



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
GRANDE DO NORTE
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
QUÍMICA**



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Alan de Oliveira Campos

**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ACALINO NA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA PALHA DE
CARNAÚBA**

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.

Coorientador: Francinaldo Leite da Silva.

Natal, RN

2017

Alan de Oliveira Campos

**AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO ACALINO NA
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS RESÍDUOS DA PALHA DE
CARNAÚBA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de Engenheira Química.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.
Coorientador: Francinaldo Leite da Silva

Natal, RN

2017

DEDICATÓRIA

Á minha mãe, Magnira Souza de Oliveira Ribeiro, que me ensinou todos os princípios e bons valores e sempre acreditou em mim.

Agradeço a Deus todos os dias por tê-la como minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Maria, por tornar possível tudo que caminhei e irei caminhar. Agradeço a minha mãe, Magnira, e ao meu pai, Antônio, por me incentivar, auxiliar e acreditar durante toda minha graduação. Agradeço minha avó Djalмира e minhas tias Auta Maria e Magneide pela força e carinho e a meu tio-avô Dinarte e sua esposa Marlene, pelo carinho e suporte que vêm desde antes da graduação.

Ao meu companheiro Jonatha e Dona Flay (Flávia) por terem me acolhido com todo amor e carinho durante nos últimos 3 anos, me auxiliando nos momentos mais difíceis. Aos meus colegas e melhores amigos que alguém pode ter, Estéfani, Lucas e Rafael Guerra, por compartilhar e conviver todos esses 5 anos de luta, besteiras e muitas risadas. Espero que nossa amizade se estenda por muito além e, quem sabe, nos tornarmos colegas de trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica, especialmente a Cynthia K., Cínthia M., Carlos e todos os outros, pelo acolhimento e suporte desde 2014. Um agradecimento ainda mais que especial a Francinaldo, Davi, Júlia e a Emy, pelo conhecimento, convívio, amizade e risadas nestes últimos anos.

À Prof.^a Dra. Gorete Ribeiro de Macedo por ser minha orientadora durante toda a iniciação científica, pela confiança e exemplo profissional.

O meu muitíssimo obrigado à Francinaldo por me orientar neste trabalho de conclusão de curso, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo perfeccionismo durante este último um ano e meio. Sem você, nada desse trabalho teria se realizado.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Engenharia Química, em especial aos professores Everaldo, André, Eduardo, Humberto, Magna, Ruthinéia, Jackson e Gilson por serem exemplo de docentes e cientistas e me estimulando cada vez mais no universo da Engenharia Química.

Alan de Oliveira Campos – Avaliação do pré-tratamento alcalino na hidrólise enzimática do resíduo da palha de carnaúba. Trabalho de Conclusão de Curso, UFRN, Graduação em Engenharia Química, Natal/RN, Brasil.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.

RESUMO – A carnaúba (*Copernícia prunifera*) é uma palmeira típica do nordeste brasileiro cuja a principal atividade econômica associada é a extração do pó de cera. Esta atividade apresenta uma grande geração de resíduo rico em celulose, no que possui potencial para produção de Etanol de Segunda Geração. Entretanto, devido à alta carga de lignina e hemicelulose associados a celulose em uma estrutura complexa, o ataque enzimático é dificultado, sendo necessário um pré-tratamento adequado deste material. A utilização de bases no pré-tratamento de materiais lignocelulósicos leva ao intumescimento do mesmo, aumentando sua superfície interna e reduzindo a cristalinidade da celulose, e o rompimento das ligações entre a celulose e lignina. Sendo assim, o objetivo deste estudo está na otimização do processo de hidrólise enzimática do resíduo de palha de carnaúba, com foco no pré-tratamento da biomassa, aplicando soluções NaOH a concentrações de 1% (m/v) (PA1), 2% (m/v) (PA2), 3% (m/v) (PA3) e 4% (m/v) (PA4). As composições químicas das palhas de carnaúba *in natura* e pré-tratadas foram avaliadas segundo NREL, bem como as análises de DRX e FTIR. Os resíduos *in natura* e pré-tratados foram submetidos a hidrólise enzimática por um período de 96 horas. Os resultados da caracterização química dos materiais em estudos indicaram que os pré-tratamentos aplicados foram capazes de remover uma quantidade significativa de lignina e hemicelulose, o que pode melhorar a acessibilidade das enzimas favorecendo uma maior conversão da celulose. Em relação à análise de DRX, foi observado um aumento no índice de cristalinidade (IC) de 41,89% para o resíduo *in natura* para 48,93%, 50,75%, 53,97% e 55,15% para, respectivamente, os resíduos pré-tratados com NaOH 1%, 2%, 3% e 4%. Este comportamento pode estar associado à remoção da hemicelulose e lignina amorfa associada à celulose, melhorando a acessibilidade deste polissacarídeos às enzimas. Após a realização da hidrólise enzimática, os pré-tratamentos com concentração de NaOH igual ou acima 2% (m/v) favoreceram uma melhoria na conversão celulósica dos resíduos. Apesar de um desempenho pouco inferior o resíduo que apresentou maior conversão da celulose (o resíduo pré-tratado PA4), o material pré-tratado PA2 destacou-se como uma alternativa para redução de custos na produção de etanol celulósico. Desta forma, torna-se possível reduzir pela metade a massa de hidróxido de sódio e a quantidade de lavagens do material após o pré-tratamento.

Palavras chave: carnaúba, hidrólise enzimática, pré-tratamento.

Alan de Oliveira Campos – Evaluation of alkaline pre-treatment in the enzymatic hydrolysis of carnauba straw residue. Undergraduation final report, UFRN, Bachelor's degree in Chemical Engineering, Natal/RN, Brazil.

Advisor: Santos, Everaldo Silvino dos

ABSTRACT - The carnauba (*Copernicia prunifera*) is a typical Brazilian northeast palm tree whose main economic activity is the extraction of wax. This activity presents a great generation of residue rich in cellulose, in which it has potential for the production of Second Generation Ethanol. However, due to the high lignin and hemicellulose load associated with cellulose in a complex structure, the enzymatic attack it's difficult, and an adequate pre-treatment of this material is necessary. The use of bases in the pretreatment of lignocellulosic materials leads to its swelling, increasing its internal surface and reducing the crystallinity of the cellulose, and the rupture of the bonds between cellulose and lignin. The objective of this study was to optimize the enzymatic hydrolysis of the carnauba straw residue, focusing on the biomass pretreatment, applying NaOH solutions at concentrations of 1% (w/v) (PA1), 2% (w/v) (PA2), 3% (w/v) (PA3) and 4% (w/v) (PA4). The chemical compositions of the carnauba strains *in natura* and pretreated were evaluated according to NREL, as well as the DRX and FTIR analyzes. The *in natura* and pre-treated residues were subjected to enzymatic hydrolysis for a period of 96 hours. The results of the chemical characterization of the materials in studies indicated that the pre-treatments applied were able to remove a significant amount of lignin and hemicellulose, which can improve the accessibility of the enzymes favoring a greater cellulose conversion. In relation to the DRX analysis, an increase in the crystallinity index (CI) of 41.89% for the *in natura* residue was observed for 48.93%, 50.75%, 53.97% and 55.15% for, respectively, residues pretreated with NaOH 1%, 2%, 3% and 4%. This behavior may be associated to the removal of hemicellulose and amorphous lignin associated with cellulose, improving the accessibility of these polysaccharides to the enzymes. After the enzymatic hydrolysis, pre-treatments with NaOH concentration equal to or above 2% (w/v) favored an improvement in the cellulosic conversion of the residues. In spite of a slightly lower performance of the residue that presented higher conversion of cellulose (the pretreated PA4 residue), pre-treated material PA2 stood out as an alternative to reduce costs in the production of cellulosic ethanol. In this way, it becomes possible to halve the mass of sodium hydroxide and the amount of washes of the material after pretreatment.

Key words: carnauba, enzymatic hydrolysis, pre-treatment.

Sumário

Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2. 2. Objetivos Específicos	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Materiais Lignocelulósicos.....	14
3.2. A Carnaúba.....	15
3.3. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.....	17
3.4. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos	18
3.4.1. Pré-tratamento Alcalino.....	19
3.5. Hidrólise enzimática.....	20
3.5.1. Enzimas celulolíticas	21
3.5.2. Hemicelulases	22
4. METODOLOGIA	24
4.1. Matéria-prima	24
4.1.1. Pré-tratamento alcalino com NaOH.....	24
4.2. Caracterização física e química dos materiais lignocelulósicos <i>in natura</i> e pré-tratado	25
4.2.1. Determinação da umidade	25
4.2.2. Determinação de extraíveis.....	26
4.2.3. Determinação de cinzas totais	26
4.2.4. Determinação de polissacarídeos.....	27
4.2.4.1. Hidrólise ácido com H ₂ SO ₄ 72 %	27
4.2.4.2. Determinação do teor de lignina insolúvel	27
4.2.4.3. Determinação do teor de celulose e hemicelulose	28
4.2.5. Análise de Difração de Raios-X e cristalinidade.....	29

4.2.6. Análise das ligações estruturais por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	29
4.3. Determinação da atividade enzimática.....	30
4.3.1. Atividade enzimática utilizando papel filtro como substrato (FPase).....	30
4.3.2. Atividade enzimática da β -glicosidase.....	31
4.3.3. Atividade enzimática da xilanase.....	32
4.4. Hidrólise enzimática.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Pré-tratamento.....	34
5.2. Caracterização química do resíduo de palha de carnaúba <i>in natura</i> e pré-tratado.....	35
5.3. Caracterização física do resíduo de palha de carnaúba <i>in natura</i> e pré-tratado.....	39
5.4. Hidrólise enzimática.....	41
6. CONCLUSÃO.....	47
7. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

Lista de Figuras

Figura 3.1: Representação da organização estrutural da parede celular vegetal. Fonte: adaptado de MENON & RAO, 2012.....	14
Figura 3.2: Carnaúba (<i>Copernicia prunifera</i>). Fonte: do autor.....	16
Figura 3.3: Estrutura do material lignocelulósico antes e após a realização do pré-tratamento. Fonte: Adaptado de MOOD et al, 2013.	18
Figura 3.4: Modo de ação entre os vários componentes da celulase. Fonte: Adaptado de KAMAKAR & RAY, 2011.	22
Figura 5.1: Resíduo da palha de carnaúba (a) antes de ser moído, (b) após a moagem do material <i>in natura</i> , após da realização do pré-tratamento alcalino com soluções a concentrações de: (c) NaOH 1%; (d) NaOH 2%; (d) NaOH 3% e (d) NaOH 4%.	34
Figura 5.2: Porcentagem de remoção de celulose, hemicelulose e lignina após a realização dos pré-tratamentos alcalinos	37
Figura 5.3: FTIR dos resíduos de <i>in natura</i> e pré-tratados com NaOH a concentração de 1% (PA1), 2% (PA2), 3% (PA3) e 4% (PA4).	38
Figura 5.4: Difratoograma do resíduo de palha de carnaúba <i>in natura</i> (IN) e pré-tratado com NaOH nas concentrações de 1% (PA1), 2% (PA2), 3% (PA3) e 4% (PA4).	40
Figura 5.5: Concentração de açúcares redutores totais durante a hidrólise enzimática do resíduo de palha de carnaúba <i>in natura</i> e pré-tratados.	41
Figura 5.6: Concentração, em g/L, de açúcares produzidos durante a hidrólise enzimática do material <i>in natura</i> e pré-tratado, correspondendo a: (A) Celobiose; (B) Glicose; (C) Xilose e (D) Arabinose.	44
Figura 5.7: Conversão celulósica (%) após 96 horas de hidrólise enzimática do resíduo da palha de carnaúba <i>in natura</i> (IN), pré-tratado PA com NaOH 1% (m/v) (PA1), NaOH 2% (m/v) (PA2), NaOH 3% (m/v) (PA3) e NaOH 4% (m/v) (PA4).	45

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Componentes presente no hidrolisado e seus fatores de conversão. Fonte: autor.	28
Tabela 5.1: Caracterização química do resíduo da palha de carnaúba <i>in natura</i> e pré-tratado, expresso em base seca.	36
Tabela 5.2: Atribuições aos picos para os grupos funcionais e componentes da biomassa as quais estas atribuições estão relacionadas.	39
Tabela 5.3: Valores da taxa inicial de hidrólise para os resíduos <i>in natura</i> e pré-tratados.	42

1. INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é o material orgânico mais abundante no planeta, sendo encontrado em resíduos florestal e agrícola, o que o torna uma matéria-prima renovável, de baixo custo e de grande interesse na a produção de biocombustíveis e produtos químicos através de bioprocessos (RABELO *et al.*, 2011). A biomassa pode ser hidrolisada por enzimas para produção de glicose, a qual é convertida em etanol por fermentação (SHINGANIA *et al.* 2015). Entretanto, estes materiais possuem uma decomposição lenta, devido à alta carga de lignina e hemicelulose associados a celulose em uma estrutura complexa (KANSOH; ESSAM; ZEINAT, 1999).

A carnaúba (*Copernícia prunifera*) é uma palmeira típica do nordeste brasileiro, sendo diversas as suas aplicações e usos, dentre os quais a extração da cera da palha é a principal atividade econômica associada. Para tal, a palha é coletada a partir da poda da palmeira, não prejudicando a planta (CONAB, 2011). Apesar de ser considerada um exemplo perfeito da utilização dos recursos naturais, para produção da cera de carnaúba é necessária uma alta quantidade de palha levando a uma geração equivalente de resíduo agroindustrial (CARVALHO & GOMES, 2008). A palha da carnaúba é rica em celulose, entretanto associada a hemicelulose e lignina, dificulta a produção de enzimas celulolíticas por fungos filamentosos, sendo necessário seu pré-tratamento adequado (SILVA *et al.*, 2018).

A estrutura da celulose é formada por cadeias longas de D-glicose ligadas através de ligações de hidrogênio, podendo ser intramoleculares, conferindo uma rigidez às cadeias unitárias, ou intermoleculares, sendo responsáveis pela formação da estrutura supramolecular. Esta última estrutura resulta em regiões altamente ordenadas, as quais são chamadas de regiões cristalinas ou celulose cristalina (LENGOWSKI *et al.*, 2013). Além disso, há a presença de uma pequena parte de cadeias não organizadas, compreendendo a celulose amorfa, a qual é mais suscetível à degradação enzimática (PÉREZ *et al.*, 2002).

A produção de etanol celulósico ou Etanol de Segunda Geração requer o processo de hidrólise da biomassa para a conversão de celulose em açúcares fermentáveis. A hidrólise enzimática é a chave para uma produção de etanol viável a partir de substratos lignocelulósicos a longo prazo, por operar a condições brandas, possui potencial para um rendimento produtivo elevado e apresenta um custo de manutenção menor comparado à hidrólise ácida ou alcalina (KUHAD; SINGH; ERICKSSON, 1997). Entretanto, o alto custo e o baixo rendimento de produção de celulase são os principais fatores que limita o

desenvolvimento tecnológico para a conversão de lignocelulose em etanol (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos ocasiona a modificação dos componentes rígidos, os quais estão relacionados à lignina, celulose e hemicelulose, e resultam na redução do grau de cristalinidade, no que favorece condições adequadas do material antes da hidrólise (KARIMI & TAHERZADEH, 2016). Teoricamente, o pré-tratamento busca melhorar a reação de hidrólise enzimática, produzir o mínimo ou não gerar compostos inibitórios e exigir custos de capital e operacionais razoáveis, pelo baixo consumo de energia e desperdício mínimo (DRAPCHO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2012). Dentre os métodos aplicados, podemos destacar a utilização de bases no tratamento prévio da biomassa. Estes reagentes interagem com a lignina, levando à remoção deste componente. Vale ressaltar que o pré-tratamento alcalino opera em condições mais brandas que o pré-tratamento ácido, no que pode reduzir os custos de manutenção dos equipamentos devido à corrosão (KIM, Jun S.; LEE; KIM, Tae H., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Otimização do processo de hidrólise enzimática do resíduo de palha de carnaúba, com base na variação da concentração de reagentes utilizados no pré-tratamento da biomassa.

2. 2. Objetivos Específicos

- Determinar a composição química dos resíduos da palha de carnaúba *in natura* e pré-tratada;
- Avaliar as modificações estruturais do resíduo pré-tratado por meio de DRX e FTIR;
- Avaliar a influência de diferentes concentrações de NaOH sobre o resíduo de palha de carnaúba;
- Avaliar o desempenho da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados, utilizando o complexo celulolítico comercial Celuclast 1.5L.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são encontrados no resíduo agroindustrial, florestal e no resíduo sólido municipal. A biomassa lignocelulósica é composta por três unidades principais, sendo elas a celulose, lignina e hemicelulose (KUMAR *et al.*, 2009).

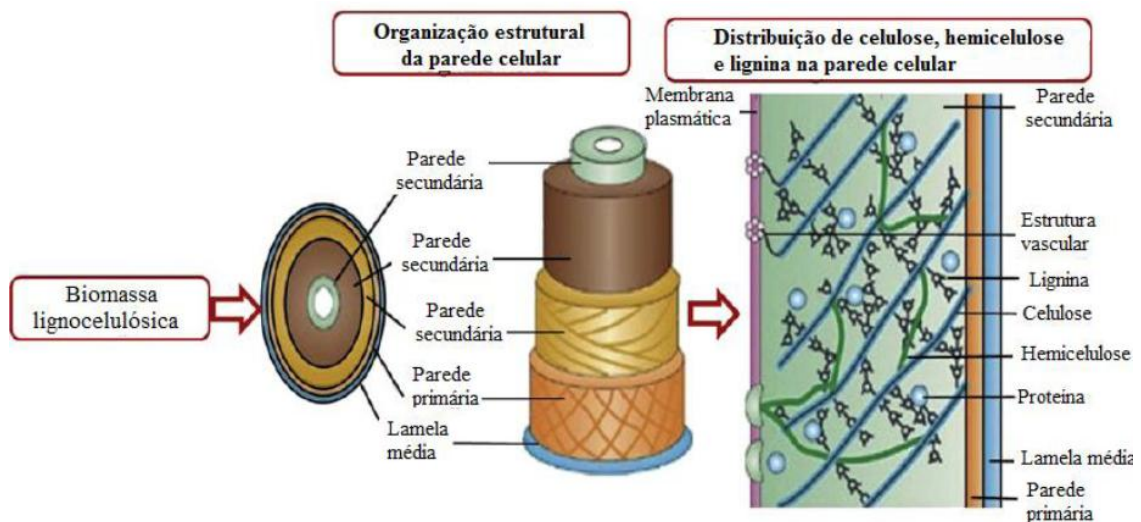


Figura 3.1: Representação da organização estrutural da parede celular vegetal.

Fonte: adaptado de MENON & RAO, 2012.

A celulose é um importante componente estrutural das paredes celulares vegetais por conferir resistência mecânica (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014). Este polímero linear é composto por unidades de D-glicose ligadas por ligações β -1,4 glicosídicas formando assim dímeros de celobiose. Estas formam longas cadeias (chamadas fibrilas elementares) são ligadas entre si por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. A fibra de celulose é constituída por microfibrilas as quais estão ligadas à hemicelulose e a lignina, também formadas por fibrilas elementares. A celulose pode aparecer na forma cristalina, também chamada de celulose cristalina, a qual é menos susceptível à degradação enzimática (PÉREZ *et al.*, 2002).

A hemicelulose, presente na parede celular secundária das células vegetais, são polímeros ramificados heterogêneos formados por pentoses (β -D-xilose, α -D-arabinose), hexoses (β -D-manose, β -D-glicose, α -D-galactose) e/ou ácidos orgânicos (ácidos α -D-glucurônico, 4-O-metilglucurônico, α -D-galacturônico) (GÍRIO *et al.*, 2010). Por apresentar

ramificações e uma maior parte amorfa, além de possuir um peso molecular menor, a hemicelulose é relativamente mais fácil ser degradada por hidrólise em relação à celulose (LI *et al.* 2010).

A lignina é composta por três álcoois aromáticos (álcool coniferílico, sinapílico e p-cumarílico) produzido através de um processo biossintético e forma um selo físico ao redor de outros dois componentes, a celulose e a hemicelulose (CALVO-FLORES & DOBADO, 2010). A lignina está presente na parede celular, conferindo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (PÉREZ *et al.*, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são considerados como uma matéria-prima promissora para a produção de biocombustíveis, levando-se em conta a disponibilidade da biomassa, a relação de consumo e produção energética, viabilidade econômica e rendimento de produção do etanol (SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, 2015). Infelizmente, maior parte desta biomassa é geralmente queimada para descarte ou utilização do calor para outros processos. (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

3.2. A Carnaúba

A carnaúba (*Copernicia prunifera*) é uma palmeira típica da Região Nordeste do Brasil, encontrada principalmente em ambientes com solos argilosos, margens de rios, suportando lugares alagados e com elevados teores de salinidade, comum na região da Caatinga. Possui uma distribuição geográfica nos Estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte, podendo ser encontrada em menor densidade no Tocantins, Goiás, no Norte de Minas Gerais e vale do São Francisco. Suas aplicações e usos são diversos, dentre os quais estão a extração do pó cerífico, óleos essenciais, a palha e ornamentação (MAPA, 2012).

Figura 3.2: Carnaúba (*Copernicia prunifera*).



Fonte: do autor.

A cultura da carnaúba é um exemplo perfeito da utilização dos recursos naturais: o corte da palha trata-se de uma poda, não prejudicando a planta e ainda retardando o seu envelhecimento. A secagem da palha é realizada por luz solar e em seguida é extraído um dos seus principais subprodutos, o pó cerífico. Além disso, é uma fonte de madeira através da utilização de seus troncos em construções de residências rurais, currais, postes e outras estruturas (CONAB, 2011). Sendo assim, verifica-se que a carnaúba é um recurso natural que possui vários valores de uso, satisfazendo necessidades diversas da população, principalmente do meio rural resíduo (CARVALHO & GOMES, 2008).

A bagana é o resíduo agroindustrial da palha de carnaúba depois de seco ao sol por um período de 6 a 12 dias, para a extração do pó (ALVES & COELHO, 2006). A forragem apresenta alto teores de fibra e baixos níveis de digestibilidade, o que contribui para o seu baixo consumo como ração animal (GOMES *et al.*, 2009). Além disso, em análise econômica da produção da cera, para a produção de 7,8 kg de pó de cera, são necessárias 1.000 palhas, no que gera um grande volume de resíduo (CARVALHO & GOMES, 2008).

O resíduo da palha de carnaúba é rico em celulose, sendo uma alternativa fonte de carbono em processos biotecnológicos, o que tem sido uma solução adequada na reutilização de materiais lignocelulósicos. Desta forma, o seu aproveitamento, por exemplo, na produção

de etanol de segunda geração, reduziria os danos causados ao meio ambiente e agregaria valor ao mesmo.

3.3. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos

Um dos maiores desafios do século XXI está em atender à crescente demanda de energia para transporte, aquecimento e processos industriais aliados ao fornecimento de matéria-prima para indústrias química para produção de energia em uma rota sustentável. Os biocombustíveis surgem como uma alternativa ideal de forma a cumprir aos critérios estabelecidos no cenário atual (SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, 2015).

Há alguns anos, países incluindo o Brasil e Estados Unidos (EUA) têm promovido a produção doméstica de bioetanol. O Etanol ou Bioetanol de Primeira Geração é feito a partir de matérias primas ricas em açúcar, tais como o suco da cana-de-açúcar (no Brasil) e melão (na Índia), ou ricas em amido, como o milho (nos EUA) (GOLDEMBERG & GUARDABASI, 2009). Apesar dos investimentos em inovação e tecnologia na produção de Etanol de Primeira Geração, as culturas de matéria-prima competem com a indústria alimentícia, são insuficientes diante da crescente demanda de combustíveis, têm impacto negativo na biodiversidade e podem levar ao desmatamento florestal para aumento de terras agrícolas (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

Nesta conjuntura, observou-se um alto interesse no desenvolvimento de Etanol de Segunda Geração ou etanol celulósico produzido a partir de materiais lignocelulósicos não-comestíveis, que incluem resíduo agroindustrial, madeira, papel e resíduo sólido municipal, e culturas energéticas, sendo o componente orgânico renovável mais abundante na biosfera (CLAASSEN *et al.*, 1999). A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica envolve diferentes etapas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação alcoólica (VAN ZESSEN *et al.* 2003). Durante a produção de etanol celulósico, a celulose presente na biomassa deve ser convertida em açúcares fermentáveis, que geralmente é realizada pela ação de ácidos ou enzimas celulolíticas. (FRANKS; BUROW; BURKE, 2006).

Em uma perspectiva mundial, verifica-se mais de 30 projetos de produção de etanol celulósico em escala comercial, dos quais 12 estão no Estados Unidos e apenas 2 no Brasil (SALLES-FILHO *et al.*, 2017). Ao comparar a inovação em relação ao bioetanol e o sistema tecnológico no Brasil e nos Estados Unidos, Sousa *et al.* (2016a, 2016b) pôde concluir que o Brasil ainda possui vantagens em relação aos EUA em termos de disponibilidade de matéria-prima (palhas, pedúnculos e outros talos do que cana de açúcar) e extensão de terra (menor

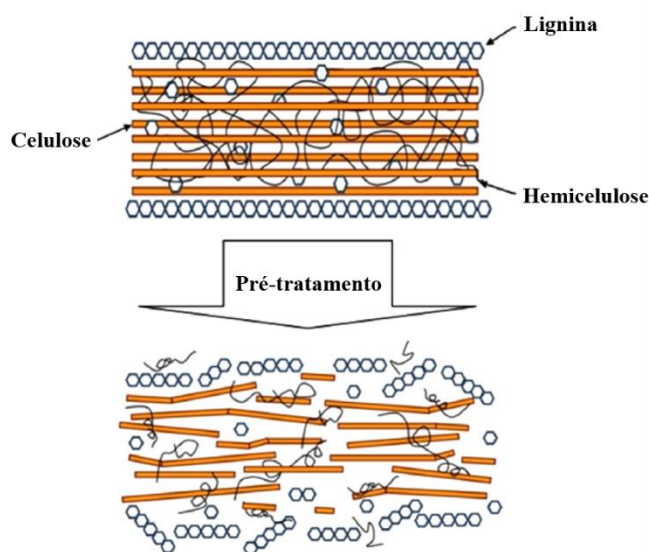
restrição sobre fornecimento de alimentos e mudanças no uso da terra). Desta forma, o investimento em pesquisa e inovação acerca da produção de Etanol de Segunda Geração encontra um terreno fértil para o desenvolvimento e criação de patentes SALLES-FILHO *et al.*, 2017).

Diante da atual estrutura do mercado brasileiro no setor sucroenergético, não há ameaças internas ou externas para entrada de novos mercados. Além disso, todo esforço para tal desenvolvimento comercial devem ser apoiados por políticas explícitas para tornar este produto uma mercadoria global (SALLES-FILHO *et al.*, 2017).

3.4. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos

Apesar da presença de carboidratos estruturais, os quais podem ser transformados em açúcares fermentescíveis, a presença de lignina e hemicelulose na parede dificulta a degradação dos polissacarídeos em açúcares simples. Logo, a produção de etanol celulósico a partir de biomassa lignocelulósica é limitada devido à sua composição, estrutura e teor de lignina e hemicelulose. Desta forma, torna-se necessário um pré-tratamento deste material, cujo objetivo está na modificação da estrutura cristalina e remoção das estruturas ligadas à celulose, aumentando a acessibilidade das enzimas celulolíticas à mesma (PHITSUWAN; SAKKA; RATANAKHANOKCHAI, 2016).

Figura 3.3: Estrutura do material lignocelulósico antes e após a realização do pré-tratamento.



Fonte: Adaptado de MOOD et al, 2013.

Aliando à exposição da celulose às enzimas celulolíticas, há dois efeitos de interesse observados no resíduo sólido pré-tratado: o aumento da superfície reativa e da porosidade da celulose para o ataque enzimático; e a redução da cristalinidade e da quantidade de lignina, minimizando as barreiras físicas e dificultando a inibição enzimática pela reassociação lignina-enzima (KIM, Jun S.; LEE; KIM, Tae Hyun, 2015). Nos últimos anos, vários métodos de pré-tratamentos têm sido desenvolvimentos, aos quais podemos destacar: pré-tratamentos físicos, tais como extrusão e moagem; pré-tratamentos químicos, incluindo o pré-tratamento ácido e alcalino; pré-tratamentos biológicos através do uso de microorganismos; e os pré-tratamentos físico-químicos. (AITA; SALVI; WALKER, 2011)

3.4.1. Pré-tratamento Alcalino

Diante do grande número de efeitos desejáveis no resíduo sólido pré-tratado, o pré-tratamento alcalino têm se destacado dentre os principais métodos aplicados. Entre os reagentes mais utilizados neste pré-tratamento incluem o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), amônia (NH_3) e peróxido de hidrogênio alcalino (H_2O_2). Estudos sobre o pré-tratamento com NaOH têm sido realizados desde os anos 90, visando aumentar a digestibilidade da celulose na alimentação animal. Por ser um dos catalisadores básicos mais fortes, a eficiência da utilização do hidróxido de sódio no pré-tratamento é evidenciada por uma maior produção de açúcares fermentáveis através da hidrólise enzimática, ao compararmos a outros pré-tratamentos alcalinos (KIM, Jun S.; LEE; KIM, Tae H., 2015).

O hidróxido de sódio ataca as ligações entre a lignina e hemicelulose do complexo lignina-carboidrato (CLC), levando à ruptura das ligações éter e éster desta estrutura. Desta forma, há a redução do grau de polimerização e cristalinidade, intumescimento das fibras e ruptura da estrutura da lignina. Além disso, a dissociação do hidróxido de sódio no cátion sódio (Na^+) e no ânion hidroxila (OH^-) leva a um aumento na velocidade de reação de hidrólise de acordo com o aumento da concentração de hidroxila (CHEN *et al.*, 2013; MODENBACH, 2013). Dentre as vantagens deste pré-tratamento estão as condições desejáveis para uma aplicação industrial, que inclui a baixa temperatura e pressão de reação, produtos químicos menos corrosivos em comparação ao tratamento ácido, a possibilidade de reuso da solução alcalina residual e a utilização de reatores mais simples (PHITSUWAN; SAKKA; RATANAKHANOKCHAI, 2016).

3.5. Hidrólise enzimática

A remoção da lignina e hemicelulose no tratamento da biomassa favorece a redução da cristalinidade da celulose e aumenta a porosidade do bagaço, levando à uma significativa melhora na hidrólise. Desta forma, pré-tratamento tem como vantagem o aumento da formação de açúcares ou habilidade para posteriormente formar açúcar a partir da hidrólise enzimática, além de evitar degradação ou perda de carboidrato e a formação de produtos inibidores dos processos subsequentes. (SUN & CHENG, 2002).

Apesar do destaque à aplicação de pré-tratamentos para produção eficaz de etanol celulósico, a hidrólise da biomassa é tida como uma etapa essencial para a geração de açúcares fermentáveis os quais são convertidos em etanol por ação microbiana. A hidrólise ácida e a hidrólise enzimática são os principais métodos aplicados, apresentando performances variáveis tendo em vista as condições do operacionais, do tipo de biomassa e propriedades dos agentes aplicados. O primeiro método corresponde à uma tecnologia madura, porém há a geração de resíduos ácidos de alto risco e apresenta dificuldades técnicas na recuperação do açúcar (SUKUMARAN *et al.*, 2009). Além disso, os ácidos podem degradar gradualmente os monômeros de açúcar recém-formados devido às condições severas de operação, tendo em vista a alta acidez do meio e temperatura operacional (ADITIYA *et al.*, 2016).

Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, apresentando uma melhor eficiência na geração de açúcares (RIBEIRO, 2010). As enzimas lignocelulolíticas atuam em condições moderadas, o que torna menor o custo para manutenção dos equipamentos ao compararmos com a hidrólise ácida, que ainda inclui um tratamento para o resíduo ácido gerado (MOSIER, N.; LADISCH, C.; LADISCH, M., 2002)

O processo de hidrólise enzimática é compatível com a maioria dos métodos de pré-tratamentos, entretanto materiais tóxicos às enzimas devem ser removidos ou realizar procedimentos de desintoxicação quando pré-tratamentos químicos antecedem ao processo (SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, 2015). Diante do alto custo das enzimas, a produção da hidrólise enzimática torna-se um desafio econômico para aplicação na produção do etanol celulósico e é considerada impraticável para propósitos comerciais (ADITIYA *et al.*, 2016).

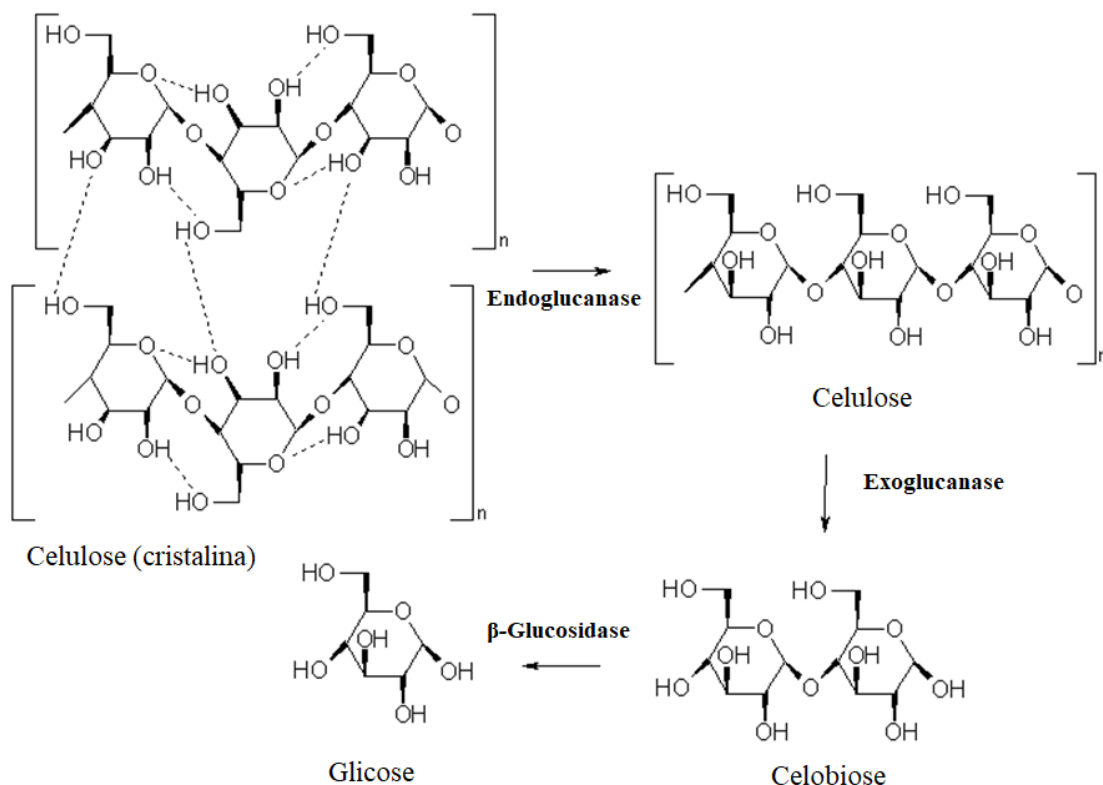
3.5.1. Enzimas celulolíticas

Os materiais lignocelulósicos é degradável diante da aplicação de enzimas tendo em vista seus principais componentes. As celulasas correspondem ao conjunto de enzimas específicas envolvidas na degradação da celulose sendo capazes de degradar romper as ligações glicosídicas β -1,4 presentes nas cadeias de glicose. Apesar de todas as enzimas reconhecerem estas ligações, verifica-se uma seletividade em relação aos diferentes sítios do substrato. Desta forma, o complexo de enzimas celulolíticas é classificada de acordo com o modo de ação catalítica e nas propriedades estruturais (SILVA, 2014).

De acordo com a ação enzimática das celulasas, a classificação se dá em três grupos majoritários (SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, 2015):

- Endoglucanases (EC 3.2.1.4), responsáveis por iniciar a hidrólise clivando ao acaso as ligações β -1,4 dentro da cadeia de celulose, reduzindo o tamanho da cadeia e liberando celobiose e celodextrinas;
- Exoglucanases (EC 3.2.1.91), atuando nas extremidades não redutores da cadeia das moléculas de celulose gerando dímeros de celobiose.
- β -Glucosidasas (EC 3.2.1.21), as quais hidrolisam a celobiose e outros β -1,4-oligoglucosídeos de cadeia curta liberando glicose.

Figura 3.4: Modo de ação entre os vários componentes da celulase.



Fonte: Adaptado de KAMAKAR & RAY, 2011.

A maioria das celulases microbianas comercialmente utilizadas é produzida pelas espécies *Trichoderma* e *Aspergillus* (ZHANG *et al.*, 2006). O custo destas enzimas são um fator importante na comercialização do etanol celulósico, entretanto algumas indústrias estão produzindo enzimas celulolíticas visando o aumento da atividade enzimática e redução de custo de produção (SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, 2015).

Diante de estratégias apropriadas, tais como a aplicação de combinação de métodos de hidrólise, seleção de matérias-primas e métodos de coleta (ADITIYA *et al.*, 2016) e utilização de um pré-tratamento adequado (em termos de rendimento, custo, exposição e alteração na estrutura da celulose, etc.), pode resultar em uma abordagem viável.

3.5.2. Hemicelulases

Para uma hidrólise completa, as hemicelulases, enzimas ainda mais específicas que as celulases, podem também atuar na degradação da hemicelulose presente nos substratos lignocelulósicos. Ao contrário da celulose, a hemicelulose é mais fácil para hidrolisar por apresentar uma estrutura mais amorfa (SIXTA, 2006). No grupo das hemicelulases, incluem-se enzimas tais como xilanases (EC 3.2.1.8), mananases (EC 3.2.1.78), β-xilosidases (EC 3.2.1.37) e β-manosidases (EC 3.2.1.25) (SILVA, 2014)

Segundo ADITIYA *et al.* (2016), as enzimas xilanolíticas são divididas:

- Endoxilanases (EC 3.2.1.8): quebram as ligações β -1,4 da xilana em pequenos fragmentos como xilotriose e xilobiose
- 1,4- β -xylosidases (EC 3.2.1.37): hidrolisam a xilobiose e oligossacarídeos em regiões não redutoras até a xilose.

As xilanases são produzidas por uma variedade de microrganismos, no entanto os fungos são os produtores principais. Atualmente, a produção de destas enzimas em escala industrial é dominada por espécies de *Trichoderma* e de *Aspergillus* (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). As enzimas xilanolíticas são amplamente utilizadas nas indústrias de papel e celulose, diminuindo o consumo de cloro orgânico e da demanda de oxigênio (OD), de forma à melhorar a qualidade das águas residuais. Além disso, elas são utilizadas no processamento de alimentos nas indústrias químicas e de celulose (SILVA, 2014).

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos podem levar a solubilização da hemicelulose, minimizando os custos com enzimas hemicelulolíticas (ROCHA, 2010). Vale ressaltar que a utilização destas enzimas é aconselhada apenas para materiais ricos em hemicelulose (como é o caso do resíduo da palha de carnaúba) devido ao efeito negativo dos açúcares liberados a partir deste polímero na atividade da celulase. Desta forma, um estudo na natureza do material torna-se necessário para uma melhoria no rendimento da hidrólise enzimática e na seleção do microrganismo adequado para agir como agente no processo de fermentação subsequente (ADITIYA *et al.*, 2016)

4. METODOLOGIA

4.1. Matéria-prima

O resíduo da palha de carnaúba foi cedido pela Organização Não-Governamental (ONG) “Carnaúba Viva”, localizada no município de Assu, RN. O resíduo foi lavado com água quente para remoção de partículas de materiais e em seguida foi levado a uma estufa para secagem à 50 °C por 24 horas. Após este período, foi realizado o processo de moagem e peneiramento do material a 20 Mesh, sendo finalmente armazenada em recipientes plásticos a temperatura ambiente.

4.1.1. Pré-tratamento alcalino com NaOH

O pré-tratamento alcalino (PA) foi realizado a partir da mistura de 20 % (m/v) do resíduo de palha de carnaúba *in natura* com soluções de NaOH. Foi realizado pré-tratamentos da biomassa utilizando soluções de hidróxido de sódio a concentrações de 1% (m/v), 2% (m/v), 3% (m/v) e 4% (m/v). Em seguida, a mistura reacional com NaOH e resíduo foi submetida ao tratamento térmico em autoclave a uma temperatura de 121 °C por 30 minutos e, posteriormente, o resíduo sólido resultante foi lavado até a água de lavagem atingir a um pH próximo ao neutro (pH 7,0). Vale ressaltar que as lavagens foram realizadas em batelada, em que foi adicionado porções de cerca de 1,5 L de água no material pré-tratado em uma bolsa de tecido personalizada e espremeu-o para remoção do resíduo líquido remanescente. O material pré-tratado foi seco em estufa a 50 °C por 24 horas e armazenado (SILVA *et al.*, 2018).

Após os pré-tratamentos do material, foi calculado o rendimento do processo de acordo com a Equação 1 abaixo.

$$R (\%) = \left(1 - \frac{M_{AT}}{M_{DT}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Sendo:

- R (%): percentual de rendimento do pré-tratamento;
- M_{AT} : massa do resíduo antes do processo de pré-tratamento (g);
- M_{DT} : massa do resíduo depois do processo de pré-tratamento (g).

Para uma análise sobre a quantidade de celulose, lignina e hemicelulose removida após o processo de pré-tratamento, foi determinada a percentagem de remoção destes componentes através Equação 2 a seguir.

$$GR (\%) = \left(1 - \frac{R \times X_i \times (1 - U) \times 100}{X_{INi} \times (1 - U_{IN})} \right) \times 100 \quad (2)$$

Em que:

- GR : percentagem de remoção de celulose, lignina ou hemicelulose após o pré-tratamento do resíduo;
- X_i : teor de celulose, lignina ou hemicelulose do material pré-tratado ($i = C, L$ ou H);
- X_{INi} : teor de celulose, lignina ou hemicelulose do material *in natura* ($i = C, L$ ou H);
- R_i : rendimento do pré-tratamento;
- U : umidade do material pré-tratado.
- U_{IN} : umidade do material pré-tratado.

4.2. Caracterização física e química dos materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratado

4.2.1. Determinação da umidade

A determinação da umidade do material em estudo foi empregada conforme a metodologia da National Renewable Energy Laboratory (NREL) (SLUITER *et al.*, 2008a). Depositou-se 1,5 g resíduo *in natura* e pré-tratado em um cadinho previamente pesado e tarado e, em seguida, levou-o a uma estufa a 105 °C por 24 horas. Após este período, o cadinho contendo a massa seca foi pesado e a umidade foi determinada a partir da Equação 3. Os ensaios foram realizados em triplicata, obtendo-se a média dos e seu desvio padrão.

$$U (\%) = \left(1 - \frac{M_s}{M_u} \right) \times 100 \quad (3)$$

Sendo:

- U (%): percentual de umidade;

- M_s : massa seca obtida pela diferença da massa do conjunto cadinho e amostra depois da secagem na estufa e o peso do cadinho (g);
- M_u : massa úmida obtida pela diferença da massa do conjunto cadinho e amostra úmida da secagem na estufa e o peso do cadinho (g).

4.2.2. Determinação de extraíveis

A determinação de extraíveis foi realizada pesando-se cerca de 2,0 g de resíduo *in natura* e pré-tratado em um cartucho previamente pesado. Em seguida, submeteu-se o tratamento do material utilizando o aparelho de Soxhlet, aplicando a cada 24 horas 70 ml de água deionizada a uma temperatura de 120 °C e álcool etílico 95%, a 80 °C. Após uma breve lavagem com álcool etílico no material sólido do cartucho, para remoção do excesso de extraíveis, o mesmo foi levado à estufa a 105 °C por 24 horas. O tubo de Soxhlet foi pesado e o teor de extraíveis foi calculada conforme da Equação 4 abaixo. Vale ressaltar que este método foi adaptado do protocolo da NREL em “Determination of Extratives in Biomass” (SLUITER *et al.*, 2005a).

$$E (\%) = \left(\frac{M_{Tf} - M_{Ti}}{M_S} \right) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

- E (%): o percentual de extraíveis;
- M_{Ti} : massa do tubo de Soxhlet antes da extração (g);
- M_{Tf} : massa do tubo contendo material residual de extraíveis após o processo (g);
- M_S : massa do resíduo de palha de carnaúba seca (g).

4.2.3. Determinação de cinzas totais

O conteúdo de cinzas totais foi determinado conforme ao protocolo “Determination of Ash in Biomass” da NREL (SLUITER *et al.*, 2005b). Pesou-se cerca de 1,5 g do material lignocelulósico em um cadinho previamente tarado e pesado e, posteriormente, o material foi digerido em uma mufla à 300 °C e calcinado à 800 °C de duas horas. O teor de cinzas totais foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$C (\%) = \left(\frac{M_c}{M_{bs}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Em que:

- C (%): o percentual de cinzas;
- M_C : massa de cinzas calculada pela diferença da massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio (g);
- M_{bs} : massa da amostra em base seca (produto da massa úmida do material e o teor de sólidos totais) (g).

4.2.4. Determinação de polissacarídeos

Para a determinação de lignina, celulose e hemicelulose foi aplicada a metodologia da NREL, “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin Biomass”, por SLUITER *et al.* (2008b).

4.2.4.1. Hidrólise ácido com H_2SO_4 72 %

Inicialmente, foi realizada hidrólise ácida do resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratada. Foi adicionado 3,0 mL de ácido sulfúrico 72 % em um Erlenmyer de 125 mL contendo cerca de 0,3 g de resíduo. O conjunto foi levado ao banho maria a 30 ± 3 °C por 1 hora, sendo feita a agitação da mistura a cada 10 minutos com o auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, adicionou-se 84,0 g de água deionizada, tendo o cuidado de limpar resíduo de mistura ácida agregado no bastão. A solução resultante foi submetida a um tratamento térmico em autoclave a 121 °C e 1 atm durante 1 hora. Após este período, foi realizada a separação dos sólidos e hidrolisado por filtração em um papel filtro seco previamente pesado.

O hidrolisado resultante foi filtrado com uma membrana de 0,22 μ m para remoção de sólidos insolúveis. As amostras foram armazenadas em geladeira para determinação dos teores de celulose e hemicelulose. O sólido contido no papel filtro foi lavado com água deionizada, seco a uma temperatura de 105 °C em uma estufa por 24 horas e em seguida foi determinado o teor de lignina do material. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.4.2. Determinação do teor de lignina insolúvel

Para a determinação do teor de lignina insolúvel do resíduo *in natura* e pré-tratado, foi necessário realizar a análise de cinzas do material sólido obtido na filtração após a hidrólise ácida. Desta forma, o sólido contido no papel filtro foi transferido para um cadinho previamente pesado e calcinou-se a amostra em uma mufla. Inicialmente, foi aplicada uma temperatura inicial de 300 °C para evitar expansão no interior da mufla, seguida elevou temperatura para 800 °C, mantendo-a por 2 horas. Após este período, foi medido a massa do

cadinho com material residual e o teor de cinzas da lignina insolúvel foi calculado através da Equação 6.

$$X_L (\%) = \left(\frac{M_{Sol.} - M_{Cinzas}}{M_{bs}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Em que:

- X_L : teor de lignina na amostra (%);
- $M_{Sol.}$: massa do material sólido obtido após a hidrólise ácida, calculada pela diferença da massa do papel filtro antes e após a lavagem (g);
- M_{Cinzas} : massa de cinzas, calculada pela diferença da massa do cadinho vazio e a massa do cadinho com cinzas após a calcinação (g);
- M_{bs} : massa da amostra em base seca (g).

4.2.4.3. Determinação do teor de celulose e hemicelulose

Para determinação dos teores de celulose e hemicelulose, utilizou-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para a identificação dos carboidratos e ácidos orgânicos presentes no hidrolisado.

Na cromatografia, fez-se o uso do cromatógrafo (Acela, Thermo Scientific) e a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co., Japan), operando a uma temperatura de 65 °C, tendo como fase móvel uma solução de ácido sulfúrico 5,0 mM a uma vazão de 0,6 mL/min. O volume injetado na coluna foi de 20 µm. Para a obtenção dos componentes monoméricos foram utilizadas curvas de calibração pré-definidas a cada componente analisado. Os fatores de conversão (Tabela 4.1) foram utilizados para determinação dos teores de celulose e hemicelulose.

Tabela 4.1: Componentes presente no hidrolisado e seus fatores de conversão. Fonte: autor.

Componente	Fator de conversão
Celobiose	0,95
Glicose	0,9
Xilose	0,88
Arabinose	0,9
Ácido Fórmico	3,09
Ácido Acético	0,98

Os teores foram calculados através Equação 7, conferindo para a celulose a quantidade glicose, celobiose e ácido fórmico no hidrolisado, enquanto que para a hemicelulose foi relacionado a composição referente à xilose, arabinose, furfural e ácido acético.

$$X_{C \text{ ou } H} = \frac{V \cdot \sum f_i \cdot C_i}{M_{bs}} \quad (7)$$

Sendo:

- $X_{C \text{ ou } H}$: porcentagem de celulose ou hemicelulose na amostra (%);
- V : volume de água adicionado na hidrólise ácida (L);
- f_i : fator de conversão do componente i relacionado ao respectivo polissacarídeo;
- C_i : concentração de componente i relacionado ao respectivo polissacarídeo (g/L).
- M_{bs} : massa da amostra em base seca (g).

A porcentagem de celulose ou lignina no resíduo de palha

4.2.5. Análise de Difração de Raios-X e cristalinidade

Para avaliar a cristalinidade dos resíduos *in natura* e pré-tratados, foi realizada a análise de difração de raios-X. A espectroscopia de DRX (XRD-6000, Shimadzu, Japão) utilizou-se $K\alpha$ de cobre de radiação, 30.0 kV de tensão e 15 mA de corrente eléctrica, com uma taxa de 2.0 graus por minuto para uma varredura contínua 2θ com intervalo de 4.0 - 70.0° aplicados. O índice de cristalinidade (IC) das fibras foi calculado de acordo com a Equação 8, segundo Gabhane (2014):

$$IC (\%) = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Em que:

- I_{002} : intensidade de difração do pico de 22.5°;
- I_{am} : a intensidade da linha de base que representa o pico de 18 °.

4.2.6. Análise das ligações estruturais por Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR foi utilizada para detectar a presença dos principais grupos orgânicos constituintes da lignina e hemicelulose e verificar a redução dos mesmo após os pré-tratamentos. A análise do FTIR utilizou espectros de absorção, a faixa espectral foi 400-4000

cm⁻¹ usando a Transformada de Fourier espectrofotômetro de infravermelho (65 Espectro de FT-IR, Perkin Elmer, EUA).

4.3. Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas foram convertidas em UI (µmol de produto liberado por minuto) através da Equação 9 abaixo:

$$UI = \frac{Di \times \Delta Abs \times Fat \times Vt}{t} \quad (9)$$

Sendo:

- UI : atividade enzimática da enzima (µmol/min);
- Di : diluição da solução de enzima, caso necessário;
- ΔAbs: variação da absorbância entre a da amostra e do tempo zero (A);
- Fat : fator obtido da curva padrão em (µmol/mL);
- Vt : volume total da mistura reacional (mL);
- t : tempo de reação (min).

Em seguida, a concentração da atividade enzimática foi expressa em UI/mL, calculada conforme a Equação 10:

$$Enz = \frac{UI}{Vs} \quad (10)$$

Sendo:

- Enz : a concentração da atividade enzimática (UI/mL);
- UI : atividade enzimática (µmol/min);
- Vs : volume do sobrenadante (mL)

4.3.1. Atividade enzimática utilizando papel filtro como substrato (FPase)

A concentração da atividade do complexo enzimático celulolítico de *Trichoderma reesei* (*Cellulase from Trichoderma reesei* ATCC 26921) foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia de Ghose (1987). Para tal, em tubos de ensaio, foi realizada a imersão de tiras de papel de filtro Whatman nº1 (1,0 x 6,0 cm), enroladas em forma espiral, em 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C por 1 min, antes da adição da solução do complexo celulolítico para equilíbrio da temperatura. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da

solução de enzimas cada tubo. O conjunto foi levado novamente para banho maria para reagir a 50°C por 60 minutos. Após este período.

Após a incubação, foi determinada a liberação de açúcares pelo método de DNS (MILLER, 1959). Sendo assim, transferiu-se 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 mL de DNS e colocada em água fervente por 5 minutos. Em seguida, a solução obtida foi resfriada em banho de gelo e adicionou-se 4,0 mL de água destilada em cada tubo. A absorvância da solução foi medida a um comprimento de onda de 540 nm e a concentração de açúcares redutores foi determinada usando-se uma curva de calibração.

O tempo zero na determinação da FPase refere-se à concentração inicial de açúcares redutores na solução do complexo celulolítico. Sendo assim, transferiu-se 0,5 mL desta solução a tubos contendo 1,0 mL de tampão citrato de sódio. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL dessa mistura em tubos contendo 0,5 mL do reagente DNS. Então, repetiu-se o mesmo procedimento para determinação de açúcares redutores citado anteriormente. O branco, utilizado para zerar o espectrofotômetro, consistiu na mistura de 0,5 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8 e 0,5 mL de reagente DNS.

4.3.2. Atividade enzimática da β -glicosidase

A determinação da atividade enzimática da β -glicosidase utilizada na hidrólise enzimática do material lignocelulósico em estudo foi realizada fazendo-se reagir 1,0 mL da solução do complexo celulolítico com 1,0 mL da solução de celobiose 15,0 mM (preparada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) em banho-maria a 50°C por 30 minutos. Após este período, os tubos foram colocados em água fervente por 5 minutos e resfriado em banho de água fria.

A determinação da concentração de glicose foi feita através do uso de um *kit* de análise de concentração de glicose baseado na reação das enzimas glicose oxidase-peroxidase. Desta forma, 10,0 μ L da mistura reacional foram pipetados em tubos de ensaio contendo 1,0 mL do reagente de glicose oxidase-peroxidase (BioSystems®). Os tubos foram incubados durante 10 minutos à temperatura ambiente (25°C). A absorvância obtida foi medida no espectrofotômetro a 500 nm.

A determinação concentração inicial de glicose consistiu em adicionar 1,0 mL da solução enzimática em tubos contendo 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. Em seguida, transferiu-se 10,0 μ L dessa mistura para tubos contendo 1,0 mL do reagente de

glicose oxidase-peroxidase para posterior leitura da absorbância. Para o branco, utilizou-se 1,0 mL do reagente de glicose.

4.3.3. Atividade enzimática da xilanase

Para a determinação da atividade enzimática da xilanase, foi adicionado em tubos de ensaio 1,0 mL de uma solução de xilana (1,0 %) em tampão acetato de sódio (5 mM e pH 5,0), sendo incubada a 50 °C por 5. Em seguida, foi realizada a transferência de 0,5 mL de sobrenadante enzimático com xilanase aos tubos contendo a solução de xilana. A reação ocorreu nas mesmas condições da incubação por 5 minutos.

Após a incubação, foi realizada a análise da liberação de açúcares conforme o método DNS (MILLER, 1959). Sendo assim, retirou-se 0,5 mL dessa mistura reacional e adicionou em tubos contendo 0,5 mL de DNS. Esses tubos foram imersos em banho de água fervente por 10 minutos e, após o resfriamento em banho de gelo, o volume foi completado para 5,0 mL com água destilada. A leitura das absorbâncias foi realizada a 540 nm.

Para a determinação do tempo zero, foi realizada uma mistura de 0,5 mL do sobrenadante e 0,5 mL do tampão acetato de sódio. Posteriormente, 0,5 mL dessa solução obtida foi transferida para tubos contendo 0,5 mL de reagente DNS, seguindo os mesmos passos do procedimento anterior. Por fim, o branco consistiu apenas na mistura de 0,5 mL da solução de xilana 1% e 0,5 mL de reagente DNS.

4.4. Hidrólise enzimática

Para a hidrólises enzimática do resíduo da palha de carnaúba pré-tratada e *in natura*, a metodologia aplicada foi baseada nos procedimentos descritos por Yang *et al.* (2015). O extrato enzimático comercial Celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (Celulclast 1.5L) foi utilizado para a hidrólise.

Em Erlenmeyers de 250 mL foi colocada uma carga de sólidos de 5% (m/v). As cargas enzimáticas utilizadas nos ensaios foram na proporção de 20,0 FPU/g de sólidos, 20,0 CBU/g de sólidos e 10,0 FXU/g de sólidos. Além disso, adicionou-se os reagentes tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) e azida de sódio 10 mM a uma concentração de 0,01 % (CHANG *et al.*, 2011), com a finalidade de fim prevenir o crescimento microbiano durante a hidrólise. Os frascos foram postos em incubador rotatório (*shaker*) sob agitação de 150 rpm, a 50 °C por 96 horas. As coletas foram realizadas a cada 3 horas nas primeiras 6 horas de hidrólise, seguida de uma coleta após 12 horas de reação. Por fim, foi coletado os pontos

referentes a 24, 48, 72 e 96 horas de hidrólise. Os frascos com as amostras foram imersos em água fervente durante 5 minutos para inativar as enzimas. Após o resfriamento, a fração líquida foi recuperada por meio da centrifugação a 3500 rpm durante 10 minutos, filtrado e armazenado a -20 °C. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

A quantificação da produção de açúcares redutores dos pontos da hidrólise coletados foi realizada através do método DNS (MILLER, 1959). Os açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose) foram determinados através de CLAE. A conversão celulósica foi calculada com base na Equação 11 a seguir, de acordo com Zhou et al. (2015):

$$C (\%) = \frac{Gp(g) \times 0,9}{C_0 (g)} \quad (11)$$

Sendo:

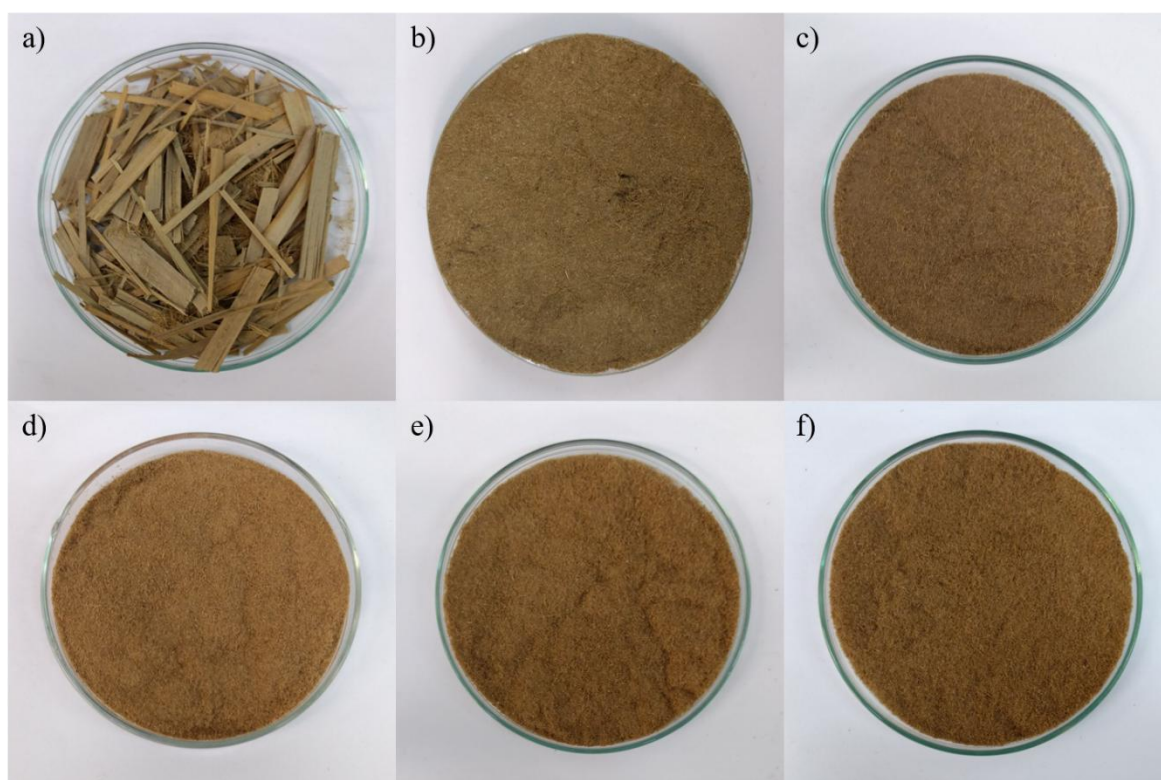
- C : percentagem da celulose convertida (%).
- Gp : glicose produzida, calculada pelo produto do volume utilizado na hidrólise (L) e a concentração de glicose (g/L) obtida no CLAE;
- C₀ : quantidade inicial de celulose presente no material sólido em base seca.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pré-tratamento

Conforme a sessão 4.1.1., visando analisar o efeito do pré-tratamento alcalino na produção de glicose a partir do resíduo de palha de carnaúba, foram realizados pré-tratamentos aplicando soluções de NaOH com concentrações diferentes. Na Figura 5.1, podemos observar o resíduo *in natura* antes e após o processo de moagem e após o pré-tratamento utilizando hidróxido de sódio.

Figura 5.1: Resíduo da palha de carnaúba (a) antes de ser moído, (b) após a moagem do material *in natura*, após da realização do pré-tratamento alcalino com soluções a concentrações de: (c) NaOH 1%; (d) NaOH 2%; (e) NaOH 3% e (f) NaOH 4%.



Fonte: do autor.

O pré-tratamento alcalino geralmente é utilizado para remoção de lignina por quebrar as ligações entre este componente e os demais carboidratos, melhorando o processo de degradação da celulose (JÖNSSON & MARTÍN, 2016). Após a realização deste processo, observa-se uma perda de massa devido a lavagem do material, a solubilização e a remoção dos componentes ligados à celulose, extraíveis, proteínas e até mesmo a própria celulose. A

Tabela 5.1 apresenta o rendimento de cada pré-tratamento alcalino e o número de lavagens realizadas após o tratamento térmico da mistura de solução de hidróxido de sódio com resíduo de palha da carnaúba.

Tabela 5.1: Rendimento dos pré-tratamentos alcalinos e quantidade de lavagens realizadas para obtenção de um material sólido com pH próximo ao neutro.

<i>Pré-tratamentos</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Quantidade de lavagens</i>
NaOH 1% (PA1)	64,20	21
NaOH 2% (PA1)	48,07	20
NaOH 3% (PA1)	44,97	23
NaOH 4% (PA4)	37,69	36

Verifica-se na Tabela 5.2 o pré-tratamento que obteve um maior rendimento foi o PA1, o que era esperado por ser aplicado uma concentração de NaOH inferior aos demais, tornando o pré-tratamento mais brando. Em contrapartida, o resíduo pré-tratado PA4, obteve o rendimento de aproximadamente 38% após o processo, sendo bastante inferior comparado aos demais resíduos pré-tratados PA2 e PA3, além da necessidade de uma maior quantidade de lavagens para regularização do pH desejado, gerando um grande volume de efluente.

5.2. Caracterização química do resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado

A biomassa lignocelulósica, apesar de uniforme, apresenta uma diversidade substancial na sua composição. Entre várias espécies, há diferenças significativas nas proporções de celulose, lignina e hemicelulose, ainda havendo diferenças no tipo de hemicelulose e/ou lignina presente. Vale ressaltar que fatores, incluindo as condições ambientais durante o crescimento, método de colheita e forma de armazenamento, podem favorecer a variação na composição química destes materiais (FARINAS, 2011). Diante a uma grande quantidade de espécies vegetais e dos tipos de materiais lignocelulósicos, verifica-se uma escassez dos relatos sobre a composição em alguns casos específicos, dentre os quais está a palha de carnaúba. Desta forma, antes do início de hidrólise tornou-se necessário a caracterização química e física do resíduo da palha de carnaúba *in natura* e pré-

tratado de acordo com a metodologia da NREL. Na Tabela 5.2, podemos observar os principais polissacarídeos na parede celular vegetal, assim como cinzas totais e extraíveis.

Tabela 5.1: Caracterização química do resíduo da palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado, expresso em base seca.

<i>Análises</i>	<i>Pré-tratamentos</i>				
	<i>In natura</i>	NaOH 1% (PA1)	NaOH 2% (PA2)	NaOH 3% (PA3)	NaOH 4% (PA4)
<i>Cinzas (%)</i>	10,29 ± 0,53	9,48 ± 0,12	6,35 ± 0,15	6,41 ± 0,06	3,03 ± 0,03
<i>Extraíveis (%)</i>	11,39 ± 0,48	1,46 ± 0,32	0,56 ± 0,04	1,00 ± 0,01	1,25 ± 0,42
<i>Celulose (%)</i>	21,59 ± 0,13	29,69 ± 1,80	38,48 ± 0,66	38,15 ± 0,18	46,63 ± 1,14
<i>Lignina (%)</i>	33,92 ± 0,57	26,79 ± 1,39	17,92 ± 1,56	24,63 ± 0,06	23,48 ± 0,70
<i>Hemicelulose (%)</i>	15,97 ± 0,74	17,00 ± 1,29	20,16 ± 0,61	19,94 ± 0,64	21,85 ± 0,67

Os extraíveis incluem uma série de substâncias as quais muitas vezes podem ser tóxicos, tais como os ácidos graxos, ceras e hidrocarbonetos (OLIVEIRA JUNIOR, 2014). Como base nos resultados observados na Tabela 5.2, verifica-se uma quantidade significativa de extraíveis no material *in natura*. Como material em análise trata-se da palha de carnaúba obtida após o processo de extração do pó cerífico, espera-se a presença de uma quantidade residual de cera. Após a realização dos pré-tratamentos, percebe-se que houve uma remoção quase que por completa de extraíveis.

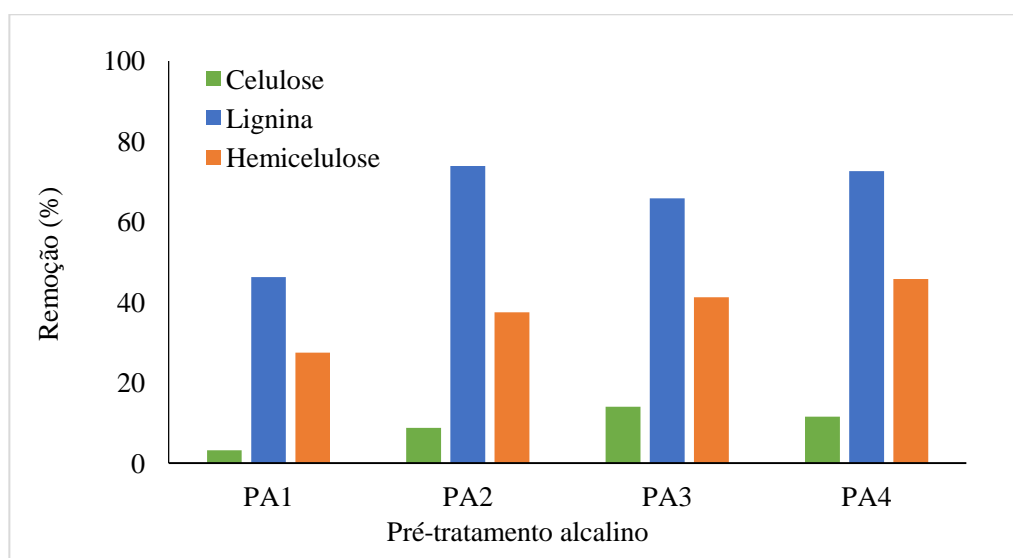
A palha de carnaúba é um material em potencial para a produção de etanol celulósico tendo em vista a sua composição, principalmente em relação à celulose que apresenta uma proporção de 21,5%. Entretanto, observa-se uma alta quantidade de lignina presente no material, cerca de 34 %, no que dificulta a ação das enzimas no processo de hidrólise enzimática. Desta forma, a aplicação do pré-tratamento torna-se possível a remoção da lignina e da hemicelulose, melhorando a acessibilidade das enzimas à celulose e reduzindo a cristalinidade da celulose.

Ao analisarmos a proporção de celulose, podemos verificar que após a realização dos pré-tratamentos aumento no teor deste polissacarídeo. Ao compararmos os pré-tratamentos em que aplicou as soluções de NaOH 2% (PA2) e NaOH 3% (PA3), vemos que estes valores foram praticamente os mesmos, sendo pouco acima de 38%. Para o resíduo de palha de

carnaúba pré-tratado com uma solução de concentração de NaOH 4% (PA4), o resíduo pré-tratado apresentou uma maior proporção de celulose com um teor próximo a 47 %.

Em relação à lignina, podemos afirmar que o pré-tratamento alcalino foi eficiente na remoção deste componente, tendo em vista a redução da sua fração na composição dos resíduos de palha de carnaúba após este processo. Além disso, observa-se um aumento nos teores de hemicelulose nos materiais pré-tratados, porém não significa que a estrutura do polímero não foi degradada durante o pré-tratamento. Dessa forma, a Figura 5.2 apresenta os valores obtidos a partir dos cálculos através da Equação 2, de forma que podemos comparar grau de remoção dos principais componentes do material lignocelulósico.

Figura 5.2: Porcentagem de remoção de celulose, hemicelulose e lignina após a realização dos pré-tratamentos alcalinos



Fonte: do autor.

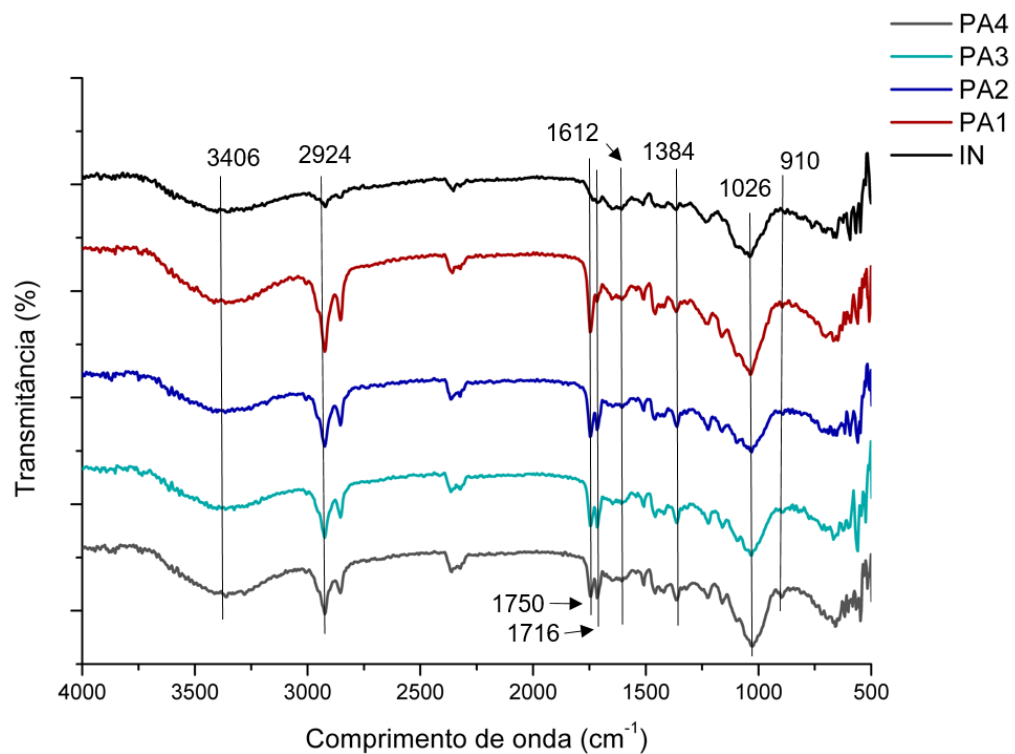
Ao avaliarmos a umidade do resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado com soluções de NaOH a concentrações de 1%, 2%, 3% e 4%, os valores encontrados foram, respectivamente, $10,91\% \pm 0,37$, $5,48\% \pm 0,25$, $8,17\% \pm 0,36$, $6,71\% \pm 0,62$ e $6,28\% \pm 0,28$.

A Figura 5.2 evidencia a remoção significativa da lignina ao aplicarmos soluções de NaOH igual ou acima de 2% no pré-tratamento do resíduo de palha, com a extração de aproximadamente 74% da lignina presente no material *in natura*. Apesar do aumento no teor de hemicelulose após os pré-tratamentos, podemos observar ainda na Figura 5.2 que houve uma remoção crescente diante do aumento da concentração de hidróxido de sódio no pré-tratamento da palha de carnaúba, apresentando retirada maior deste componente no material

pré-tratado PA4, com valores acima de 45%. É importante ressaltar que o referido aumento de celulose foi em termos proporcionais dos componentes. Já os valores calculados de remoção, leva em consideração o rendimento da biomassa após o pré-tratamento.

As análises de Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) tem o objetivo de detectar as alterações nas estruturas químicas e grupos funcionais dos componentes da biomassa lignocelulósica. Desta forma, foram realizadas análises de FTIR dos materiais lignocelulósicos antes e depois do pré-tratamento. A Figura 5.3 nos permite visualizar as bandas de absorção e comparar as diferenças de intensidade de cada um dos materiais.

Figura 5.3: FTIR dos resíduos de *in natura* e pré-tratados com NaOH a concentração de 1% (PA1), 2% (PA2), 3% (PA3) e 4% (PA4).



Fonte: do autor.

Binod *et al.* (2012) e Lu *et al.* (2014) reportaram perfis de transmitâncias de materiais lignocelulósicos, o que serviram como base para a análise das atribuições às bandas observadas na análise FTIR. Desta forma, foi possível elaborar a Tabela 5.3, buscando relacionar as atribuições os grupos funcionais e componentes da biomassa, dando destaque

nos picos em que foi observado diferenças entre a transmitância do resíduo *in natura* e pré-tratado.

Os espectros forneceram uma análise qualitativa da constituição dos materiais estudados. Desta forma, foi evidenciado as mudanças na estrutura da biomassa após o pré-tratamento, principalmente nos resíduos pré-tratados PA1 e PA3, em que se verifica uma diferença maior em relação ao espectro do resíduo *in natura* (Figura 5.3). Diante da determinação dos teores de polissacarídeos e os estudos de FTIR, os resultados indicam que os pré-tratamentos aplicados foram capazes de remover uma quantidade significativa de lignina e hemicelulose, o que pode melhorar a acessibilidade das enzimas favorecendo uma maior conversão da celulose.

Tabela 5.2: Atribuições aos picos para os grupos funcionais e componentes da biomassa as quais estas atribuições estão relacionadas.

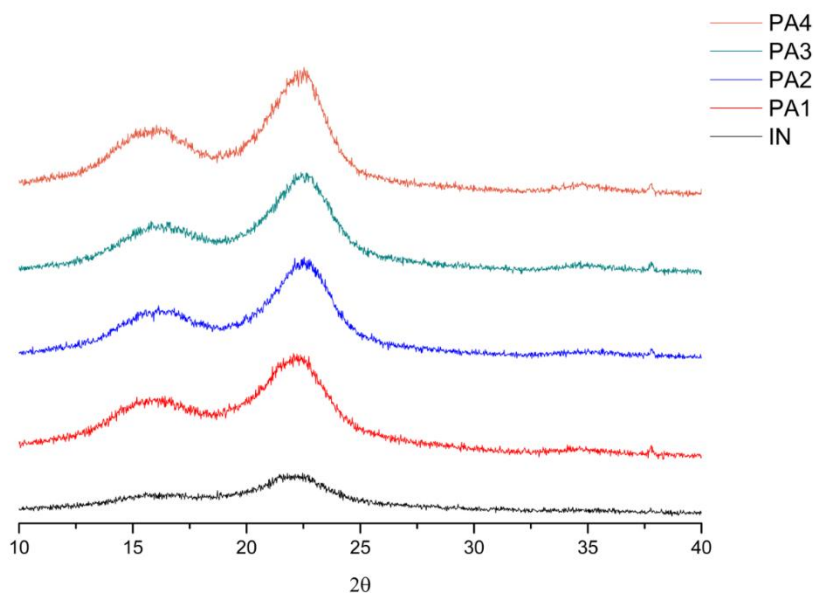
<i>Comprimento de onda (cm⁻¹)</i>	<i>Atribuições</i>	<i>Componente</i>
3406	Pontes de hidrogênio —OH	Celulose
2924	Alongamentos —CH	Celulose e hemicelulose
1750	Alongamentos C—O em ésteres, éteres e compostos fenólicos	Lignina
1716	C=O	Hemicelulose
1612	Alongamentos presentes em aromáticos C=C anéis	Lignina
1384	Deformação estrutural	Celulose e hemicelulose
1026	C—O	Celulose e hemicelulose
910	Ligações β(1-4) glicosídicas	Celulose

5.3. Caracterização física do resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado

Tendo em vista o efeito de pré-tratamentos na cristalinidade dos materiais lignocelulósicos, foram realizadas análises de cristalinidade dos resíduos de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratados. O índice de cristalinidade corresponde à proporção entre as regiões

cristalina e amorfa (LENGOWSKI *et al.*, 2013). A Figura 5.4 apresenta os difratogramas obtidos após a análise de DRX dos resíduos em estudo.

Figura 5.4: Difratograma do resíduo de palha de carnaúba *in natura* (IN) e pré-tratado com NaOH nas concentrações de 1% (PA1), 2% (PA2), 3% (PA3) e 4% (PA4).



Fonte: do autor.

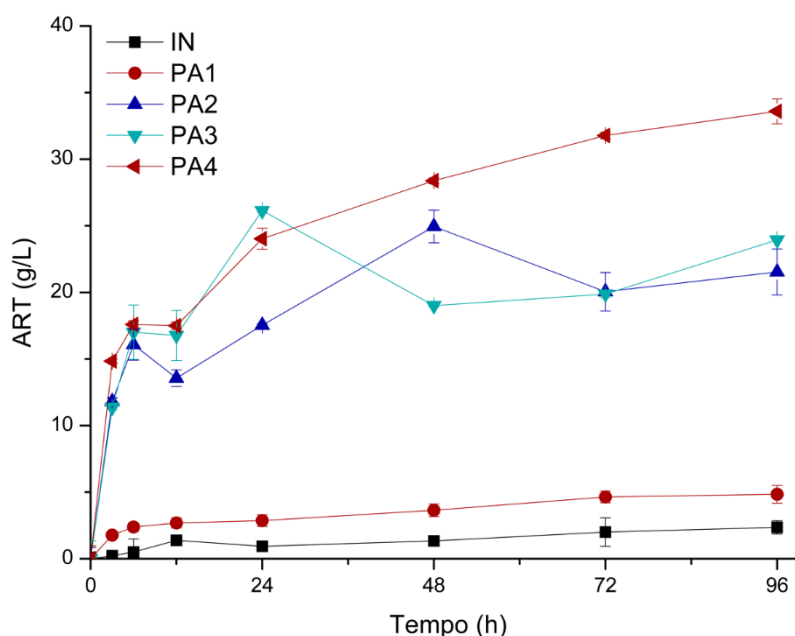
Os índices de cristalinidade encontrados foram de 41,89%, 48,93%, 50,75%, 53,97% e 55,15% para, respectivamente, os resíduos *in natura* e pré-tratados com NaOH 1%, 2%, 3% e 4%. A partir destes resultados, observa-se um aumento no IC considerável após a realização dos pré-tratamentos alcalinos. Isto pode ser justificado, dentre outros fatores, pelo fato que a alteração da cristalinidade está associada primeiramente à remoção da lignina amorfa e da hemicelulose e, conseqüentemente, pelo aumento no teor de celulose cristalina, e não necessariamente à mudança estrutural da celulose (KIM, Jun S.; LEE; KIM, Tae Hyun, 2015; WEI & CHANG, 1985).

O aumento do índice de cristalinidade também foi observado por PHITSUWAN, SAKKA & RATANAKHANOKCHAI (2016) ao aplicar, dentre outras bases, hidróxido de sódio no pré-tratamento alcalino do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), em que houve um aumento de 46,0% do material *in natura* para 49,8% (pré-tratado com NaOH 2%). Apesar destes resultados, o material pré-tratado com esta base obteve uma maior produção de glicose e xilana em relação ao material não tratado e pré-tratados com hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), amônia (NH_3) e peróxido de hidrogênio alcalino (aH_2O_2).

5.4. Hidrólise enzimática

Os materiais lignocelulósicos *in natura* e pré-tratados foram submetidos à hidrólise enzimática conforme a sessão 4.4. Após o processo, verificou-se a liberação de açúcares redutores totais (ART) pelo método de DNS, em que foi expresso a concentração em gramas equivalentes de açúcares por litro de solução. A Figura 5.5 abaixo apresenta a produção de ART durante 96 horas de hidrólise dos resíduos de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratados com NaOH.

Figura 5.5: Concentração de açúcares redutores totais durante a hidrólise enzimática do resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratados.



Fonte: do autor.

Na Figura 5.5, podemos observar o comportamento típico durante a hidrólise enzimática, em que a velocidade de hidrólise diminui com o decorrer do tempo. Nas 3 primeiras horas do processo, esta velocidade é máxima, reduzindo logo nas horas seguintes. Em alguns casos, a velocidade de hidrólise é aparentemente nula após 72 horas de processo, como podemos verificar nos casos do resíduo *in natura* e pré-tratado com NaOH 1%. Além disso, o material lignocelulósico *in natura* obteve a menor liberação de ART após 96 horas de hidrólise enzimática. Este efeito já era esperado devido ao seu estado bruto, ou seja, por não ter sido submetido a nenhum pré-tratamento. A ação enzimática é dificultada tendo em vista a estrutura intacta da celulose e a presença de estruturas relacionadas a este polissacarídeo.

Os resíduos de palha de carnaúba apresentaram uma maior liberação de açúcares redutores totais ao comparar com os ensaios em se fez o uso resíduo *in natura*. Podemos destacar o material pré-tratado PA4, em que obteve a maior produção de ART, cerca de 33,6 g/L \pm 0,94. Os materiais que foram submetidos aos pré-tratamentos PA2 e PA3 obtiveram performances semelhantes após 96 horas de hidrólise enzimática, produzindo aproximadamente 21,5 g/L \pm 1,727 e 23,9 g/L \pm 0,03. Em relação ao resíduo pré-tratado com solução de NaOH 1%, observa-se que o apresentou uma produção de ART bastante próxima ao material *in natura*, indicando que este pré-tratamento foi o mais brando comparado aos outros. Vale lembrar que o método DNS não apresenta uma alta precisão, o que nos indica que, nos casos em que houve diferenças pequenas entre as concentrações determinadas, a liberação de açúcares totais pode ter sido semelhante para estes dois materiais.

A Tabela 5.4 apresenta os valores correspondentes às taxas iniciais (V_0) de hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos em análise. A taxa de reação inicial é determinada a partir da razão entre a produção de açúcares nas primeiras 3 horas de hidrólise (ΔY) e o tempo decorrido (Δt), como podemos ver na Equação 12 abaixo:

$$V_0 \text{ (g/L.h)} = \frac{\Delta Y}{\Delta t} \quad (12)$$

Tabela 5.3: Valores da taxa inicial de hidrólise para os resíduos *in natura* e pré-tratados.

<i>Pré-tratamentos</i>	V_0 (g/l.h)
IN	0,074
PA1	0,592
PA2	3,936
PA3	3,790
PA4	4,945

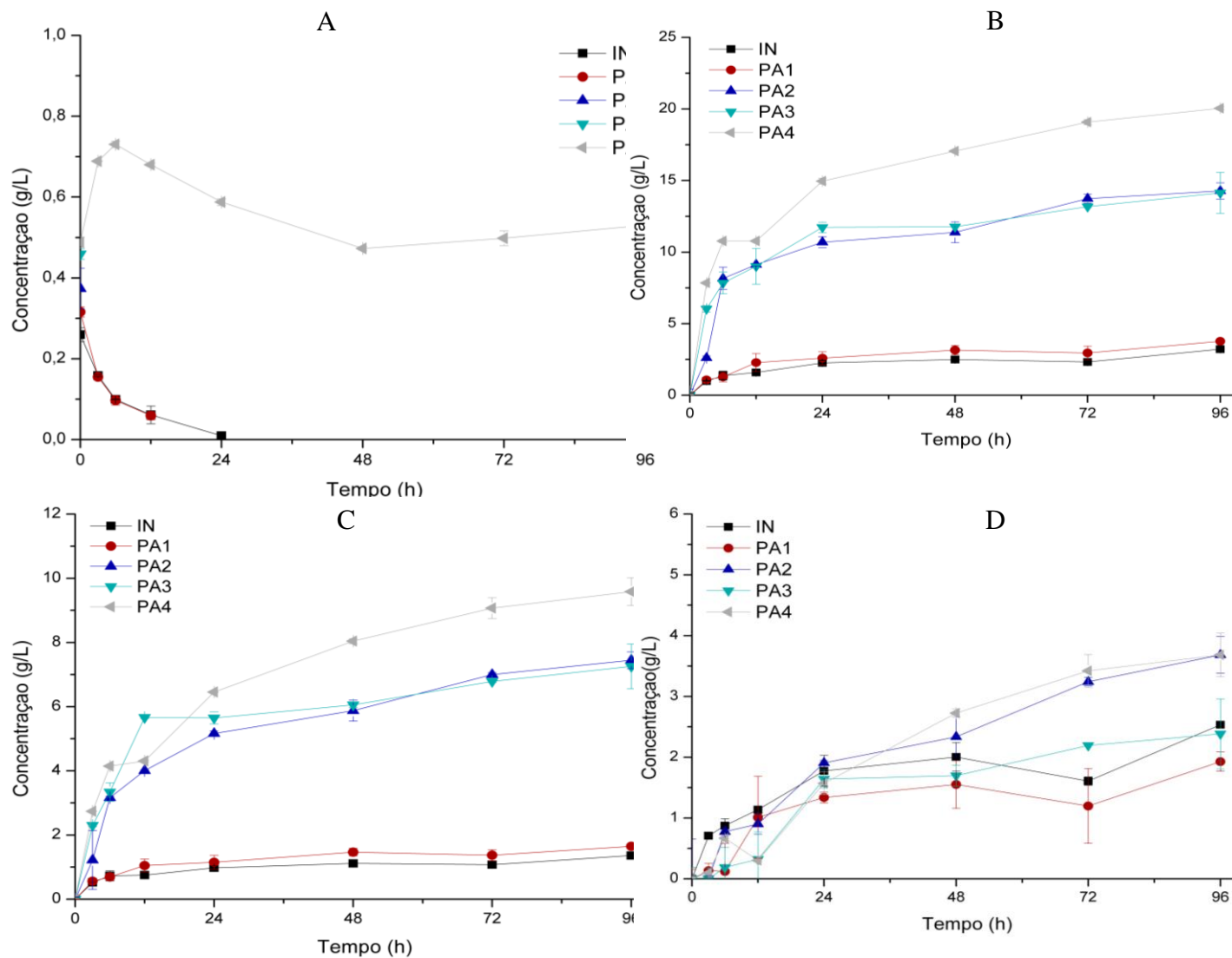
Podemos observar que as hidrólises enzimáticas com os resíduos pré-tratados apresentaram uma maior taxa inicial de reação ao compararmos ao material *in natura*. O material pré-tratado com solução de NaOH 4% apresentou uma velocidade inicial maior em relação aos outros resíduos pré-tratados. Isto pode ser justificado pelo fato que, diante da remoção da lignina e hemicelulose e do aumento da superfície da celulose, houve uma melhora na acessibilidade das enzimas celulolíticas ao polissacarídeo.

Visando a produção de Etanol de Segunda Geração, o interesse deste estudo está em analisar a liberação de glicose durante a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica *in natura* e pré-tratados. As Figuras 5.6 a seguir ilustra a concentração, respectivamente, da celobiose, glicose, xilose e arabinose liberados durante o processo de hidrólise enzimática.

A celobiose é um dímero de glicose que, pela ação da β -Glucosidases, é hidrolisado em monossacarídeos. A Figura 5.6 indica que toda a celobiose foi totalmente consumida durante a hidrólise de todos os materiais lignocelulósicos estudados, com exceção do resíduo pré-tratado com hidróxido de sódio a 4% (m/v). Em relação à produção de glicose, este mesmo resíduo apresentou maiores concentrações deste açúcar após 96 horas de hidrólise enzimática. O material pré-tratado PA2 e PA3 obtiveram performances bastante similares a respeito da liberação deste monômero. Podemos afirmar que isto era esperado tendo em vista a similaridade no teor de celulose e a proximidade no índice cristalinidade observados na caracterização química e física. Os ensaios em que se utilizou o resíduo de palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado PA1 apresentaram também performances semelhantes, nos que indica que o pré-tratamento com a solução de NaOH a 1% não foi capaz de expor a celulose de forma efetiva para a ação das enzimas.

Acompanhando o mesmo comportamento da produção de glicose, o resíduo pré-tratado PA4 obteve a maior liberação de xilose, enquanto que os materiais lignocelulósico *in natura* e pré-tratado PA1 apresentaram as piores performances após o processo de hidrólise. Estudos apontam que o alto rendimento de xilose está correlacionado com o aumento da degradação da xilana presente na hemicelulose, o que por sua vez aumenta a acessibilidade da celulose para a celulase, aumentando a liberação de glicose (PHITSUWAN, SAKKA & RATANAKHANOKCHAI, 2016).

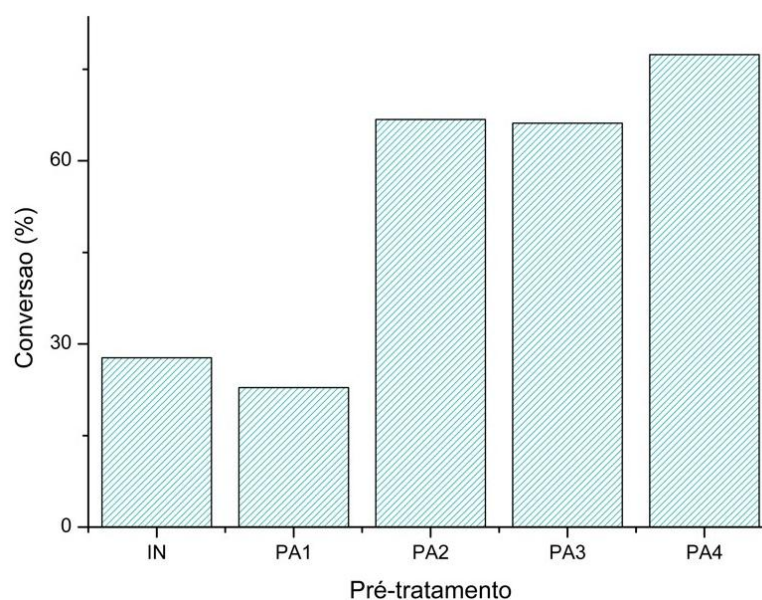
Figura 5.6: Concentração, em g/L, de açúcares produzidos durante a hidrólise enzimática do material *in natura* e pré-tratado, correspondendo a: (A) Celobiose; (B) Glicose; (C) Xilose e (D) Arabinose.



Durante a fermentação para produção de etanol, o consumo da xilose é observado apenas quando há um decréscimo significativo na quantidade de glicose no meio. A maioria dos microrganismos utilizados na indústria, tais como a *Saccharomyces cerevisiae*, são capazes de fermentar facilmente as hexoses, levando a um efeito inibitório na degradação das pentoses (MOYSÉS *et al.*, 2016). Estudos destacam a utilização da levedura *Scheffersomyces stipitis* na fermentação de materiais ricos em hemicelulose tem se destacado, por ser um dos melhores produtores de etanol a partir de xilose e apresentar vantagens para o processo em escala industrial (FERREIRA, 2016).

A Figura 5.7 a seguir ilustra a porcentagem da conversão celulósica do resíduo da palha de carnaúba *in natura* e pré-tratado. Observa-se os menores valores de conversão celulósica obtidos foram para os materiais *in natura* e pré-tratado com NaOH 1% (m/v). O pré-tratamento que favoreceu uma maior conversão foi o PA4, convertendo aproximadamente 78% da celulose presente na biomassa em glicose.

Figura 5.7: Conversão celulósica (%) após 96 horas de hidrólise enzimática do resíduo da palha de carnaúba *in natura* (IN), pré-tratado PA com NaOH 1% (m/v) (PA1), NaOH 2% (m/v) (PA2), NaOH 3% (m/v) (PA3) e NaOH 4% (m/v) (PA4).



Fonte: do autor.

O resíduo pré-tratado com NaOH 2% (m/v) apresentou uma conversão de 67% da celulose, nos evidenciando que, apesar de ser um desempenho inferior ao resíduo pré-tratado com NaOH 4% (m/v), a redução desta concentração pela metade não provoca uma variação uma depreciação muito significativa na produção de glicose. Em uma análise econômica, isto

pode favorecer uma redução nos custos da produção de Etanol de Segunda Geração, tendo em vista a redução da quantidade de hidróxido de sódio no processo de pré-tratamento, gasto de água com as lavagens e do volume de efluente gerado.

De modo geral, os resultados mostraram que o pré-tratamento alcalino do resíduo de palha de carnaúba melhorou a hidrólise enzimática da celulose diante da remoção da lignina e hemicelulose, os quais agem como barreira física para a ação da celulase. A aplicação de solução de NaOH com concentração igual ou acima de 2% (m/v) mostraram uma remoção de aproximadamente 74% da lignina presente no material *in natura*.

Em relação à hidrólise enzimática do resíduo pré-tratado, foi observado um rápido crescimento na concentração de glicose e xilose nas primeiras 6 horas de incubação. O pré-tratamento do resíduo com solução de NaOH 4% (m/v) favoreceu uma maior exposição da celulose às enzimas, levando a uma maior conversão deste polissacarídeo. Vale ressaltar que o resíduo pré-tratado PA2 apresentou uma conversão pouco inferior ao material pré-tratado PA4, o que sugere uma redução no consumo de reagentes para o pré-tratamento e volume de água para lavagem do material após este processo.

6. CONCLUSÃO

A caracterização química e física dos materiais indica que a palha de carnaúba é um resíduo agroindustrial promissor para a produção de Etanol de Segunda Geração por apresentar um teor de celulose considerável. As análises evidenciaram a remoção da lignina e hemicelulose, os quais estão relacionados em uma estrutura complexa à celulose, dificultando a acessibilidade das celulasas a este carboidrato.

O pré-tratamento alcalino dos materiais lignocelulósicos com solução de NaOH igual ou superior a 2% (m/v) favoreceram uma conversão celulósica eficaz. O resíduo pré-tratado com NaOH 4% (m/v) apresentou a melhor performance com uma conversão de aproximadamente 78% da celulose. Apesar de um desempenho de cerca de 11% inferior comparado a este último resíduo, a pré-tratamento da biomassa com uma solução de NaOH 2% (m/v) destaca-se por ser uma alternativa para redução de custos na produção de etanol celulósico, por utilizar a metade da massa de hidróxido de sódio e necessitar de uma quantidade menor de lavagens, levando a uma menor geração de efluentes.

7. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Como próximo passo no estudo da otimização do processo de hidrólise enzimática do resíduo de palha de carnaúba, pode-se avaliar o efeito da variação da carga enzimática na produção de açúcares fermentáveis para redução, assim como o reuso da solução básica obtida nas primeiras lavagens do material tratado em um novo pré-tratamento.

Uma comparação entre diferentes enzimas comercializadas pode ser utilizada na tentativa de otimização da hidrólise. Além disso, essa análise pode ser realizada para as concentrações de NaOH 2% e NaOH 4%.

A partir da hidrólise enzimática otimizada com o melhor pré-tratamento, estudos relacionados à fermentação alcoólica podem ser realizados, comparando diferentes processos como sacarificação simultânea à fermentação (SSF) e fermentação e sacarificação semi-simultânea (SSSF).

REFERÊNCIAS

ADITIYA, H.B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, H.; SEBAYANG, A H. Second generation bioethanol production: A critical review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 66, p. 631-653, 2016.

AITA, G.A.; SALVI, D.A.; WALKER, M.S. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of dilute ammonia pretreated energy cane. *Bioresource Technology*, v. 102 (6), p. 4444–4448, 2011)

ALVES, M.O.; COELHO, J.D. Tecnologia e relações sociais de produção no extrativismo da carnaúba no nordeste brasileiro. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 44, 2006, Fortaleza. Anais. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 2006.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, v. 7, p. 163-173, 2014.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI, K.; SINDHU, R.; JANU, K.U.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, v. 37 (1), p. 109–116, 2012.

CALVO-FLORES, F. G.; DOBADO, J. A. Lignin as renewable raw material. *Chem. Sus. Chem.*, v. 3(11), p. 1227-1235, 2010.

CARVALHO, F. P. A.; GOMES, J. M. A. Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v.46, n.2, p. 421-453, 2008.

CHANG, K.L.; AMORN, J. T.; HSIEH, J. F.; OU, B. M.; CHEN, S. H.; RATANAKHANOKCHAI, K.; HUANG, P. J.; CHEN, S. T. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 90-95, 2011.

CHEN, Y.; STEVENS, M. A.; ZHU, Y.; HOLMES, J.; XU, H. Understanding of alkaline pretreatment parameters for corn stover enzymatic saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, 2013.

CLAASSEN, P. A. M.; CONTRERAS, A. M. L.; SIJTSMA, L.; WEUSTHUIS, R. A.; VAN LIER, J. B.; VAN NIEL, E. W. J.; STAMS A. J. M., De VRIES, S. S.; WEUSTHUIS; R. A. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 52, p. 741–755, 1999.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Cenário sobre o pó e a cera de carnaúba, novembro de 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_11_29_10_29_54_conjuntura_sobre_carnauba__2011_-_ceara.pdf>. Acesso em: 25 de setembro de 2017.

FARINAS, C. S. A parede celular e vegetal e as enzimas envolvidas na sua degradação. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2011.

FERREIRA, A. D. Produção eficiente de Etanol 2G a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: otimizando condições de cultivo e operacionais. 2016. Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo, Lorena/SP.

FRANKS, C. D.; BUROW, G. B.; BURKE, J. J. A comparison of US and Chinese sorghum germplasm for early season cold tolerance. *Crop. Sci.*, v. 46, p. 1371–1376, 2006.

GABHANE, J.; PRINCE WILLIAM, S. P. M.; VAIDYA, A. N.; MAHAPATRA, K.; CHAKRABARTI, T. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment: a cellulosic ethanol perspective. *Biomass & Bioenergy*, v. 35, p. 96-102, 2011.

GHOSE T. K. Measurement of cellulose activities (recommendation of commission on biotechnology IUPAC). *Pure Applied Chemistry*, v. 59, p.257-268, 1987.

GÍRIO. F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4775–800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASI, P. Are biofuels a feasible option? *Energy Policy*, v. 37, p. 10–14, 2009.

GOMES, J. A.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A. C.; CÂNDIDO, M. J.; LEMPP, B.; BOMFIM, M A.; ROGÉRIO, M. C. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.44, n.1, p.58-67, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol: the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trend. Biotechnol.*, v. 24(12), p. 549–556, 2006.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 103-112, 2016.

KAMAKAR, M.; RAY, R. R. Currents trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, p. 41-53, 2011.

KANSOH, A. L.; ESSAM, S. A.; ZEINAT, A. N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesie*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 63, p. 273-278, 1999.

KARIMI, K.; TAHERZADEH, M. J. A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility. *Bioresource Technology*, v. 203, p. 348-356, 2016.

KIM, J.S.; LEE, Y.Y.; KIM, T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 42–48, 2015.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; ERICKSSON, K. E. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, v. 57, p. 45–125, 1997.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; & STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

LENGOWSKI, E. C.; MUNIZ, G. I. B.; NISGOSKI, S.; MAGALHÃES, W. L. E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. *Scientia Florestalis*, v. 41, p. 185-194, 2013.

LI, M. F.; FAN, Y. M.; XU, F.; SUN, R. C.; ZHANG, X. L. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: characterization of the cellulose rich fraction. *Industrial Crops and Products*, v. 32, p. 551-559, 2010.

LU, Q.-L.; TANG, L.-R.; WANG, S.; HUANG, B.; CHEN, Y.-D.; CHEN; X.-R. An investigation on the characteristics of cellulose nanocrystals from *Pennisetum sinense*. *Biomass Bioenergy*, v. 70, p. 267–272, 2014.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 38, p. 522-550, 2012.

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

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Série boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável orgânico carnaúba (*Copernícia prunifera*). Brasília: MAPA, 2012.

MOOD, S. H; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOSIER, N.; LADISCH, C.; LADISCH, M. Characterization of acid catalytic domains for cellulose hydrolysis and glucose degradation. *Biotechnol Bioeng*, v. 79, p. 610-618, 2002.

MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; ALMEIRA, J. R. M.; MORAES, L.M.P.; TORRES, F. A. G. Xylose Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and Prospects. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p. 207-224, 2016.

OLIVEIRA JUNIOR, S. D. Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 2014. 120 f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Natal/RN.

PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA- RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.*, v. 5, p. 53-63, 2002.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Structural changes and enzymatic response of Napier grass (*Pennisetum purpureum*) stem induced by alkaline pretreatment. *Bioresource Technology*, v. 218, p.247-256, 2016.

RABELO, S.C., AMEZQUITA FONSECA, N.A., ANDRADE, R.R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and bioenergy*, v.35, p. 2600-2607, 2011.

RIBEIRO, J. A. B. Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768. 88f. 2010. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

ROCHA, M. V. P. Produção de bioetanol a partir do pedúnculo do caju (*Anacardium occidentale* L. por fermentação submersa. 2010. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, YA Natal, RN.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recente developments. *Biotech.* , v. 5, p. 337-353, 2015.

SALLES-FILHO, S. L. M.; CASTRO, P. F. D.; BIN, A.; EDQUIST, C.; FERRO, A. F. P.; CORDER, S. Perspectives for the Brazilian bioethanol sector: The innovation driver. *Energy Policy*, v. 108, p. 70-77, 2017.

SILVA, F. L.; CAMPOS, A. O.; SANTOS, D. A.; OLIVEIRA JUNIOR, S. D.; PADILHA, C. E. A.; SOUSA JUNIOR, F. C.; MACEDO, G. R.; SANTOS, E. S. Pretreatments of Carnauba (*Copernicia prunifera*) straw residue for production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei* CCT-2768 by solid state fermentation. *Renewable Energy*, v. 166a, p. 299-308, 2018.

SILVA, M. J. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por *Trichoderma Reesei* RUT C-30 em meios com diferentes capacidades de indução. 2014. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE.

SIXTA, H. Handbook of pulp. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; AND WOLFE, J. Determination of total solids in Biomass and total dissolved solids in liquid process sample. *Technical Report NREL/TP-510-42621*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; AND TEMPLETON, D. Determination of ash in biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42622*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2005b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; AND TEMPLETON, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42618*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2008b.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; AND TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. *Technical Report NREL/TP-510-42619*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2005a.

SOUSA, L.C.; VONORTAS, N.S.; SANTOS, I.T.; TOLEDO-FILHO, D.F. Innovation systems of ethanol in Brazil and the United States: making a new fuel competitive. In: SALLES-FILHO, S. L. M.; CORTEZ, L.A.B.; SILVEIRA, J.M.F.J.; TRINDADE, S.C., *Global Bioethanol: Evolution, Risks, and Uncertainties*. Elsevier, London, 93–121, 2016a.

SOUSA, L.C.; VONORTAS, N.S.; SANTOS, I.T.; TOLEDO-FILHO, D.F. Innovation systems of ethanol in Brazil and the United States: making a new fuel competitive. In: SALLES-FILHO, S. L. M.; CORTEZ, L.A.B.; SILVEIRA, J.M.F.J.; TRINDADE, S.C., *Global Bioethanol: Evolution, Risks, and Uncertainties*. Elsevier, London, 93–121, 2016b.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34: 421-424, 2009.

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

VAN ZESSEN, E.; WEISMANN, M.; BAKKER, R.R.; ELBERSEN, H.W.; REITH, J.H.; DEN UIL; H. Lignocellulosic Ethanol, A Second Opinion, Report 2GAVE-03.11. *Netherlands Agency for Energy and Environment*, 2003.

WEI, C. J.; CHENG, C. Y. Effect of hydrogen peroxide pretreatment on the structural features and the enzymatic hydrolysis of rice straw. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 1418-1426, 1985.

YANG, J.; JIANG, J.; ZHANG, N.; MIAO, C.; WEI, M.; ZHAO, J. Enhanced enzyme saccharification of Sawtooth Oak shell using dilute alkali pretreatment. *Fuel*, v. 139, p. 102-106, 2015.

YANG, S.T.; EL-ENSHASY, H.A.; THONGCHUL, N.; MARTIN, Y. *Bioprocessing Technologies in Integrated Biorefinery from Production of Biofuels, Biochemicals, and Biopolymers from Biomass*. New York: John Wiley & Sons, 2012.

ZHOU, Y.; CHEN, H.; QI, F.; ZHAO, X.; LIU, D. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose. *Bioresource Technology*, v. 182, p. 136-143, 2015.