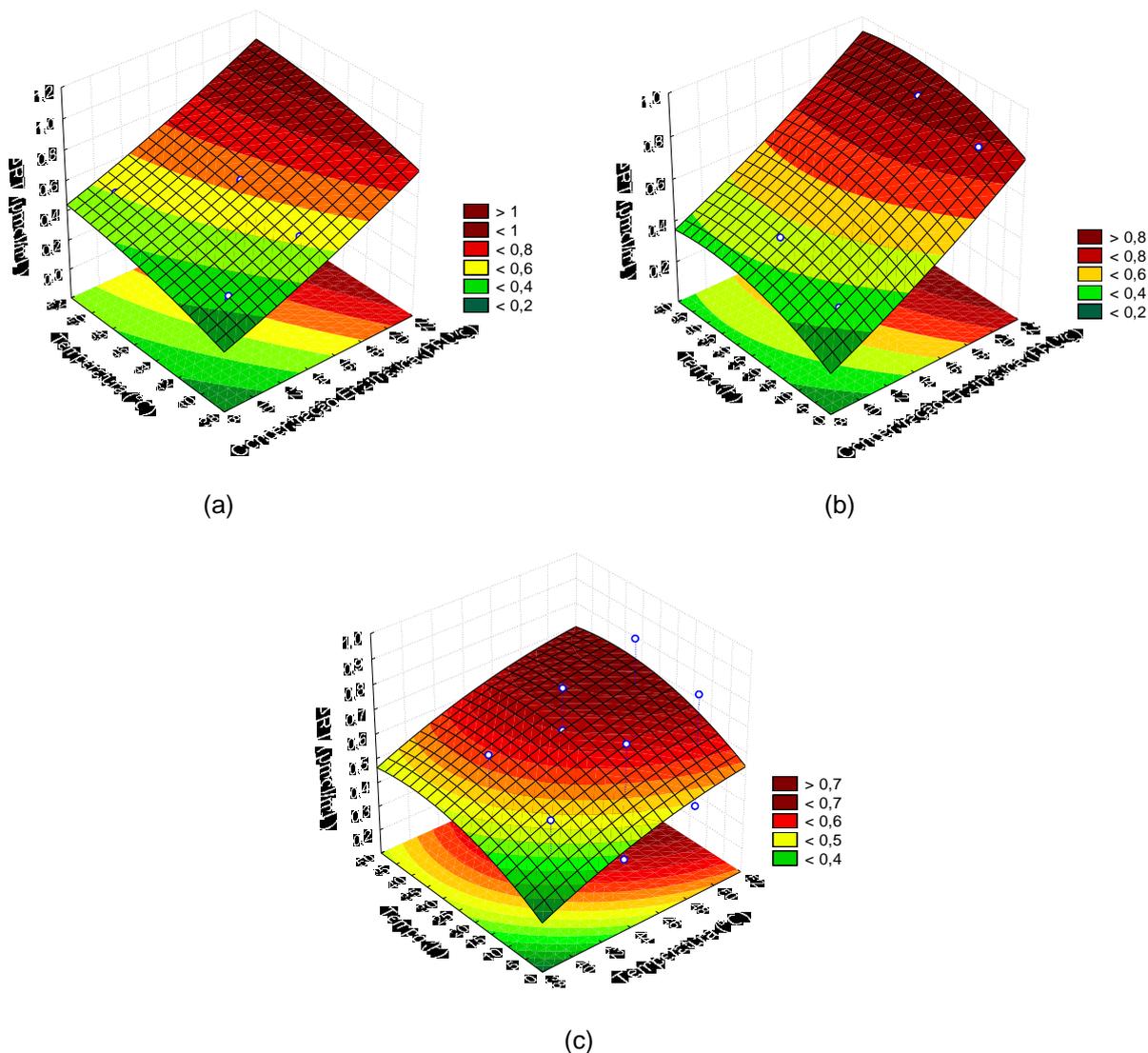


Figura 25 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço *in natura*. Análises de ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

### Bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio

Os resultados dos experimentos de hidrólise enzimática para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12 - Resultados de formação dos açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio**

Concentração Enzimática (FPU/g)	Temperatura (°C)	Tempo de Hidrólise (h)	ART ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Erro ( $\mu\text{mol/mL}$ )
10	40	6	0,427	$\pm 0,002$
10	45	6	0,576	$\pm 0,006$
10	50	6	0,621	$\pm 0,005$
15	40	6	0,825	$\pm 0,008$
15	45	6	0,834	$\pm 0,006$
15	50	6	0,903	$\pm 0,008$
20	40	6	0,950	$\pm 0,01$
20	45	6	0,981	$\pm 0,02$
20	50	6	1,081	$\pm 0,02$
10	40	24	0,839	$\pm 0,005$
10	45	24	0,870	$\pm 0,004$
10	50	24	0,887	$\pm 0,007$
15	40	24	1,343	$\pm 0,02$
15	45	24	1,381	$\pm 0,01$
15	50	24	1,501	$\pm 0,004$
20	40	24	1,527	$\pm 0,004$
20	45	24	1,585	$\pm 0,006$
20	50	24	1,756	$\pm 0,004$
10	40	48	0,908	$\pm 0,008$
10	45	48	0,916	$\pm 0,007$
10	50	48	0,927	$\pm 0,006$
15	40	48	1,359	$\pm 0,02$
15	45	48	1,408	$\pm 0,01$
15	50	48	1,503	$\pm 0,004$
20	40	48	1,576	$\pm 0,01$
20	45	48	1,641	$\pm 0,007$
20	50	48	1,783	$\pm 0,002$
15	45	24	1,372	$\pm 0,009$
15	45	24	1,352	$\pm 0,013$

Nota: Elaboração do autor.

Com base nesses resultados foram iniciados os estudos das análises estatísticas.

A Tabela 13 apresenta as estimativas de efeito dos fatores estudados nos experimentos de hidrólise enzimática.

**Tabela 13 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço da cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio, extraídas do software Statistica® 7**

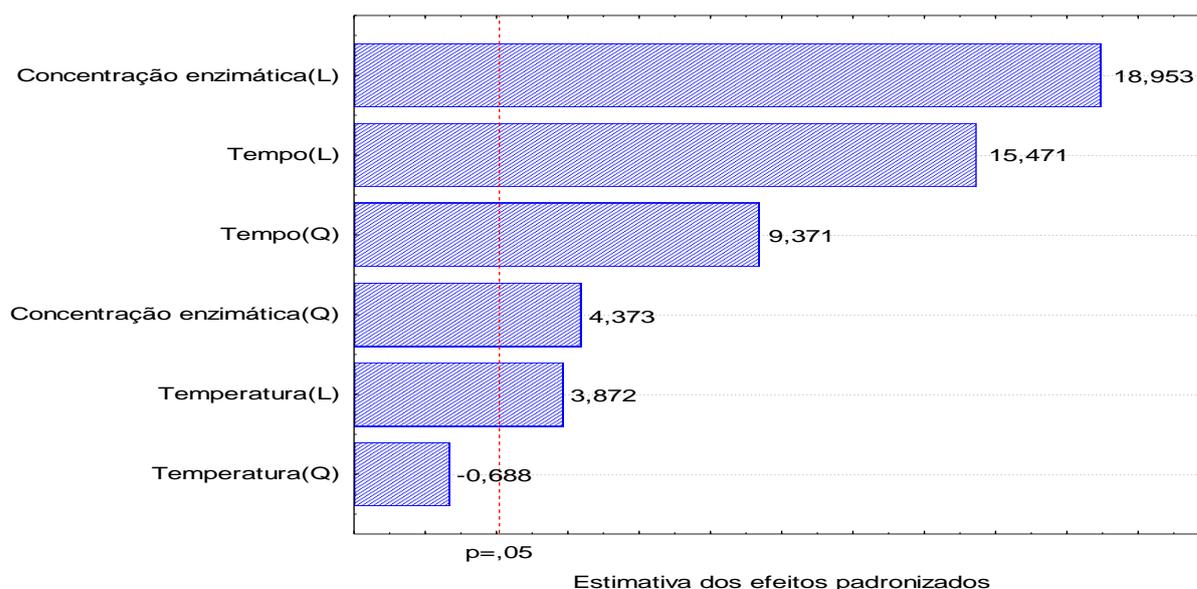
Fatores	Efeito	p-fator	Coefficiente
Mean/interaction	1,1571	0,0000	1,1571
Concentração enzimática (L)	0,6565	0,0000	0,3282
Concentração enzimática (Q)	0,1246	0,0002	0,0623
Temperatura (L)	0,1341	0,0008	0,0671
Temperatura (Q)	-0,0196	0,4988	-0,0097
Tempo (L)	0,5359	0,0000	0,2679
Tempo (Q)	0,2680	0,0000	0,1340

Nota: Elaboração do autor.

Conforme os valores da Tabela 13 para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio, os efeitos lineares da concentração enzimática, temperatura e tempo, e os efeitos quadráticos da concentração enzimática e do tempo foram significativos. Portanto, este estudo resulta na equação:

$$ART = 1,157 + 0,328 C + 0,062 C^2 + 0,067 T + 0,268 t + 0,134 t^2$$

A seguir tem-se o Diagrama de Pareto na Figura 26, que também conseguiu demonstrar os fatores que foram mais significativos para a formação de ART.



**Figura 26 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio**

Nota: Dados extraídos do software Statistica® 7.

Comparando a análise estatística na Tabela 13 e o Diagrama de Pareto na Figura 26, novamente os fatores apresentados concordaram entre si.

Para esse ensaio, de acordo com a análise estatística realizada, os valores que maximizaram a resposta estimada foram:

Concentração enzimática: 21,6 FPU/g

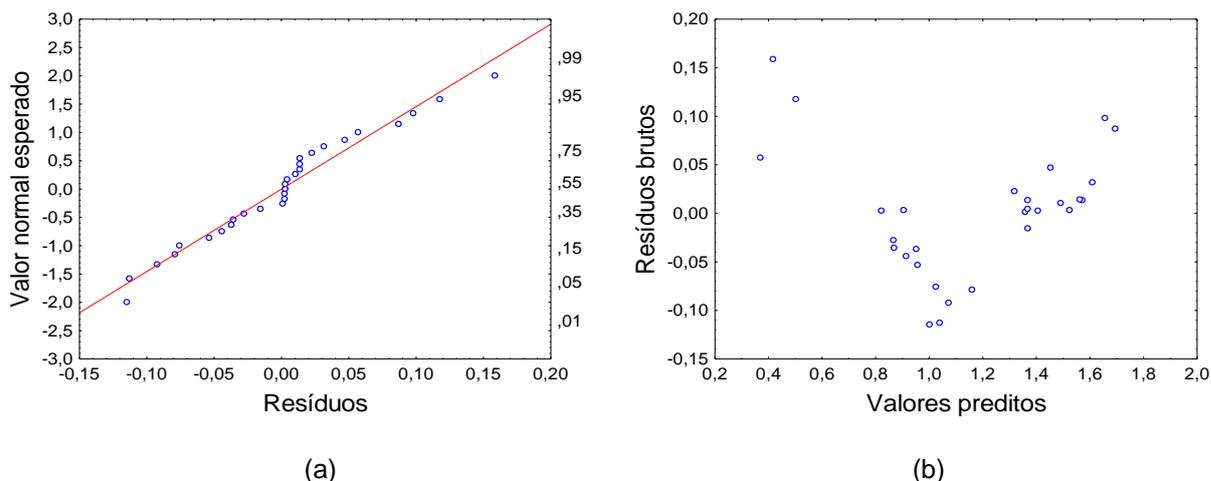
Temperatura: 36,4 °C

Tempo: 37,3 horas.

No entanto, observando os valores acima pode-se concluir que apenas o tempo estimado como máximo foi avaliado no presente estudo, sendo interessante avaliar novas regiões de temperatura e concentração enzimática para uma conclusão mais apurada.

Para a análise residual do tratamento estatístico realizado para os experimentos do planejamento experimental utilizando bagaço tratado com peróxido de hidrogênio, tem-se a Figura 27.

Realizado estudo da Figura 27(a) foi possível identificar que o ajuste do modelo para os ensaios realizados com bagaço pré-tratado com peróxido foi satisfatório. O gráfico da probabilidade normalizada apresentou pontos próximos à reta normal, o que se pode afirmar devido à proximidade dos pares de pontos com a reta. Coerente com os resultados, a Figura 27(b) representa o gráfico residual da variável ART em relação às variáveis independentes. Este se encontra perfeitamente aleatório, o que indica uma distribuição normal e um bom ajuste dos dados ao modelo. Os pontos estando perfeitamente aleatórios garantem que os dados experimentais se ajustem perfeitamente ao modelo matemático proposto.



**Figura 27 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço tratado com peróxido de hidrogênio - (a) Normalidade dos ensaios experimentais; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independente**

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

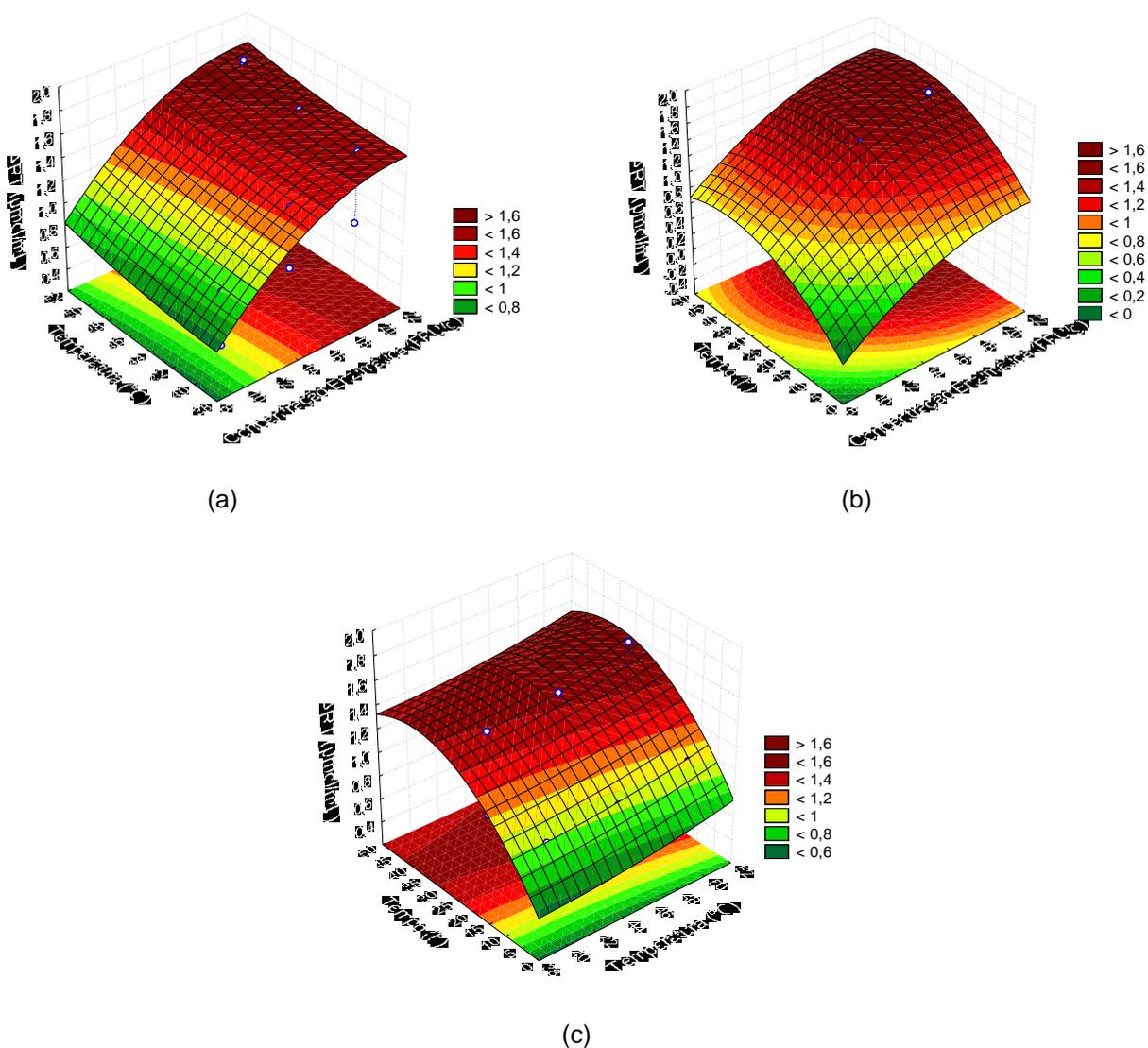
Em seguida são apresentados os gráficos de superfície para as variáveis que apresentaram efeito significativo durante o estudo.

Pela análise da Figura 28(a) pôde-se observar ao comparar o efeito combinado da temperatura com a concentração enzimática no resultado da formação de ART que o acréscimo de enzimas livres (aumento da concentração enzimática) foi muito mais significativo para a formação de açúcares do que o aumento da temperatura.

Ainda, foi possível notar que maiores temperaturas proporcionavam uma leve redução no ART formado para uma mesma concentração enzimática e para concentração superior a 18 FPU/g o efeito na formação de açúcares devido ao acréscimo de enzimas deixava de ser significativo.

Já a Figura 28(b) foi possível analisar o efeito da combinação tempo com concentração enzimática na formação de açúcares redutores totais. Pode-se afirmar que acrescentar tanto o tempo quanto a concentração enzimática resulta em um maior conteúdo de açúcares formados. Contudo, um limite foi formado para concentrações enzimáticas e tempos elevados indicando que acréscimos em qualquer uma das variáveis afetariam minimamente a quantidade de ART formado, podendo ser utilizado como parâmetro para otimização do tempo e concentração enzimática na hidrólise.

A análise da Figura 28(c) permitiu dizer que, para o bagaço de cana pré-tratado com peróxido, o tempo de hidrólise apresentou efeito predominante à temperatura em que a hidrólise foi operada. Pode-se ressaltar que tempos entre 30 e 40 horas maximiza a resposta, em temperaturas amenas, o que permite um menor gasto com energia na reação.



**Figura 28 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço pré-tratado com peróxido. Análise de ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo**

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

### Bagaço pré-tratado com ácido e base

Os resultados dos experimentos de hidrólise enzimática para o bagaço pré-tratado com ácido e base são apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14 - Resultados de formação de açúcares redutores para hidrólise enzimática empregando bagaço da cana pré-tratado com ácido e base**

Concentração Enzimática (FPU/g)	Temperatura (°C)	Tempo de Hidrólise (h)	ART ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Erro ( $\mu\text{mol/mL}$ )
10	40	6	1,118	$\pm 0,004$
10	45	6	1,310	$\pm 0,007$
10	50	6	1,477	$\pm 0,009$
15	40	6	1,939	$\pm 0,03$
15	45	6	2,268	$\pm 0,01$
15	50	6	3,005	$\pm 0,01$
20	40	6	3,145	$\pm 0,005$
20	45	6	4,244	$\pm 0,04$
20	50	6	5,055	$\pm 0,05$
10	40	24	2,857	$\pm 0,003$
10	45	24	3,112	$\pm 0,005$
10	50	24	3,821	$\pm 0,03$
15	40	24	4,788	$\pm 0,05$
15	45	24	5,546	$\pm 0,04$
15	50	24	5,846	$\pm 0,01$
20	40	24	6,031	$\pm 0,006$
20	45	24	7,388	$\pm 0,003$
20	50	24	7,886	$\pm 0,04$
10	40	48	5,077	$\pm 0,005$
10	45	48	6,002	$\pm 0,03$
10	50	48	6,135	$\pm 0,005$
15	40	48	8,277	$\pm 0,02$
15	45	48	9,238	$\pm 0,02$
15	50	48	9,518	$\pm 0,02$
20	40	48	10,136	$\pm 0,05$
20	45	48	12,094	$\pm 0,09$
20	50	48	12,216	$\pm 0,11$
15	45	24	5,461	$\pm 0,05$
15	45	24	5,426	$\pm 0,05$

Nota: Elaboração do autor.

Depois de obtidos os resultados acima foram realizadas análises estatísticas.

A Tabela 15 mostra as estimativas de efeito dos fatores estudados durante os testes de hidrólise enzimática

**Tabela 15 - Estimativas de efeitos para os experimentos realizados utilizando bagaço de cana pré-tratado com ácido e base, extraídas do software Statistica® 7**

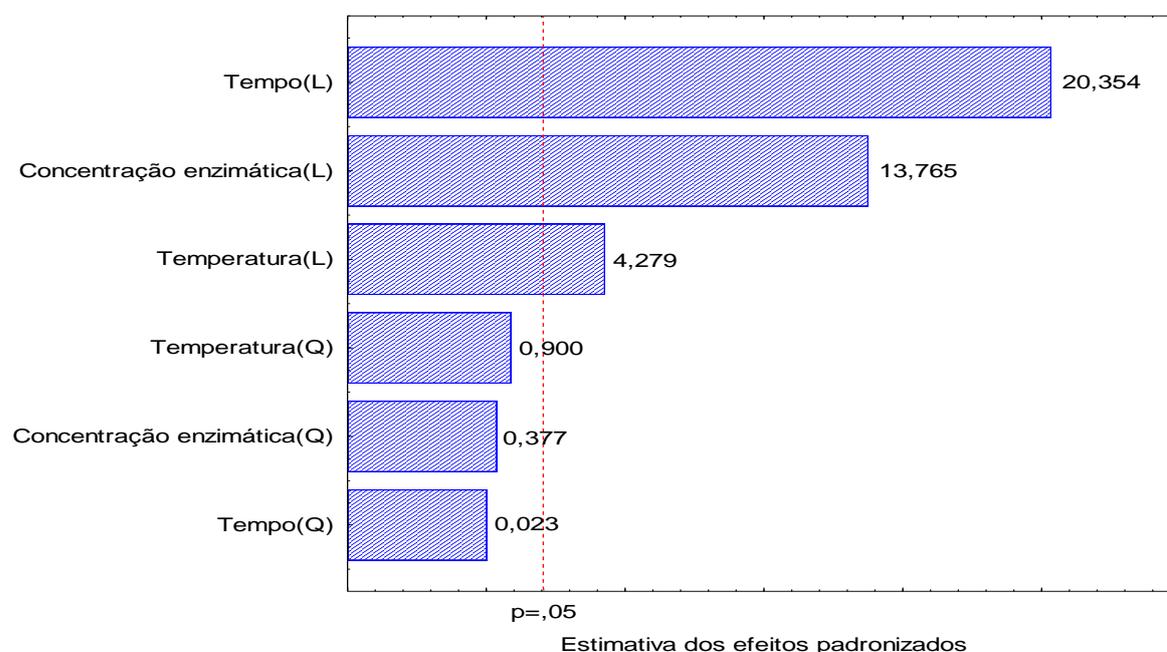
Fatores	Efeito	p-fator	Coefficiente
Mean/interaction	5,6828	0,0000	5,6828
Concentração enzimática (L)	4,1429	0,0000	2,0714
Concentração enzimática (Q)	0,0932	0,7099	0,0466
Temperatura (L)	1,2879	0,0003	0,6440
Temperatura (Q)	0,2230	0,3776	0,1115
Tempo (L)	6,1259	0,0000	3,0630
Tempo (Q)	0,0058	0,9817	0,0029

Nota: Elaboração do autor.

Foi possível identificar por meio da Tabela 15 que para o bagaço pré-tratado com ácido e base foram significativos os efeitos lineares da concentração enzimática, temperatura e tempo. Desse modo, este estudo resultou na equação:

$$\text{ART} = 5,683 + 2,071 \text{ C} + 0,644\text{T} + 3,063 \text{ t}$$

Todos estes efeitos puderam ser melhor observados na Figura 29 através do Diagrama de Pareto.



**Figura 29 - Diagrama de Pareto para os ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado com ácido e base**

Nota: Dados extraídos do software Statistica® 7.

Para esse conjunto de ensaio, de acordo com a análise estatística realizada, os valores que maximizaram a resposta estimada foram:

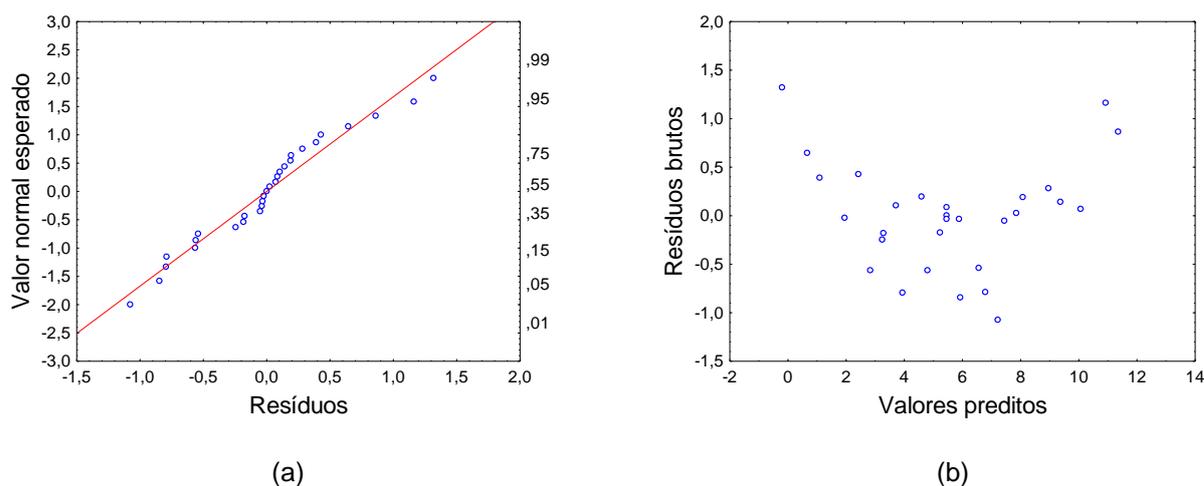
Concentração enzimática: 70,5 FPU/g

Temperatura: 52,2 °C

Tempo: 550,0 horas.

Apesar disso, é importante ressaltar que a associação dessas condições pode não resultar em valores muito mais elevados do que aqueles que podem ser obtidos em tempos menores, condições mais amenas e menores concentrações enzimáticas. Não necessariamente as condições máximas irão fornecer um acréscimo no valor de ART que justifique a operação.

Também foi possível verificar que o gráfico da probabilidade normalizada representado na Figura 30(a), apresentou pontos próximos à reta normal. Essa observação garante que os dados se ajustam devidamente ao modelo matemático encontrado. E que o gráfico de resíduos, Figura 30(b), apresentou pontos perfeitamente aleatórios, o que também garante que os dados experimentais se ajustam perfeitamente ao modelo matemático proposto.



**Figura 30 - Análise residual do tratamento estatístico realizado para o planejamento experimental utilizando bagaço de cana tratado com ácido e base. (a) Normalidade dos ensaios; (b) Resíduos da variável (ART) em relação às variáveis independentes**

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

Abaixo, na Figura 31, são apresentados os gráficos de superfície para as variáveis que apresentaram efeito significativo. Nos estudos dos gráficos, ao se correlacionarem as variáveis, foi observado que os formatos exibiam uma enorme semelhança.

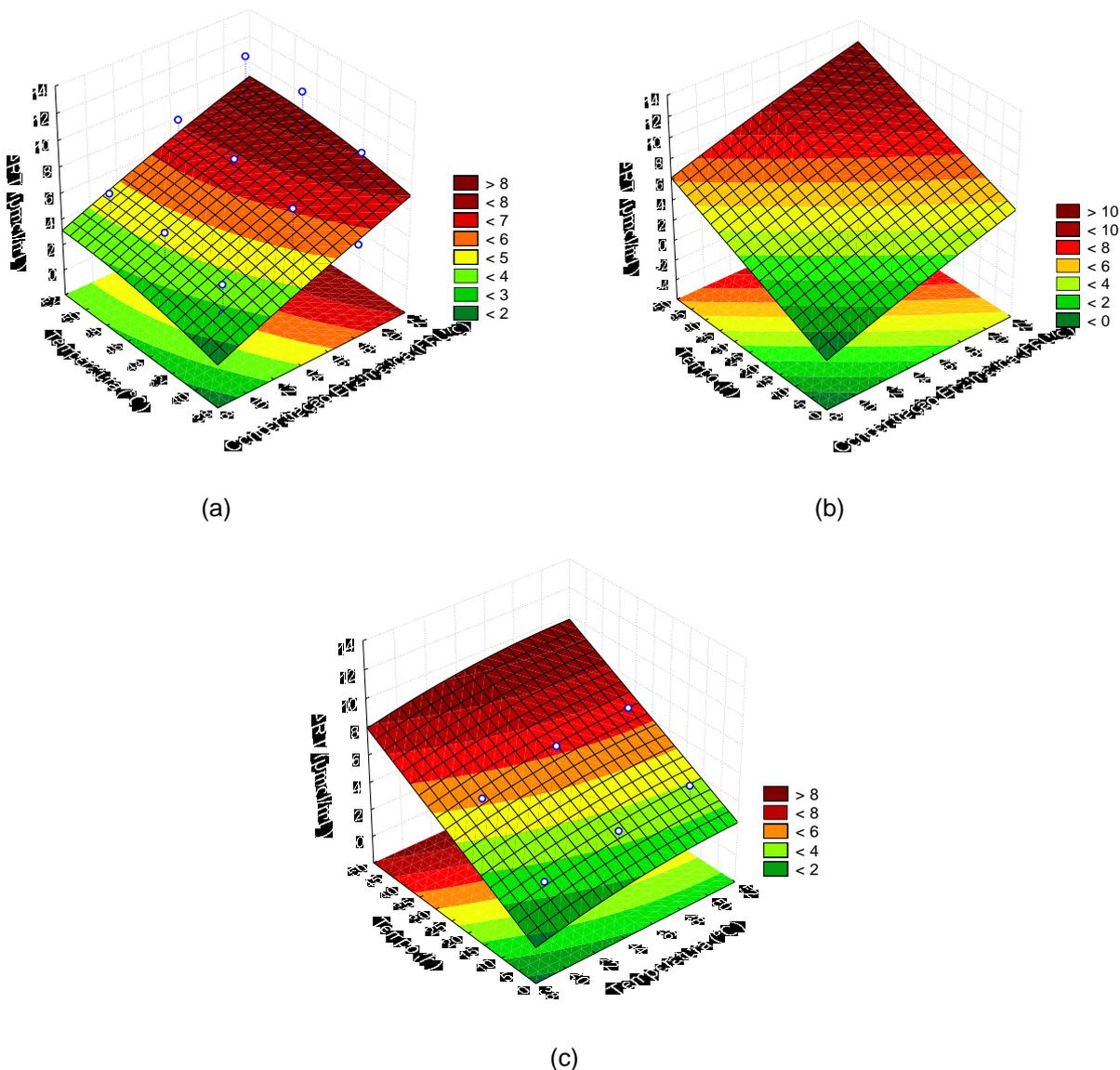


Figura 31 - Gráficos de superfície para ensaios realizados com bagaço pré-tratado com ácido e base. Análise ART formados: (a) Em função da temperatura e concentração enzimática; (b) Em função do tempo e concentração enzimática; (c) Em função da temperatura e tempo

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

Com base na Figura 31(a) pode-se afirmar que as combinações de valores elevados de temperatura e de concentração enzimática induzem a uma resposta significativamente maior em ART formado. Isso pode ser verificado por meio do gráfico de superfície que se apresentou na forma de um plano ascendente.

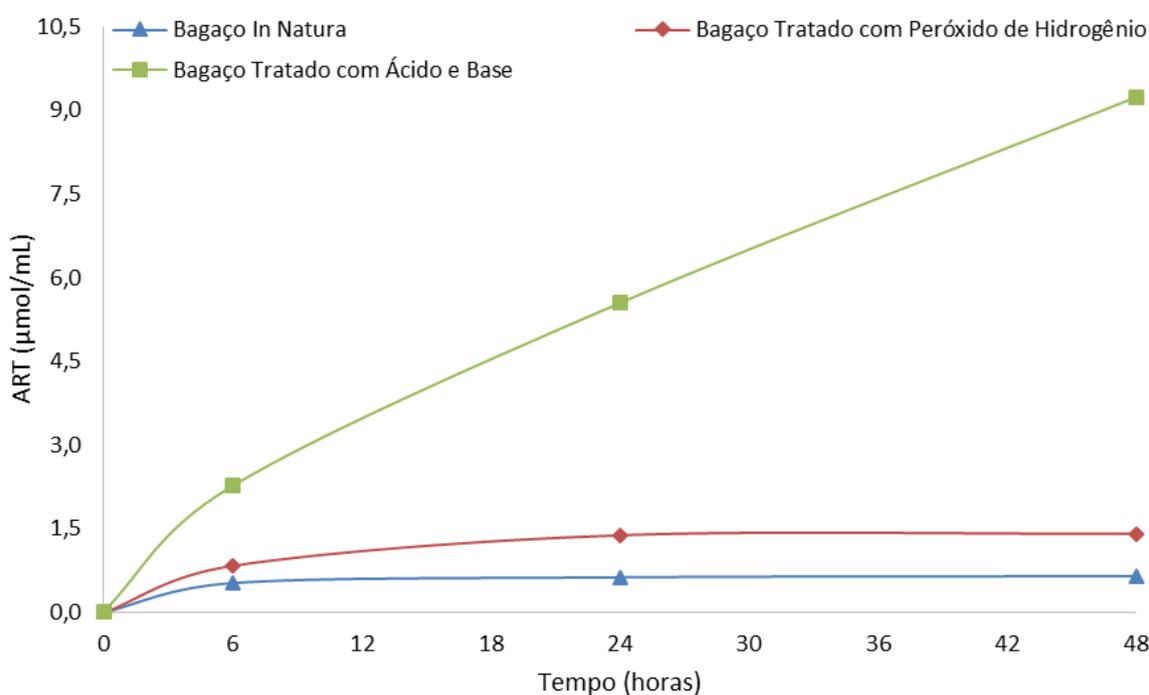
O mesmo pode se afirmar para a Figura 31(b). A combinação de um tempo maior e concentração enzimática elevadas leva a uma resposta significativamente maior em ART formado na hidrólise. Mais uma vez, o formato do gráfico de superfície confirmou o resultado por se apresentar na forma de um plano ascendente.

A Figura 31(c) também garantiu que a combinação de temperatura e tempo altos leva a uma resposta significativamente maior em ART. Pode-se, contudo, destacar que a partir de 45°C a temperatura aparenta deixar de ser um fator significativo quando comparada com variações no tempo de hidrólise, mantendo a concentração enzimática constante.

#### 6.5.1. COMPARAÇÃO DOS BAGAÇOS PRÉ-TRATADOS E IN NATURA UTILIZADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Foi realizada uma comparação do efeito do tratamento na formação de açúcares redutores totais com o tempo de hidrólise utilizando os dados de temperatura e concentração enzimática médios do planejamento experimental (45°C e 15 FPU/g<sub>bagaço</sub>) como base comparativa, como mostra a Figura 32.

Pode-se observar na Figura 32 que o bagaço de cana *in natura* alcançou um patamar na formação de açúcares redutores no tempo de 6 horas, apresentando a menor taxa de hidrólise quando comparado com as amostras tratadas. Tal fator pode ser explicado devido à estrutura lignocelulósica do bagaço que dificulta o acesso das enzimas ao conteúdo celulósico. A estrutura da lignina, por exemplo, presente na parede celular do bagaço da cana, é extremamente complexa (FANG et al., 2008) e confere impermeabilidade e resistência contra ataques microbianos além de estresse oxidativo dificultando acesso aos outros polímeros presente na biomassa (PÉREZ et al., 2002).



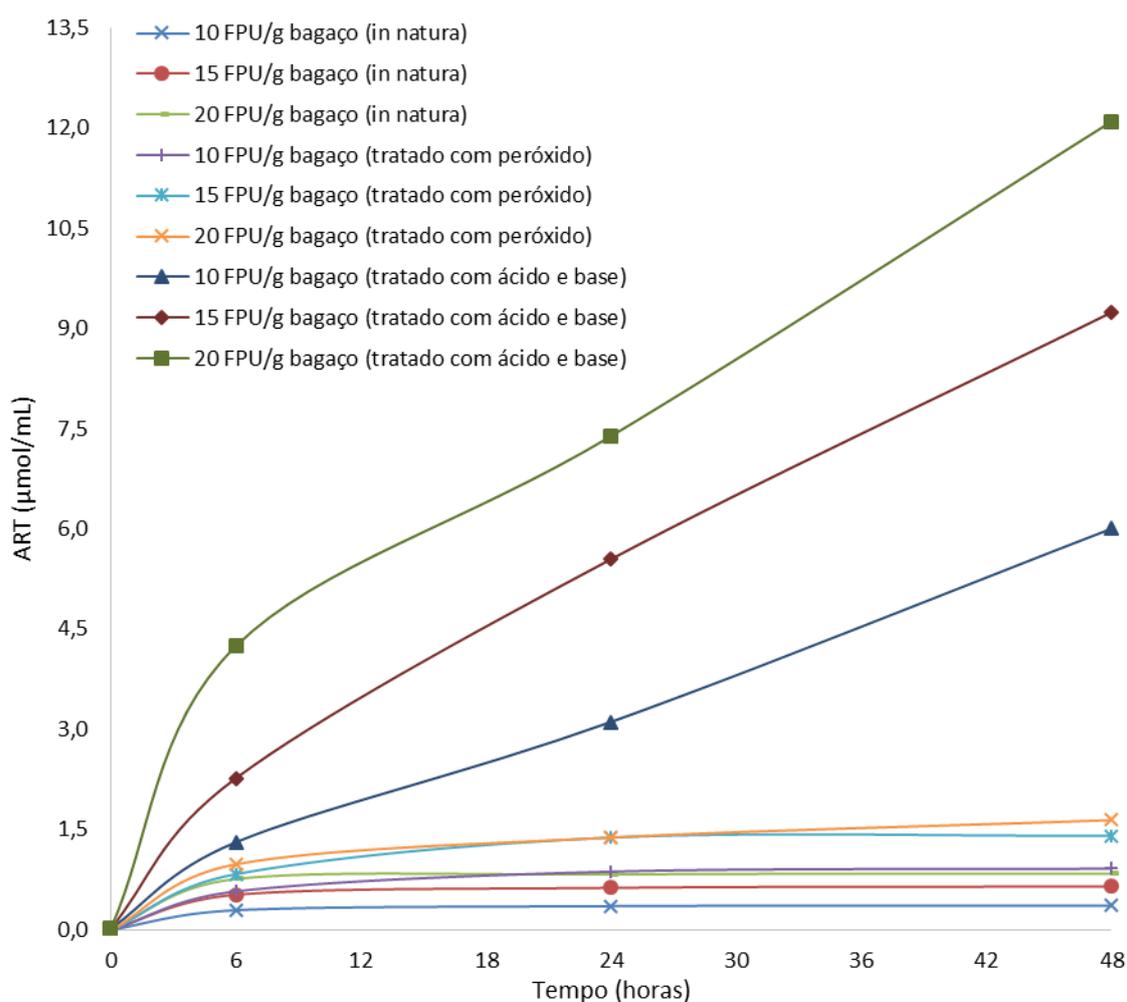
**Figura 32 - Comparação do efeito do pré-tratamento na formação de açúcares redutores totais com o tempo de hidrólise**

Nota: Elaboração do autor.

Já o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio apresentou taxa de hidrólise ligeiramente superior à do bagaço *in natura* nas primeiras horas. Embora ainda muito pequena a diferença, o patamar de produção de ART do bagaço pré-tratado com peróxido é ainda maior. Assim também foram os resultados encontrados por Nunes et al. (2011) que destacaram que os melhores valores encontrados na etapa de hidrólise para o bagaço tratado com peróxido foram no tempo de 24 horas do processo, e que praticamente não houve liberação de açúcares no bagaço sem tratamento.

No entanto, deve-se destacar a alta taxa de formação de ART na hidrólise do bagaço tratado com ácido e base. De acordo com Rabelo (2010), tal resposta indica o fácil acesso à celulose devido à eficácia de um bom tratamento da biomassa mediante o que é observado em termos de quantidade de ART formado, podendo ser visto no decorrer do trabalho conforme os resultados encontrados de formação de açúcar para o bagaço pré-tratado com ácido e base.

Também foi realizado estudo para diferentes concentrações enzimáticas com o objetivo de verificar qual concentração enzimática proporcionava melhor resultado na formação do açúcar redutor total com o decorrer do tempo. Na Figura 33 foram apresentados esses resultados por meio de comparação entre as concentrações enzimáticas para as diferentes amostras de bagaço e para temperatura de 45°C.

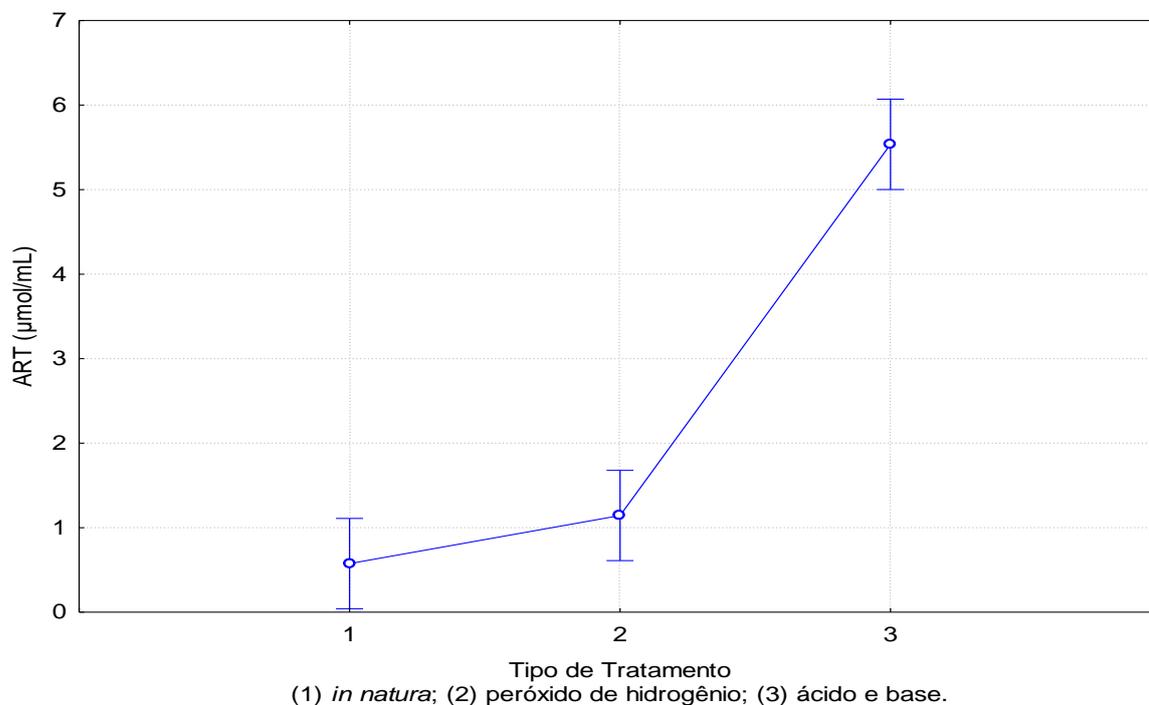


**Figura 33 - Comparação entre as respostas para diferentes amostras de bagaço e diferentes concentrações enzimáticas**

Nota: Elaboração do autor.

Foi possível perceber que somente as amostras do bagaço tratadas com ácido e base não alcançaram um patamar de formação de ART dentro do tempo de estudo (48 horas), apresentando ainda assim uma taxa constante de formação. Rueda (2010) também explica nos seus resultados que devido ao pré-tratamento com ácido e base ser eficiente, a hidrólise enzimática pode chegar a altas concentrações de açúcares no decorrer do tempo.

Ainda para os diferentes tipos de bagaço foram feitos estudos dos meios marginais e limites de confiabilidade, sendo estes apresentados na Figura 34.



**Figura 34 - Representação gráfica dos meios marginais e limites de confiança para os tipos de tratamento**

Nota: Dados extraídos do *software* Statistica® 7.

Através da representação gráfica dos meios marginais pode-se verificar que o pré-tratamento com ácido e base (índice 3 na Figura 34) apresentou resultados médios de formação de ART muito superiores aos das demais amostras estudadas. Tal comportamento também foi observado por Gomez et al. (2010) que estudaram o desempenho do pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e bases combinados para a liberação de açúcar fermentescíveis pela hidrólise enzimática.

Esse comportamento pode ser esclarecido visto que, por meio das etapas ácida e alcalina, a celulose presente no bagaço torna-se muito mais acessível ao ataque enzimático. Sun e Cheng (2002) ressaltaram que a celulose depois de degradada produz açúcares redutores que podem ser fermentados para a produção de etanol. Assim, portanto, a formação de açúcares é facilitada. Esse resultado pode justificar os custos com reagentes, equipamentos e condições operacionais na etapa de pré-

tratamento ácido básico, em uma unidade que deseja produzir etanol por meio da hidrólise do bagaço da cana.

Pode-se observar ainda que o bagaço da cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio apresentou resultados ligeiramente superiores aos apresentados pelo bagaço de cana *in natura*. Entretanto, ao analisar o limite de confiança experimental, é notório que os resultados superiores das amostras *in natura* equivalem a resultados inferiores que podem ser apresentados pelas amostras pré-tratadas com peróxido de hidrogênio. Tal fator indica que, apesar do pré-tratamento com peróxido ter deslocado a formação de ART para resultados ligeiramente superiores, essa diferença ainda não foi muito significativa. Tal conclusão leva ao questionamento da viabilidade da realização de uma etapa de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, uma vez que o mesmo não proporcionou um aumento tão considerável na quantidade de açúcar fermentescível formada.

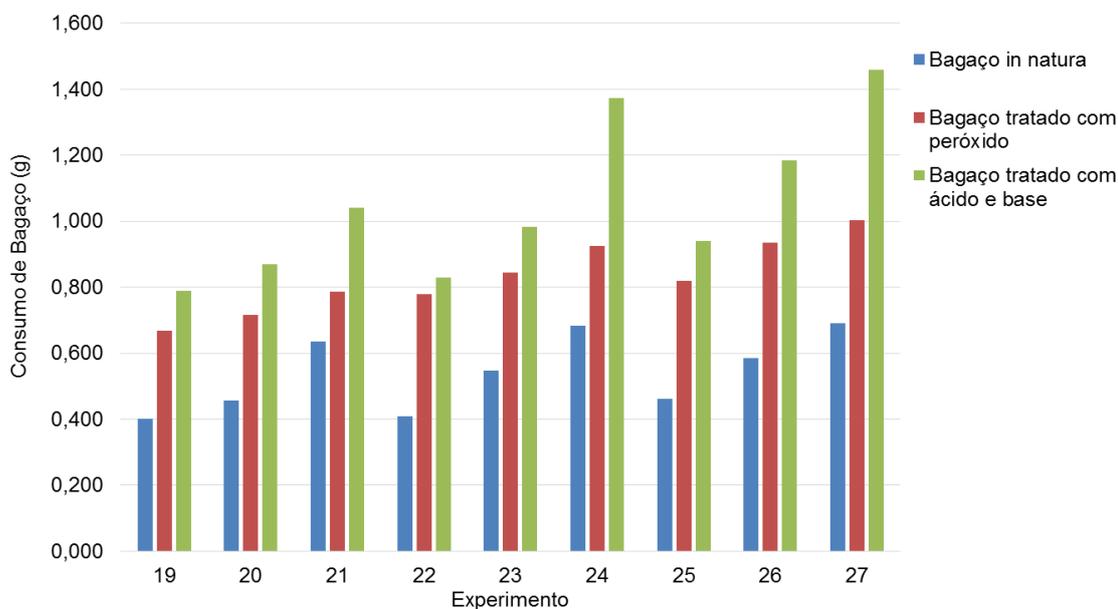
Embora a variável resposta tenha sido a quantidade de ART formado, outra análise de grande importância para a complementação dos resultados foi à realização da diferença de massa seca do bagaço antes e depois da hidrólise enzimática. Os resultados em massa são apresentados na Tabela 16, juntamente com o número correspondente ao experimento nas matrizes de planejamento experimental.

**Tabela 16 - Massa de bagaço de cana consumida na hidrólise enzimática para os experimentos realizados no tempo de 48 horas**

Concentração Enzimática (FPU/g)	Temperatura (°C)	Consumo de Bagaço de cana (g)		
		<i>In natura</i>	Tratado com peróxido	Tratado com ácido e base
10	40	0,400	0,668	0,790
10	45	0,458	0,716	0,870
10	50	0,635	0,786	1,040
15	40	0,408	0,780	0,830
15	45	0,548	0,844	0,982
15	50	0,683	0,924	1,372
20	40	0,463	0,818	0,940
20	45	0,585	0,936	1,184
20	50	0,690	1,002	1,458

Nota: Elaboração do autor.

Na leitura da Tabela 16 pode-se observar que o consumo mássico do bagaço de cana, para todos os experimentos, é superior para o bagaço tratado com ácido e base. Tal comparação pode ser mais bem compreendida pela Figura 35 que plota a média de bagaço consumida após a hidrólise enzimática.



**Figura 35 - Comparação do consumo total do bagaço da cana após 48 horas de hidrólise para as amostras do bagaço em estudo**

Nota: Elaboração do autor.

A média total, em gramas, do bagaço consumido para cada tipo tratamento denota não apenas a diferença entre os pré-tratamentos neste trabalho estudados, mas principalmente a perspectiva de continuar reaproveitando a massa do bagaço residual da hidrólise enzimática, visto que em nenhum deles toda a massa disponível de celulose foi digerida.

Ainda é importante destacar que, em média, o consumo do bagaço tratado com ácido e base foi cerca de 32% maior do que o do bagaço tratado com peróxido de hidrogênio, e cerca de 95% maior do que o do bagaço *in natura*. Esse resultado demonstra o potencial do tratamento combinando com ácidos e bases para a hidrólise enzimática, sugerindo uma perspectiva de uso para futuros trabalhos.

## 7. CONCLUSÃO

O bagaço da cana-de-açúcar estudado passou por dois tipos de pré-tratamentos químicos, um com peróxido de hidrogênio e outro com ácido e base. Foi realizado um estudo da composição química dos diferentes bagaço. Desses, o bagaço pré-tratado com ácido e base foi o que apresentou maior quantidade de celulose (62,5%), sendo este o componente que proporciona melhor rendimento da hidrólise enzimática. Em seguida foram realizados estudos de outras variáveis do processo.

O estudo estatístico dos experimentos permitiu verificar que os efeitos das variáveis concentração enzimática, temperatura e tempo intervêm na formação de ART na hidrólise. Tal fator pôde ser observado por meio do comportamento dessas variáveis na formação de ART através de combinações.

Para o bagaço *in natura*, a combinação: temperatura x concentração, enzimática demonstrou que maiores temperaturas combinadas com maiores concentrações enzimáticas proporcionavam melhores resultados na formação de ART. Na combinação das variáveis: tempo x concentração, enzimática foi visto que acima de 30 horas a quantidade de ART formado foi insignificante para qualquer concentração enzimática. E para a combinação: tempo x temperatura, foi notado que os resultados na formação de ART demonstraram ter alcançado um limite na formação de açúcar, sendo assim, o aumento de uma das variáveis não mais interferia no resultado

Já para o bagaço tratado com peróxido, a combinação: temperatura x concentração, enzimática demonstrou que a adição de enzimas foi bem mais significativa que o aumento da temperatura. Para o tempo x concentração enzimática, os resultados comprovaram que existe um limite de acréscimos para as duas variáveis. E para a combinação: tempo x temperatura, o tempo apresentou efeito predominante à temperatura (tempos entre 30 e 40 horas maximizaram a resposta).

Por fim, para o bagaço tratado com ácido e base, a combinação: temperatura x concentração enzimática apresentou uma projeção de gráfico ascendente que confirmava que o aumento de temperatura e concentração enzimática causava efeitos positivos na formação de ART durante a hidrólise. Para a combinação: tempo x concentração enzimática, mais uma vez foi exibido o modelo de gráfico

ascendente denotando que o aumento da quantidade de alguma das variáveis aumentaria também a quantidade de ART formado. E para a combinação: tempo x temperatura, novamente o perfil de gráfico ascendente foi mantido, entretanto, a partir de 45°C a temperatura demonstrou ser menos expressiva do que o tempo.

Através dos resultados estatísticos ainda pode ser observado que a quantidade de ART ( $\mu\text{mol/ml}$ ) produzida durante a hidrólise enzimática foi bem expressiva para o bagaço tratado com ácido e base aumentando significativamente o rendimento da etapa de hidrólise. O tratamento com ácido e base apresentou maior remoção de lignina e hemicelulose, o que facilitou sua digestão tornando mais eficiente os processos que dependeram do acesso facilitado à celulose, contudo, não se pode afirmar qual foi a quantidade de glicose por grama de bagaço formada durante o processo.

Já para o bagaço tratado com peróxido de hidrogênio e o bagaço *in natura* os resultados de ART formados foram bem próximos, o que significa que o tratamento com peróxido não demonstrou tanta eficiência quando comparado com o bagaço sem tratamento. Isso se deve ao fato do tratamento com peróxido de hidrogênio não ter conseguido romper as barreiras do material lignocelulósico de forma expressiva, dificultando assim o ataque enzimático à celulose.

Os resultados comprovaram que apesar do tratamento com peróxido ter deslocado a formação de ART para resultados ligeiramente superiores ao bagaço *in natura* essa diferença ainda não é muito significativa. Quando feita a comparação dos tratamentos utilizando dados de temperatura e concentração enzimática médios por meio dos dados do planejamento experimental, o bagaço *in natura* demonstrou alcançar somente um patamar na formação de ART no tempo de 6 horas, expondo a menor taxa de hidrólise e o bagaço tratado com peróxido próximo a 24 horas. Entretanto, a taxa de formação de ART na hidrólise do bagaço tratado com ácido e base foi bem mais significativa, sendo até mesmo possível concluir que as amostras de bagaço tratadas com ácido e base ainda não havia atingido um valor máximo de produção, sendo possível observar a formação de açúcar redutor além do tempo de estudo.

Outra análise que corrobora para afirmação dos resultados foi o cálculo da massa do bagaço da cana consumida na hidrólise enzimática realizados no tempo de 48 horas. Pode-se concluir que o consumo mássico de bagaço da cana foi superior para o bagaço tratado com ácido e base, sendo em média 32% maior do que o de bagaço tratado com peróxido de hidrogênio, e cerca de 95% maior do que o de bagaço *in natura*.

Tais conclusões levam a escolha por se realizar o pré-tratamento da biomassa celulósica com ácido e base combinados antes da hidrólise enzimática e para as variáveis deve-se considerar concentração enzimática de 20FPU/g, temperatura de 50°C e tempo de 48 horas, uma vez que a combinação dos mesmos proporcionou um aumento considerável na quantidade de açúcar redutor formado.

Além disso, o atual estudo apresenta novas perspectivas de utilização de materiais de baixo custo e com grande potencial energético frente ao alto valor agregado que possuem os subprodutos da cana-de-açúcar. Baseado no exposto é possível observar que o etanol de segunda geração tem papel primordial na segurança e proteção ambiental e climática e será decisivo na matriz energética futura.

## 8. RECOMENDAÇÕES:

A partir da avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho, recomenda-se para a direção de trabalhos futuros:

- Avaliar a influência da granulometria do bagaço da cana no desempenho da etapa de hidrólise (para meio submerso);
- Realizar a fermentação do ART formado para quantificação do rendimento total do processo em termos de etanol de segunda geração formado;
- Avaliar a viabilidade técnica e econômica para as condições ótimas estabelecidas no trabalho;
- Estudar o aperfeiçoamento das rotas tecnológicas para os processos de hidrólise;
- Caracterizar o caldo açucarado resultante da hidrólise em termos dos açúcares formados de forma a identificar os açúcares produzidos e quantificá-los;
- Caracterizar a massa residual com o objetivo de quantificar a fração celulósica não hidrolisada;
- Identificar e quantificar os inibidores formados nas etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

## 9. REFERÊNCIAS

- 1 ADNEY, B.; BAYER, J. Measurement of cellulase activities. **Chemical analysis and testing task – laboratory analytic procedure. National Renewable Energy Laboratory (NREL)**, LAP-006, 1996. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf>>. Acesso em: 20 out.2014.
- 2 AGÊNCIA INTERNACIONAL DE ENERGIA - AIE. **Emissões globais de CO<sub>2</sub> atingem recorde em 2014**. Disponível em: <<http://www.iea.org/>>. Acesso em: 22 out. 2014.
- 3 AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA - ANEEL. **Panorama do mercado nacional de agroenergia**, 2006. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/>> acesso em: 28 fev. 2014.
- 4 ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA DE COGERAÇÃO DE ENERGIA - COGEN. **Perspectiva da produção de etanol**. 2009. Disponível em <<http://www.cogen.com.br/>>. Acesso em: 01 mar. 2014.
- 5 BALANÇO ENERGÉTICO NACIONAL - BEM. **Participação de renováveis na matriz energética**, 2014. Disponível em: <<https://ben.epe.gov.br/>>. Acesso em: 20 out.2014.
- 6 BARBOSA, J.M.D. **Influência da areia argilosa na recuperação de petróleo por injeção de vapor**. 2009. 280f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2009.
- 7 BAYER, E. A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and /or a reclaimable natural resource? **Biodegradation**, v. 3, p. 171-188, 1992.
- 8 CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2003. 260p.
- 9 CAMASSOLA, M,; DILLON, A. J. P. Cellulases e xylanases production by penicilliumecghimulatum grown Sugar cane bagasse in solid-state fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v.162, p.1889-1900, 2010.
- 10 CÂNDIDO, R. G; GONÇALVES, A. R; ROCHA, G. J. Estudo da Hidrolise enzimática da Palha de Cana de açúcar. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18. 2011. Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Universidade Caxias do Sul, 2011. p.6-10.1 CD-ROM.
- 11 CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, n.9, p.1467-1475, 2011.

- 12 CARASCHI, J. C., **Estudo das relações estrutura/propriedades de carboximetilcelulose obtida por derivação de polpa de bagaço de cana de açúcar**. 1997. 188f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- 13 CARLI, C. M.; CRUZ, A. J. C.; SILVA, R. G., Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar com alta carga de sólidos para produção de bioetanol. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18, 2011. Caxias do Sul-RS. **Anais...** Caxias do Sul: Universidade Caxias do Sul, 2011. p. 6. 1 CD-ROM.
- 14 CASTRO, A. M. et al. High-Yield Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 Cultivated in Pretreated Sugarcane Mill Byproduct. **SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research**,v.1, n.1, p.1-8, 2010.
- 15 CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of cropresidues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.74, n.33, p.135-159, 1998.
- 16 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO–CONAB. **Avaliação da Safra agrícola de cana de açúcar**. Brasília, 2013. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 15 fev. 2014.
- 17 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO–CONAB. **Avaliação da Safra agrícola de cana de açúcar**. Brasília, 2014. Disponível em: <[www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)>. Acesso em: 15 fev. 2014.
- 18 COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocelluloses materials and substrates for enzymatic conversion processes. **BiotechnologyandBioengineeringSymposium**, v.6, p. 95-123, 1976.
- 19 DIAS, M. **Diversidade e produção de celulasas por bactérias epifíticas de frutos típicos do cerrado mineiro**. 2012. 111f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2012.
- 20 D'ALMEIDA, M.L.O. **Celulose e Papel: Tecnologia de fabricação de pasta celulósica**. , 2.ed.São Paulo: SENAI/IPT, 1988. v 1. 559p.
- 21 CÉSAR, E. D. Álcool de celulose. **Revista FAPESP**,v.133,p. 29-31.2007.
- 22 FAN, L. T., LEE, Y. H, GHARPURAY, M. M.The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis.**Adv. Biochem.**, v.23, p.157-187. 1982.
- 23 FANG, Z. et al. Reaction chemistry and phase behavior of lignin in high-temperature and supercritical water. **Bioresource Technology**, v.99, n.9, p.3424-3430, 2008.

- 24 FENGEL, D.; WEGENER, G.;  
Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using sem-  
edxa and tem. **Wood: chemistry, ultrastructure and reactions**, v.23 n.2, p.123-  
130. 1989.
- 25 FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 131f. Dissertação (Doutorado) – Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2007.
- 26 FILHO, J. M. M. A. **Análise enzimática de fungos lignocelulósicos cultivados em vinhaça e bagaço de cana de açúcar**. 2008. 80.f Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- 27 FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – FAPESP. **A segunda geração está chegando**. Revisa pesquisa online, 2014. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2014/10/09/segunda-geracao-esta-chegando/>>. Acesso em: 08 Nov. 2014.
- 28 GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H.; FAN, L. T. **Biotechnol. Bioeng.**, v.26, p. 426-433, 1983.
- 29 GHOSE, T.K Measurement of cellulose activities. **Pure Appl. Chem.** v.59, p.257-268, 1987.
- 30 GOMEZ, S. M. R. et al. Pretreatment of sugar cane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugars production by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 321-326, 2010.
- 31 GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural residues to enhance enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v.26, n.1, p.46-52, 1984.
- 32 GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.6, p.1500-1504, 2009.
- 33 GRAND, P. Biofuelling Brazil: An overview of the bioethanol success story in Brazil. **Biofuels**, v.7, n.3, p.53-59, 2006.
- 34 GUTIERREZ-CORREA, M. et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v.68, n.2, p.73-178, 1999.
- 35 HAHN-HÄGERDAL, B. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in biotechnology**, v.24, n.12, p.549-56, 2006.
- 36 HENRISSAT, B.; TEERI, T.T.; WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**, v.425, n.2, p.352-354, 1998.

- 37 HENRISSAT, B. et al. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesi* in the degradation of cellulose. **Bioresource Technology**, v.3, p.722-726, 1985.
- 38 HOLTZAPPLE, M. T. et al. Inhibition of *Trichoderma reesi* cellulose by sugars and solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v.36, p.275-287, 1990.
- 39 IMAI, M.; IKARI, K.; SUZUKI, I. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, p.79-83, 2004.
- 40 INSTITUTO EUVALDO LODI - IEL. **O Novo Ciclo da Cana: Estudo sobre a competitividade do sistema agroindustrial da cana-de-açúcar e prospecção de novos empreendimentos**. Brasília: SEBRAE, 2005. 344 p.
- 41 ITURRA, A. R. **Histórico das Microdestilarias de Álcool no Brasil**. Relatório apresentado ao Ministério de Desenvolvimento Agrário (MDA) e a Comissão Executiva do Biodiesel, coordenada pela Casa Civil da Presidência da República. 2006.
- 42 KANG, S. W. et al. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.91, p.153-156, 2004.
- 43 KAUR, J. et al. Purification and characterization of B-Glicosidase from *Melanocarpus* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.10, n.2, p.260-270, 2007.
- 44 LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, n.1, p.1-24, 1997.
- 45 LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I. S. **Wood structure and composition**. New York: Marcel Dekker. 1991. 488 p.
- 46 LIMA, D. A.; GOUVEIA, E. R. Aplicação de um planejamento fatorial na hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.14, n.3, p.275-280, 2011.
- 47 LIMA, J. L., SIQUEIRA, S. H., ARAÚJO, D. V. **Setor Sucoalcooleiro: Álcool**. Rio de Janeiro: BNDES, 1995. 8p, (Informe Setorial nº 5).
- 48 LUZ, S. M., **Estudo das propriedades mecânicas, interface e morfologia de compósitos de polipropileno reforçados com fibras de bagaço e palha de cana**, 153 f., Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.
- 49 LYND, L.R. et al. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, n.3, p.506-577, 2002.

- 50 MANDELS, M., REESE, E. T. Induction of cellulose in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals, **PubMed Commons**, v.73, n.2, p.269-278, 1956.
- 51 MAYRINK, C. B. M. I. **Produção de enzimas fúngicas e avaliação do potencial das celulases na sacarificação da celulose**. 2010. 81f. Tese (Doutorado). Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2010.
- 52 McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. A. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington: American Chemical Society, 1994, p. 411-437.
- 53 MILLER, G.L Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytic Chemistry**, v.31, n.3, p.31-33. 1959.
- 54 MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. **Plano Nacional de energia 2030**. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne\\_2030/PlanoNacionalDeEnergia2030.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne_2030/PlanoNacionalDeEnergia2030.pdf)>. Acesso em: 27 set. 2014.
- 55 MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. **Plano Nacional de energia 2007**. 2007. Disponível em: <[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne\\_2007/PlanoNacionalDeEnergia2007.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/publicacoes/pne_2007/PlanoNacionalDeEnergia2007.pdf)>. Acesso em: 25 set. 2014.
- 56 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE– MMA. **Proteção à camada de ozônio**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/clima/protecao-da-camada-de-ozonio>>. Acesso em: 20 out. 2014.
- 57 MONTAÑO, I. D. C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração**. 2013. 126f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2013.
- 58 MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J.M. **Procedimento para análise de Lignocelulósica**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. 54 p. (Embrapa Algodão/ Documentos, 236).
- 59 NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento alcalino (NAOH) do bagaço da cana de açúcar para produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 2011. 136f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- 60 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Committee on Biobased Industrial Products, Biobased Industrial Products**. Washington: National Academy Press, 1999.162p.

- 61 NOVA CANA. **Fluxograma dos Processos de Hidrolise: as três etapas do processo de produção do álcool a partir de materiais celulósicos**. 2015. Disponível em:<[http://www.novacana.com/images/estudos/figura\\_Y\\_processo\\_de\\_hidrolise.jpg](http://www.novacana.com/images/estudos/figura_Y_processo_de_hidrolise.jpg)>. Acesso em: 24 de ago.2015.
- 62 NUNES, J.M.N. et al. Estudo da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio. IN: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18.,2011. Caixias do Sul-RS. **Anais...** Caixias do Sul: Universidade Caixias do Sul, 2011. p.6.1 CD-ROM.
- 63 OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrolise enzimática de biomassa: revisão. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.
- 64 OLIVEIRA, C.C. S. dos. **Otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a alta concentração de sólidos para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas- SP, 2012.
- 65 OLIVEIRA, C. M. **Integração energética da biorrefinaria de cana-de-açúcar para produção de etanol de primeira e segunda geração e energia elétrica**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- 66 OLIVEIRA, M. P.; ALENCAR, J. R. de.; SOUZA, G. S. da. **Energia renovável: uma análise sobre oferta e demanda de etanol no Brasil**. IN: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL. 46. 2008. Rio Branco. Anais... Rio Branco: SOBER, 2008.p.1-6.
- 67 PAN, G. X., BOLTON, J. L., LEARY, G. J. Determination of ferulic and p-coumaric acids in wheat straw and the amounts released by mild acid and alkaline peroxide treatment. **Journal of agriculture and Food Chemistry**, v.46, n.2, p. 5283-5288, 1988.
- 68 PANDEY, A., SOCOOL, C. R., NIGAM, P., et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Cassava bagasse.**Bioresource Technology**. Amsterdam, v.74, n.69, p.81-87, 2000.
- 69 PEREIRA Jr. et al. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery.**Series on Biotechnology**, v.2 n.45.p.1-7, 2006.
- 70 PEREIRA Jr., N. Biotecnologia de Lignocelulósicos e o contexto de Biorrefinaria Associado. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ), 16. 2006. Santos-SP. **Anais...** Santos: COBEQ, 2006.p.24-27. 1 CD-ROM.

- 71 PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, v.2, n.5, p. 53-63, 2002.
- 72 PETROBRAS. **Energia e Tecnologia**. 2011. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br>>. Acesso em: agosto de 2014.
- 73 PITARELO, A. P. et al. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.35, n.8, p.1-8, 2012.
- 74 RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 150f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- 75 RABELLO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2010. 414f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- 76 RAMOS, L.P. The Chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p.863-871, 2003.
- 77 RIBEIRO, B. D. et al. Aplicação de Enzimas: Propostas para Disciplina Experimental. **Rev. Virtual Quim.**, v.5, n.5, p.27-28, 2012.
- 78 RIDESA. **Rede Interinstitucional De Desenvolvimento Do Setor Sucroalcooleiro**. 2005. Disponível em: <<http://www.ridesa.agro.ufg.br/>>. Acesso em: 03 mar. 2014.
- 79 RYU, D. D. Y.; MANDELS, M. Cellulases: Biosynthesis and Applications. **Enzyme and microbial technology**, v.2, p.91-102, 1980.
- 80 RUEDA, S. M. A. G. **Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 130f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2010.
- 81 SAAD, B. W. **Avaliação técnica e econômica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- 82 SANTOS, D. S. da. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando Biomassa lignocelulósica**. 2012. 243f. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

- 83 SANTOS, F. A. **Avaliação do pré-tratamento hidrotérmico de palhas de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. 2013. 94f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2013.
- 84 SANTOS, M. F. R. F; BORSCHIVER; S. COUTO, M. A. P. G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. **Economia & Energia**, v.15. n.82,p.1518-2932, 2011.
- 85 SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v.37, p. 19-27. 2012.
- 86 SILVA, V. F. N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 13f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2009.
- 87 SOUZA, V. M. Z. **Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico**. 2014. 57f. Monografia. Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
- 88 SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v.83, n.5, p.1-11, 2002.
- 89 TONON FILHO, R. J. **Modelagem e simulação em plantas de etanol: uma abordagem técnico-econômica**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Carlos, 2013.
- 90 UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA. Memória cana-de-açúcar. **Relatório Técnico, 2006**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
- 91 UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA DE AÇÚCAR - UNICA. **Memória cana-de-açúcar. 2014**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/faq/>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
- 92 WHEALS, A. E. et al. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnology**, v.17, n.12, p.482-487, 1999.
- 93 WYMAN, C.E. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. **Trends in biotechnology**, v.25, n.4, p.153-157, 2007.
- 94 ZAMPIERI, D. **Expressão do complexo celulolítico em *Penicillium echinulatum***. 2011. 113f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.
- 95 ZANDONÁ, F. A. **Modificação das qualidades processuais de fibras celulósica através do uso de enzimas**. 2001. 193f. Tese (Doutorado). Setor de Tecnologias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

- 96 ZHANG, Y.; XU, B.; ZHOU, W. On a Novel Mechanistic model for simultaneous enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicelluloses considering morphology. Wiley Periodicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v.111, n.9, p.1767-1781, 2014.

## APÊNDICE A - Curva Padrão - Método DNS

Com o gráfico plotado foi possível obter a equação da reta através da regressão linear e obter o coeficiente de correlação.

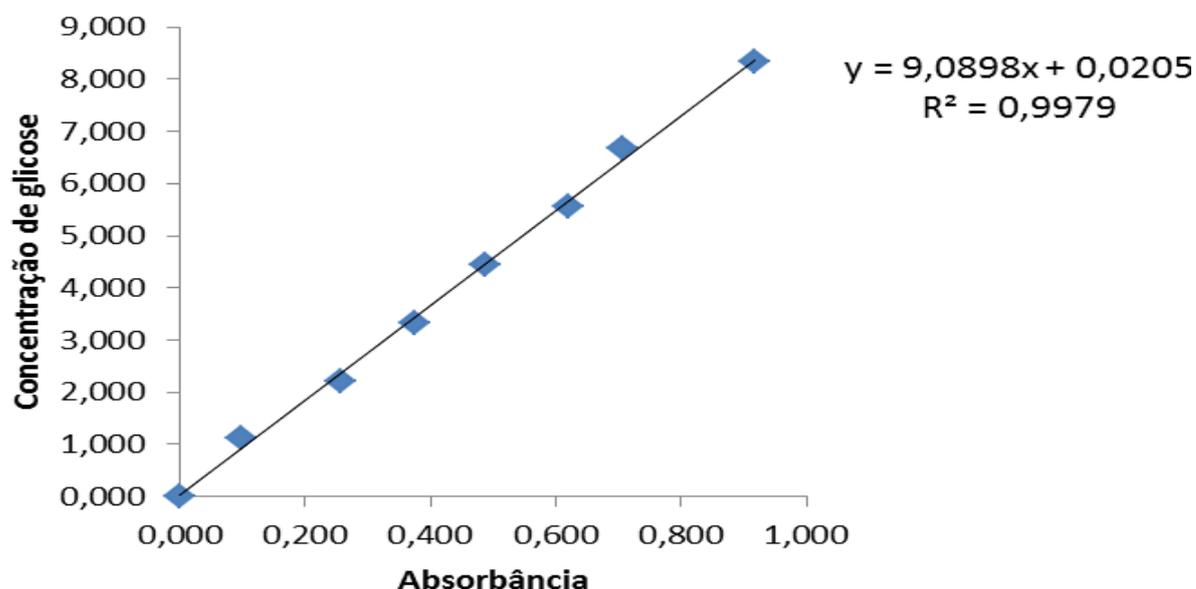


Figura 36 - Curva padrão da Glicose

Nota: Elaboração do autor.

A representação da equação se dá por  $y=a.x\pm b$ , no qual os valores das concentrações se encontram em  $\mu\text{mol/ml}$  sendo posteriormente manipulados utilizando a fórmula da atividade da enzima para cálculo de ART produzido.

É válido ressaltar que várias curvas-padrão de glicose foram construídas ao longo dos experimentos já que cada vez que uma nova solução reagente de DNS era preparada, uma nova curva era construída. Todavia, ao verificar que não haviam mudanças significativas nos valores da absorbância e no coeficiente de correlação a cada nova curva construída, a equação da reta demonstrada foi a mesma utilizada durante todo o trabalho, inclusive na etapa de hidrólise.