

## AVALIAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE BAGAÇO DE CANA POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO ALCALINO: II. SUSCEPTIBILIDADE DA BIOMASSA À HIDRÓLISE ENZIMÁTICA E ACESSIBILIDADE ÀS ENZIMAS

Maurício Melo Câmara, (UEM), mauriciomcamara@gmail.com

Flávio Faria de Moraes, (UEM), flavio@deq.uem.br

**RESUMO:** O pré-tratamento de bagaço de cana não moído por peróxido de hidrogênio alcalino foi avaliado nas condições ótimas para liberação de açúcares após hidrólise enzimática previamente determinadas em 8% de sólidos (g sólido/mL solução), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11% v/v (15,65% m/m), pH 11,5 (corrigido com NaOH), temperatura de 25 °C e tempo reacional de 1 h em seis ensaios baseados em 1,5 L de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No presente trabalho, a avaliação do pré-tratamento ocorreu em termos da liberação de açúcares após hidrólise enzimática e dos perfis de proteína em solução durante a reação, que fornecem uma medida indireta da adsorção das enzimas. Os resultados combinados da produção de açúcares e de proteína em solução demonstram que as enzimas adsorveram não somente na celulose, mas também na hemicelulose e lignina, e sugerem que a secagem após o pré-tratamento tenha induzido o enrijecimento das fibras (*hornification*).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Pré-tratamento; Peróxido de hidrogênio alcalino; Hidrólise enzimática; Adsorção.*

### INTRODUÇÃO

A lignocelulose, constituída principalmente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose e pelo polímero lignina, é o recurso natural mais abundante, sendo barato e renovável, e apresenta o potencial para ser uma fonte sustentável de combustíveis e produtos químicos (RAGAUSKAS et al., 2006). Os biocombustíveis líquidos têm atraído grande atenção em diferentes países ao redor do mundo devido às suas características renováveis e sustentáveis, além de contribuírem para o desenvolvimento regional com a criação de empregos, diminuírem a dependência externa de energia e petróleo e cooperarem com as reduções nas emissões de gases causadores do efeito estufa (DEMIRBAS, 2009). O etanol, por exemplo, é o biocombustível mais usado no mundo no setor de transportes e há muito é usado como combustível alternativo, tendo sido inicialmente difundido nos anos 1900 na Europa e Estados Unidos (BALAT, 2011).

A conversão de lignocelulose em combustíveis pela hidrólise enzimática e fermentação tem sido estudada há muito por apresentar o potencial para fornecer uma fonte renovável e alternativa de energia capaz de substituir os combustíveis fósseis (ZHU et al., 2008). O processo geralmente envolve três etapas principais: i) pré-tratamento, para romper a estrutura recalcitrante da lignocelulose; ii) hidrólise enzimática, para hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis; e iii) fermentação, para converter os açúcares em etanol (HUANG et al., 2011). Como as características

estruturais da biomassa limitam sua acessibilidade às enzimas ou micro-organismos, o pré-tratamento é uma operação essencial que visa quebrar a camada de lignina, remover a hemicelulose ou romper a estrutura cristalina da celulose para tornar a biomassa hidrolisável (FAN et al., 1981b).

O pré-tratamento tem sido visto como uma das etapas mais caras do processo de conversão de biomassa em açúcares fermentescíveis (MOSIER et al., 2005) e, por isso, algumas características são consideradas para que um pré-tratamento seja eficiente e tenha baixo custo (ALVIRA et al., 2010): altos rendimentos para múltiplas matérias-primas em diferentes condições, alta digestibilidade do sólido pré-tratado, degradação não significativa dos açúcares, formação mínima de compostos tóxicos, ausência da necessidade de redução do tamanho da biomassa, operação em reatores de tamanho razoável e custo moderado, ausência de produção de resíduos, capacidade de recuperação da lignina, demandas mínimas de energia e calor e obtenção de altas concentrações de açúcares.

Muitos métodos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos têm sido utilizados antes da hidrólise enzimática. Esses métodos têm sido classificados em pré-tratamentos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). Dentre as diversas técnicas, o pré-tratamento químico por peróxido de hidrogênio alcalino tem despertado interesse, pois é conduzido com reagentes facilmente acessíveis e em condições brandas de temperatura e pressão sem o emprego de ácidos. Além disso, os reagentes apresentam baixa toxicidade e impacto ambiental e o pré-tratamento é compatível com operações de separação, forma praticamente nenhum produto secundário e apresenta quase 100% de recuperação da celulose na forma de glicose após hidrólise enzimática (BANERJEE et al., 2012; RABELO et al., 2011; RIVERA et al., 2010).

Rabelo (2007) e Garcia (2009) estudaram o pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino e determinaram condições ótimas para seu emprego em bagaço de cana. Considerando as condições ótimas determinadas no trabalho de Garcia (2009) para bagaço de cana moído e peneirado, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o pré-tratamento de bagaço de cana não moído, obtido por colheita não mecanizada, por peróxido de hidrogênio alcalino em uma escala 15 vezes maior que a utilizada por Garcia (2009). Aspectos do pré-tratamento relacionados ao rendimento mássico e composição química da biomassa foram tratados em outro trabalho e esse artigo é dedicado aos efeitos do pré-tratamento na susceptibilidade da biomassa à hidrólise enzimática e acessibilidade às enzimas.

## **METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **Materiais**

Todos os reagentes utilizados nesse trabalho foram de padrão analítico, a não ser que seja mencionado o contrário.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nesse trabalho foi cedido pelo Grupo Santa Terezinha Ltda.

O reagente usado na preparação da solução de pré-tratamento é uma solução comercial de peróxido de hidrogênio 50% (m/m), fornecido pela Buschle & Lepper S.A. e adquirido na empresa Quibras Química Brasileira Ltda. em Maringá – PR.

As enzimas utilizadas nos ensaios de hidrólise foram as enzimas comerciais Celluclast 1,5L e Novozym 188, ambas cedidas pela empresa Novozymes (Bagsvaerd, Dinamarca). Celluclast 1,5L é uma celulase produzida pelo fungo *Trichoderma reesei*, enquanto a Novozym 188 corresponde a uma  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus niger*. A atividade de celulase foi determinada seguindo-se o procedimento padrão de Adney e Baker (2008), que aplica as diretrizes da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (GHOSE, 1987), sendo expressa em unidades de papel de filtro (FPU). Para a determinação da atividade de celobiase, também seguiu-se o procedimento recomendado pela IUPAC (GHOSE, 1987), que mede a atividade por meio de uma solução de celobiose 15 mmol/L, expressando tal atividade como CBU (*Cellobiose Units*) por mL de enzima. A atividade da enzima Celluclast 1,5L foi determinada em 56,9 FPU/mL e a atividade da enzima Novozym 188 em 1327,3 CBU/mL.

### **Pré-tratamento por Peróxido de Hidrogênio Alcalino**

Utilizando o trabalho de Garcia (2009) como referência, definiu-se que as condições de pré-tratamento por peróxido de hidrogênio alcalino para esse estudo seriam 8% de sólidos (g sólido/mL solução), solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11% v/v (15,65% m/m), pH 11,5 (corrigido com NaOH), temperatura de 25 °C e tempo reacional de 1 h. Os ensaios de pré-tratamento foram realizados em reator cilíndrico de aço inox com 30 cm de diâmetro por 43 cm de comprimento, provido de pás de agitação impulsionadas manualmente.

Foram realizados seis ensaios de pré-tratamento baseados em 1,5 L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 11% v/v (15,65% m/m). Inicialmente, adicionou-se ao reator o bagaço e 955 mL de água, deixando em contato por 30 min para umidificação do bagaço. Em seguida, após a umidificação, adicionou-se o reagente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (415 mL) e iniciou-se a correção do pH com uma solução de NaOH de modo que a concentração final de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no reator foi de 11% v/v (15,65% m/m). Depois de atingido o pH 11,5, iniciou-se a contagem do tempo de reação. Foram utilizadas também pequenas quantidades (menor que 50  $\mu$ L) de antiespumante Antifoam 204 (Sigma-Aldrich) para extinguir a espuma e evitar perda de material por transbordamento. Ao término da reação, o sobrenadante foi descartado e o bagaço remanescente lavado com água até que a água de lavagem estivesse límpida (aproximadamente 10 lavagens). Na

sequência, o material pré-tratado foi seco em estufa a 105 °C por 24 h, resfriado até temperatura ambiente e armazenado hermeticamente em geladeira. Ao fim dos ensaios, o material produzido em todas as bateladas foi reunido, homogeneizado, acondicionado em recipiente hermético e armazenado em geladeira até o uso nos ensaios de hidrólise. A caracterização química da biomassa após o pré-tratamento foi realizada com base nos procedimentos analíticos do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER e SLUITER, 2011) e correspondeu a 1,7% cinzas, 5,9% extrativos, 48,9% celulose, 22,5% hemicelulose e 16,87% lignina.

### Ensaio de Hidrólise

Os ensaios de hidrólise foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL com base na massa total de 100 g de acordo com as condições apresentadas na Tabela 1. Bagaço de cana pré-tratado, 10 g de tampão de citrato 0,05 mol/L pH 4,8 e benzoato de sódio 1 g/L foram adicionados aos frascos e transferidos para agitador mecânico a 50 °C e 150 rpm, onde permaneceram por 30 min para atingir equilíbrio térmico. Após esse período, as reações de hidrólise foram iniciadas pela adição das enzimas na proporção de 1 FPU/g celulose : 2 CBU/g celulose, uma vez que Rivera et al. (2010) determinaram a proporção de 1 FPU/g bagaço : 1,8 CBU/g bagaço como sendo a razão ótima para a maximização do rendimento da hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado nas mesmas condições empregadas no presente trabalho. O benzoato de sódio, inibidor do crescimento de micro-organismos, foi utilizado para evitar contaminação do meio reacional e cada ensaio foi realizado em duplicata, juntamente com controles de enzima e substrato. No decorrer dos experimentos, alíquotas de 1,0 mL do meio reacional de cada ensaio foram coletadas nos tempos 0, 0,5, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 e 72 h, de forma que, ao fim do experimento, o volume total das amostras não foi superior a 10% do meio reacional, garantindo maior uniformidade nas características da reação. As amostras retiradas foram imediatamente fervidas durante cinco minutos, para inativar as enzimas e finalizar a reação, e congeladas até o momento das análises.

**Tabela 1 – Condições experimentais aplicadas nos ensaios de hidrólise enzimática.**

Variáveis	Condições experimentais*	
	Variação na carga enzimática	Variação na carga de sólidos
Carga enzimática (FPU/g-celulose)	5, 15, 30, 60	15
Concentração de substrato (%m/m,	5	3, 6, 9, 12

base seca)

\*Temperatura, pH, agitação e tempo de hidrólise foram mantidos constantes em 50 °C, 4,8, 150 rpm e 72 h, respectivamente, para todos os experimentos

Após as análises para determinação de açúcares em solução, as conversões de celulose e hemicelulose foram calculadas em termos de glicose e xilose equivalente, respectivamente, utilizando os fatores de conversão de anidromônômeros em açúcares monoméricos:

$$X_C = \frac{G_{E,final}}{G_{E,inicial}} = \frac{G + 1,053.G_2}{1,111.C} \quad (1)$$

$$X_H = \frac{X_{E,final}}{X_{E,inicial}} = \frac{X}{1,136.H} \quad (2)$$

Em que:

- $X_C$  - conversão de celulose;
- $G_E$  - glicose equivalente (g/kg);
- $G_2$  - concentração de celobiose (g/kg);
- $G$  - concentração de glicose (g/kg);
- $C$  - concentração de celulose (g/kg);
- $X_H$  - conversão de hemicelulose;
- $X_E$  - xilose equivalente (g/kg);
- $X$  - concentração de xilose (g/kg);
- $H$  - concentração de hemicelulose (g/kg).

Os dados experimentais foram convertidos para g/kg (i.e., grama da substância pela massa total do sistema expressa em kilograma) devido à natureza heterogênea do sistema.

### Determinação de Açúcares em Solução

Para quantificação dos açúcares em solução, as amostras foram descongeladas, centrifugadas a 8000 rpm por 10 min, filtradas em filtros de 0,45 µm e transferidas em *vials* para análise em cromatógrafo Varian 920-LC equipado com coluna Biorad Aminex HPX-87H na temperatura de 65 °C, utilizando como fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM filtrado e desgaseificado na vazão 0,6 mL/min. O volume de injeção de amostra foi 20 µL e os açúcares foram detectados por detector de índice de refração na temperatura de 55 °C em corrida de 35 min. Celobiose, glicose, xilose e arabinose foram usados como padrões de calibração externa.

### Determinação de Proteína em Solução

Os perfis de adsorção foram obtidos de forma indireta por meio da determinação da quantidade de proteína em solução, quantificada pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) a partir das amostras filtradas, utilizando como padrão albumina bovina (Sigma

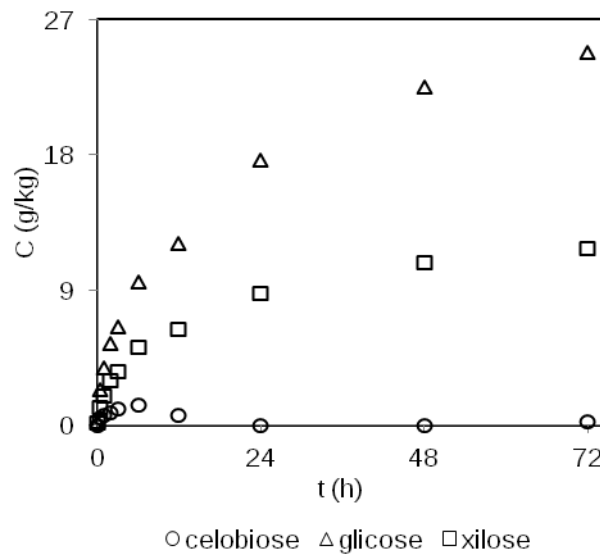
A-2153). Duas curvas padrão foram construídas (BOMMARIUS et al., 2008), uma para o intervalo 0,010 – 0,100 mg proteína/mL (denominado ensaio de proteína micro) e outra para o intervalo 0,125 – 2,000 mg proteína/mL (denominado ensaio de proteína padrão). Para o ensaio de proteína micro, 100 µL de amostra foram reagidos com 1,0 mL de reagente Bradford, enquanto para o ensaio de proteína padrão, 10 µL de amostra foram reagidos com 1,0 mL de reagente Bradford. Como branco, foi utilizado 1,0 mL de reagente Bradford. O volume de amostra foi adicionado em cubetas de 1,0 mL e, em seguida, acrescentou-se o volume de reagente Bradford. Após 5 min ± 20 s, a absorbância da solução resultante foi medida no comprimento de onda 595 nm em espectrofotômetro.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Ensaio de Hidrólise

Observou-se que a mistura de enzimas utilizada com suplementação de β-glicosidase na razão 1 FPU/g celulose : 2 CBU/g celulose garantiu baixas concentrações de celobiose, em que a máxima concentração observada foi para o ensaio com 12% de sólidos e correspondeu a 1,3 g/kg. Os perfis obtidos nos ensaios de hidrólise foram semelhantes aos perfis apresentados na Figura 1, correspondente ao experimento com 12% de sólidos.

Além da formação de celobiose e glicose provenientes da hidrólise da celulose contida no material, também foi detectada a formação de xilose. Tal produção de xilose, originada da hidrólise da hemicelulose, foi detectada em todos os ensaios de hidrólise realizados. Garcia (2009) também observou produção de xilose a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado por peróxido de hidrogênio alcalino empregando celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich ATCC 26921). Isso ocorre porque os micro-organismos produtores de celulases podem produzir hemicelulases (TENKANEN et al., 1992) e celulases comerciais também apresentam atividades xilanolíticas (CHEN et al., 2007). Hu et al. (2011) relataram atividade xilanase de 438,8 U/mL e β-xilosidase de 37,8 U/mL para Celluclast 1,5L com 50,3 FPU/mL, bem como atividade xilanase de 32,63 U/mL e β-xilosidase de 3,9 U/mL para Novozym 188 com atividade β-glicosidase de 239,0 U/mL.



**Figura 1 – Perfis experimentais de produção de celobiose, glicose e xilose a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana com 15 FPU/g celulose em 12% (m/m, base seca) de sólidos.**

Na Tabela 2, estão apresentados os valores de conversão obtidos em cada um dos ensaios de hidrólise enzimática. Pode-se observar que, em geral, as conversões de celulose foram próximas às conversões de hemicelulose. A maior conversão de celulose observada, 42,22%, foi obtida no ensaio com 9% de sólidos, enquanto a maior conversão de hemicelulose, 50,18%, foi obtida no ensaio com 60 FPU/g celulose.

**Tabela 2 – Valores de conversão de celulose ( $X_C$ ) e hemicelulose ( $X_H$ ) obtidos nos ensaios de hidrólise após 72 h de reação.**

Variação na carga enzimática			Variação na carga de sólidos		
Ensaio	$X_C$ (%)	$X_H$ (%)	Ensaio	$X_C$ (%)	$X_H$ (%)
5 FPU	30,16	31,32	3%	36,03	38,20
15 FPU	41,93	45,91	6%	38,65	41,16
30 FPU	37,22	42,97	9%	42,22	42,68
60 FPU	40,72	50,18	12%	38,36	38,23

Com base nos rendimentos de hidrólise, o pré-tratamento realizado por Garcia (2009) foi mais eficiente. Utilizando a razão 1 FPU: 1 CBU, carga enzimática de 10 FPU/g sólido e concentração de sólidos de 5%, Garcia (2009) obteve rendimento em glicose de 64,30%. Para experimentos de

hidrólise com 3% de sólidos os rendimentos em glicose variaram entre 99,01% (para 15,8 FPU/g sólido com proporção de 1 FPU: 1,6 CBU) até 63,51% (para 15,8 FPU/g sólido, sem adição de  $\beta$ -glicosidase). Hari Krishna et al. (1998) obtiveram rendimentos em glicose de 70% usando 40 FPU/g biomassa na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado com 1% de peróxido de hidrogênio alcalino. Considerando que canas-de-açúcar de diferentes variedades podem apresentar características distintas, como diferenças na estrutura e composição da planta, quantidade de sacarose e resistência a pragas, é possível que as diferenças observadas nos rendimentos sejam oriundas da variedade da cana-de-açúcar que deu origem ao bagaço.

Apesar da celulase utilizada no presente trabalho não ter sido a mesma dos trabalhos citados, que constitui uma causa possível para as variações observadas, tais diferenças nos rendimentos também podem ser originadas pelas características conferidas ao bagaço durante o pré-tratamento. Fan et al. (1981a) afirmam que uma alta deslignificação pode causar um colapso nos poros da estrutura devido à recristalização da celulose e, assim, resultar em aumento na cristalinidade. Segundo Hendriks e Zeeman (2009), a quantidade de enzimas necessária para altos rendimentos na hidrólise está diretamente relacionada com a eficiência e tipo de pré-tratamento e, de acordo com Kumar e Wyman (2009), a adsorção da enzima é muito mais rápida que a sacarificação e tanto o substrato quanto o pré-tratamento influenciam a dessorção das enzimas, acessibilidade ao substrato e afinidade das enzimas à lignina. Além disso, Banerjee et al. (2011) afirmam que o tamanho da partícula tem um grande efeito na digestibilidade enzimática, em que a hidrólise de partículas menores resultam em rendimentos maiores de açúcares monoméricos, e, no presente trabalho, as fibras de bagaço não passaram por nenhum outro processo além do pré-tratamento.

### **Adsorção de Enzimas**

A determinação das concentrações de proteína em solução durante a hidrólise enzimática demonstrou que diferentes condições exibem diferentes perfis de adsorção. Na Figura 2 estão apresentados os resultados de proteína em solução obtidos para o conjunto de ensaios de variação na concentração enzimática. Nota-se que no período inicial de hidrólise a concentração de proteína em solução aumenta e depois volta a diminuir, indicando nova adsorção das enzimas. Ao fim das 72 h de hidrólise, não foram detectadas proteínas em solução para os ensaios com 30 e 60 FPU/g celulose, indicando completa adsorção das enzimas no substrato. Pelos perfis, observa-se que a carga enzimática influenciou os perfis de proteína em solução apesar da concentração de sólidos ser a mesma em todos os ensaios (5% m/m, base seca).



Um comportamento similar ao observado nos ensaios com variação na concentração de enzimas é visto nos perfis de proteína em solução da Figura 3, obtidos para o conjunto de ensaios com variação na concentração de sólidos. Mesmo mantendo constante a razão entre carga enzimática e sólidos, i.e., 15 FPU/g celulose, nota-se que o comportamento da adsorção também foi influenciada pela concentração de sólidos.

Mesmo que os valores de proteína em solução forneçam uma maneira de medir a quantidade de enzima adsorvida de forma indireta, os resultados não permitem fazer distinção entre as enzimas, i.e., se celulase ou  $\beta$ -glicosidase, tampouco onde elas estão adsorvidas no substrato, i.e., celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, a análise associada dos valores de proteína em solução com os perfis de hidrólise sugere que as enzimas adsorvem não somente na celulose, mas também na hemicelulose e lignina, e que a distribuição dos componentes celulose, hemicelulose e lignina na superfície do material não foi uniforme quando observa-se em todos os casos (com exceção do ensaio com 5 FPU/g celulose) que a proteína não foi completamente recuperada ao final da reação, em que praticamente já não havia produção de açúcares e a conversão de substrato não foi superior a 50% (OOSHIMA et al., 1990). Com efeito, as quantidades significativas de xilose nas amostras de hidrólise evidenciam a adsorção das enzimas na hemicelulose.

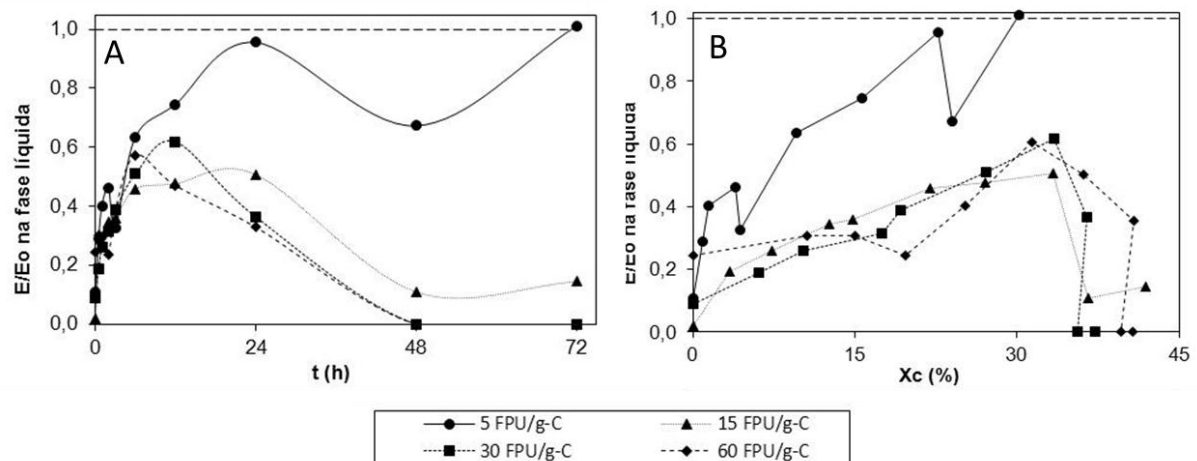
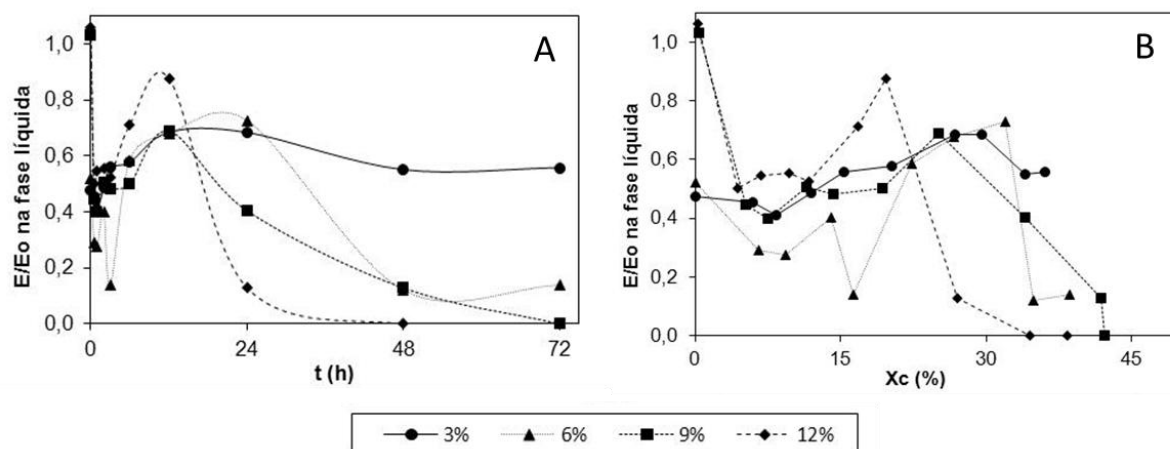


Figura 2 – Fração de proteína em solução ( $E/E_o$ ) em função do tempo (A) e em função da conversão de celulose (B) para a hidrólise de 5% (m/m, base seca) de bagaço de cana para as razões 5, 15, 30 e 60 FPU/g celulose, com alimentação inicial de proteína ( $E_o$ ) de 0,106, 0,317, 0,634 e 1,268 g/kg respectivamente.



**Figura 3 – Fração de proteína em solução ( $E/E_o$ ) em função do tempo (A) e em função da conversão de celulose (B) para a hidrólise de bagaço de cana a 15 FPU/g celulose para as concentrações 3, 6, 9 e 12% (m/m, base seca), com alimentação inicial de proteína ( $E_o$ ) de 0,190, 0,380, 0,571 e 0,761 g/kg respectivamente.**

Outra característica dos perfis de proteína durante a hidrólise enzimática do bagaço de cana é seu comportamento dinâmico. Em todos os perfis observa-se que as enzimas retornam para a solução ao longo da reação. De acordo com Ooshima et al. (1990), este comportamento sugere que a hidrólise resulta em completa remoção da celulose e hemicelulose acessíveis no material e que não são geradas novas superfícies de substrato na biomassa. Um perfil linear, i.e., constante, seria característico da formação de novas superfícies de substrato ao longo da hidrólise (OOSHIMA et al., 1990).

Também se pode induzir pelos perfis de proteína em solução que as enzimas retornam para a solução em períodos de tempo relativamente curtos, que correspondem a baixas conversões. Ooshima et al. (1990) afirmam que se a razão entre enzima e substrato é alta, o substrato fica sem superfícies disponíveis mesmo com a liberação de enzimas após a hidrólise, pois está saturado com enzimas.

Considerando que os resultados sugerem a não formação de novas superfícies de substrato, acredita-se que as diferenças nos rendimentos também possam ter sido originadas pelo enrijecimento das fibras de bagaço durante a etapa de secagem após o pré-tratamento. O enrijecimento das fibras (referido em inglês pelo termo *hornification*) é o nome dado à perda irreversível da habilidade de ligação da água após secagem da celulose em consequência às mudanças irreversíveis na estrutura da parede celular ocasionadas durante o processo de secagem e umidificação. Quando ocorre a secagem da biomassa, as fibras de celulose são firmemente agrupadas por meio das ligações de hidrogênio, que causam encolhimento e perda de poros na parede celular. Quando ocorre nova umidificação, a parede

celular incha e apenas algumas ligações de hidrogênio são quebradas (LAIVINS e SCALLAN, 1993; LUO e ZHU, 2011; SCALLAN, 1974).

Luo e Zhu (2011) mostraram que o enrijecimento da fibra induzido por secagem reduz significativamente a eficiência da hidrólise enzimática, observando redução de 54% para 25% na digestibilidade enzimática de pinheiro (*lodgepole pine*) pré-tratado após secagem a 105 °C por 30 min. Wang et al. (2012) afirmam que o enrijecimento induzido das fibras reduzem os sítios de ligação ou a acessibilidade da celulose à celulase e, portanto, reduz a capacidade de adsorção das enzimas. Apesar dessas evidências, Gould (1985) observou apenas leve diminuição da absorção de água em palha de trigo pré-tratada com peróxido de hidrogênio alcalino após secagem da biomassa a 110 °C durante 24 h. No entanto, Luo e Zhu (2011) demonstraram que o fenômeno de enrijecimento é dependente da estrutura física e química da parede celular do material não seco, da susceptibilidade do material não seco à secagem, do método de secagem e do tempo e temperatura de secagem.

## CONCLUSÃO

O pré-tratamento de bagaço de cana por peróxido de hidrogênio alcalino foi avaliado quanto à susceptibilidade da biomassa à hidrólise enzimática. Para isso, foram utilizadas as enzimas comerciais Celluclast 1,5L e Novozym 188 na proporção 1 FPU/g celulose : 2 CBU/g celulose, que apresentaram atividade xilanolítica e foram capazes de garantir baixas concentrações de celobiose, em que a máxima concentração observada foi 1,3 g/kg. A maior conversão de celulose observada foi 42,22% (9% de sólidos e 15 FPU/g celulose), enquanto a maior conversão de hemicelulose foi 50,18% (5% de sólidos e 60 FPU/g celulose).

Além disso, a determinação da quantidade de proteína em solução durante a reação permitiu inferir informações sobre a acessibilidade da celulose às enzimas. Os resultados de adsorção da mistura enzimática durante os ensaios de hidrólise mostraram que as enzimas adsorveram não apenas na celulose, mas também na hemicelulose e lignina, como já era esperado tendo em vista a produção de xilose. O comportamento dinâmico dos perfis de proteína em solução sugere que não foram geradas novas superfícies de substrato durante a hidrólise. Além disso, os perfis de proteína em solução em conjunto com os perfis de produção de açúcares e valores de conversão de substrato sugerem que a distribuição dos componentes no material não foi uniforme. Adicionalmente, o aumento da concentração de proteína em solução em valores baixos de conversão também indica saturação dos sólidos com enzimas. Não se descarta a possibilidade de que a variedade da cana-de-açúcar que deu origem ao bagaço tenha influenciado nos resultados de hidrólise enzimática, bem como o tamanho das fibras usadas, entretanto, a combinação dos resultados sugere que o principal fator que influenciou a

susceptibilidade do material foi o efeito de enrijecimento induzido pela secagem do material após o pré-tratamento.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES – Brasil.

Os autores agradecem à empresa Novozymes pelo fornecimento das enzimas e ao Grupo Santa Terezinha Ltda., unidade Iguatemi, pelo fornecimento do bagaço de cana, que possibilitaram a realização desse trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP)**. NREL Report No. TP-510-42628, 2008, 11 p.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. **Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 4851-4861.
- BALAT, M. **Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review**. *Energy Conversion and Management* 2011, 52: 858–875.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; LIU, T.; WILLIAMS, D.L.; MEZA, S.L.; WALTON, J.D.; HODGE, D.B. **Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation**. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109: 922-931.
- BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.S.; HODGE, D.B.; WALTON, J.D. **Alkaline peroxide pretreatment of corn stover: effects of biomass, peroxide, and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose**. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 16–30.
- BOMMARIUS, A.S.; KATONA, A.; CHEBEN, S.E.; PATEL, A.S.; RAGAUSKAS, A.J.; KNUDSON, K.; PU, Y. **Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment**. *Metabolic Engineering*, 2008, 10: 370–381.
- BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248–254.
- CHEN, M.; JING, Z.; LIMING, X. **Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars**. *Carbohydr Polym*, 2007, 71: 411–415.
- DEMIRBAS, A. **Diesel-like fuel from tallow by pyrolysis and supercritical water liquefaction**.

- Energy Source A, 2009, 31: 824–830.
- FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. **Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues.** Biotechnol. Bioeng. Symp., 1981a, 11: 29–45.
- FAN, L.T.; LEE, Y.H.; BEARDMORE, D.H. **The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis.** Biotechnol. Bioeng., 1981b, 23: 419–424.
- GARCIA, D.R. **Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior.** Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2009.
- GHOSE, T.K. **Measurement of cellulase activities.** Pure Appl Chem, 1987, 59: 257–268.
- GOULD, J.M. **Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues.** Biotechnology and Bioengineering, 1985, 27(3): 225–231.
- HARI KRISHNA, S.; PRASANTHI, K.; CHOWDARY, G.V.; AYYANNA, C. **Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol.** Process Biochem, 1998, 33: 825–830.
- HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. **Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technol, 2009, 100: 10–18.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J.N. **The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?** Biotechnology for Biofuels, 2011, 4: 36–49.
- HUANG, R.; SU, R.; QI, W.; HE, Z. **Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: Process intensification and mechanism research.** Bioenerg. Res., 2011, 4: 225–245.
- KUMAR, R.; WYMAN, C.E. **Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments.** Biotechnol. Bioeng., 2009, 103: 252–267.
- LAIVINS, G.V.; SCALLAN, A.M. **The mechanism of hornification of wood pulps.** In: Baker CF, editor. **10th fundamental research symposium.** Oxford, UK: Pulp and Paper Fundamental Research Society, 1993, p. 1235–1260.
- LUO, X.; ZHU, J.Y. **Effects of drying-induced fiber hornification on enzymatic saccharification of lignocelluloses.** Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48: 92–99.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISH, M. **Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass.** Bioresource Technology, 2005, 96: 673–686.
- OOSHIMA, H.; BURNS, D.S.; CONVERSE, A.O. **Adsorption of cellulase from Trichoderma reesei on cellulose and lignocellulosic residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with**

**explosive decompression.** *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36: 446–452.

RABELO, S.C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Dissertação (mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2007.

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

RAGAUSKAS, A.J.; WILLIAMS, C.K.; DAVISON, B.H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C.A.; FREDERICK JR, W.J.; HALLETT, J.P.; LEAK, D.J.; LIOTTA, C.L.; MIELENZ, J.R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. **The path forward for biofuels and biomaterials.** *Science*, 2006, 311: 484–489.

RIVERA, E.C.; RABELO, S.C.; DOS REIS GARCIA, D.; FILHO, R.M.; DA COSTA, A.C. **Enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse for bioethanol production: determining optimal enzyme loading using neural networks.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, 85: 983–992.

SCALLAN, A.M. **The structure of the cell wall of wood – a consequence of anisotropic inter-microfibrillar bonding?** *Wood Science*, 1974, 6: 266–271.

SLUITER, J.; SLUITER, A. **Summative Mass Closure: Laboratory Analytical Procedure (LAP) Review and Integration: Feedstocks (Revised July 2011).** NREL Report No. TP-510-48087, 2011, 13 p. Disponível em: <[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures .html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures .html)>. Acessado em: 25 mar. 2011.

TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review.** *Int. J. Mol. Sci.*, 2008, 9: 1621-1651.

TENKANEN, M.; PULS, J.; POUTANEN, K. **Two major xylanases of *Trichoderma reesei*.** *Enzyme Microb Technol*, 1992, 14: 566–574.

WANG, Q.Q.; ZHU, J.Y.; HUNT, C.G.; ZHAN, H.Y. **Kinetics of adsorption, desorption, and re-adsorption of a commercial endoglucanase in lignocellulosic suspensions.** *Biotechnol. Bioeng.*, 109: 1965-1975.

ZHU, L.; O'DWYER, J.P.; CHANG, V.S.; GRANDA, C.B.; HOLTZAPPLE, M.T. **Structural features affecting biomass enzymatic digestibility.** *Bioresource Technology*, 2008, 99: 3817-3828.