UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas
MacromoLignocell

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA LIGNOCELULÓSICA DE CURAUÁ
(Ananas erectifolius)

LUCAS GOMES DA SILVA CATUNDA

SÃO CARLOS
2018

LUCAS GOMES DA SILVA CATUNDA

OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA FIBRA LIGNOCELULÓSICA DE CURAUÁ (*Ananas
erectifolius*)

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de São Paulo
como requisito para a obtenção de título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Físico-química

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Frollini

SÃO CARLOS

2018

À minha progenitora, Francisca, pelos seus esforços e pelo seu amor ao me cuidar e ao me fazer o bem, pondo o meu bem-estar acima de tudo.

Aos meus irmãos Saulo e Sara por me fazerem ser o que sou e serei, ajudando-me sempre que possível.

À minha parceira, melhor amiga, minha confidente, minha ajudante... ao meu amor, meu tudo, Amanda.

Aos meus irmãos amigos, Grazielly e Thiago, por, apesar de distância, estarem sempre dispostos a saber se está tudo bem e quererem o meu bem e por estarem nessa vida de pós-graduação juntos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, sem ordem de preferência em seguida, agradeço à minha mãe Francisca por, desde o começo, apoiar-me nas minhas escolhas, mesmo que difíceis, acreditando sempre em mim e sempre querendo meu bem onde quer que eu esteja.

Aos meus irmãos Saulo e Sara por, apesar da distância, manterem-se sempre dispostos a me ajudar apesar da distância.

Aos meus amigos irmãos Grazielly (Coisa) e Thiago por sempre quererem o meu bem e por me amarem, torcendo que dê tudo certo na minha vida apesar da distância.

Aos meus queridos amigos de Fortaleza Katielle especialmente; Igor, Davi, Luiza, Diego, Luis, Evelyn, Juliana, Alan e Amanda, que ajudaram a me tornar o que sou hoje.

À Virgínia por ser uma das primeiras pessoas que tive e mantive amizade em São Carlos, acolhendo-me de maneira especial e sempre querendo o meu bem.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Gleyciara (Chica) por trazer um pouco do Ceará com seu humor e reverência para São Carlos; Rachel (Rá) por ser uma ótima pessoa e uma excelente amiga; Patrícia (Paty) pelo seu bom humor e sua amizade, Ana Cassales (Mãe de família) por toda a ajuda e amizade; Thamiris, Deyvid, Joice por toda a atenção e ajuda no que estive precisando; Lidiane (Juma), Roberta Lopes, Roberta Polez, Bianca, Dani, Eriqinha, Danilo, Andrea e Felipe. A todos um muitíssimo obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos meus amigos de convívio e de saídas Gustavo (Drama), Vicente e Leonardo por alegrarem meus dias e aceitarem as saídas.

A minha amiga, parceira, confidente, companheira... Ao meu tudo, Amanda Zangirolami por fazer parte da minha vida. Obrigado por tudo mesmo, pela paciência, pelo convívio, pela parceria, pelas confidências, pela ajuda, pela confiança, pelo respeito e por seu amor por mim.

À Profa. Dra. Elisabete Frollini por toda a sua orientação durante o mestrado, pelo respeito e pela compreensão por estar longe de casa. Muitíssimo obrigado.

Ao técnico do Grupo de Físico-química Orgânica, Luis Antônio Ramos por toda a ajuda nas análises e por todo o suporte para que meus experimentos dessem certo, com rapidez na obtenção dos resultados. Aos técnicos Marcelo Luiz Calegari e Márcio de Paula por todo suporte nas análises realizadas para este trabalho.

Um agradecimento especial ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo por todo suporte para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço também ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico) pelo apoio financeiro através da bolsa concedida no mestrado (Processo n° 130695/2016-5).

*“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais volta ao seu tamanho original. ”*

Albert Einstein,

RESUMO

Este estudo teve como objetivo contribuir com a diversificação de aplicações da fibra de curauá (76% de α -celulose, 16% de hemiceluloses e 8% de lignina Klason total) através da conversão da fração de polissacarídeos a açúcares fermentescíveis (sacarificação), por meio de hidrólise enzimática. O presente estudo visou explorar condições relativamente brandas para pré-tratamentos das fibras usando solução aquosa de ácido oxálico (AO, 0,9M), selecionado por poder ser obtido a partir de fontes naturais, assim como testar condições diferentes em relação ao pré-tratamento alcalino. Fibras previamente lavadas com água a temperatura ambiente e a 70 °C (visando remover os resíduos ou os sais aderidos a fibra), e então submetidas a extração com mistura de etanol e cicloexano 1:1 (visando remover ceras, terpenos e ácidos graxos) foram submetidas a pré-tratamentos utilizando solução de ácido oxálico 0,9M na proporção de 1:30 de massa de fibra por volume de solução (g/mL), durante 1,5h a temperatura ambiente (AC0915AM), 1,5 h a 60 °C (AC091560) e 3,0 h a 60 °C (AC093060), e a pré-tratamento utilizando solução de hidróxido de sódio 20% durante 2 h (NaOH202060) e 5 h a 60 °C (NaOH205060). As fibras pré-tratadas ou não foram caracterizadas quanto ao teor de holocelulose, de α -celulose, hemiceluloses, lignina total, microscopia eletrônica de varredura (MEV), cristalinidade (DRX), análise termogravimétrica (TGA, DTG), dimensões. Os resultados indicaram as seguintes mais relevantes modificações comparativamente às fibras não tratadas: aumento no teor de holocelulose de $92,1 \pm 0,4\%$ para $93,1 \pm 0,7\%$ (AC0915AM), redução no teor de α -celulose de $76,3 \pm 0,1\%$ para $70,1 \pm 0,1\%$ (AC091560), aumento no teor de hemiceluloses de $15,9 \pm 0,4\%$ para $21,9 \pm 0,6\%$ (AC091560), e variação em cristalinidade de 61% (fibra de partida) para 75% (AC093060), indicando consumo de cadeias de celulose presentes nos domínios não cristalinos durante o pré-tratamento. O teor de lignina não apresentou variação significativa. Os resultados também indicaram que tanto o ácido oxálico quanto o hidróxido de sódio apresentaram preferência em atacar as superfícies das fibras, comparativamente às extremidades, diminuindo a espessura das mesmas. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando o complexo enzimático Accellerase 1500 (Genecor) que possui exoglucanases, endoglucanases, hemicelulases e β -glucanases e foi conduzida em tampão de citrato 0,1M (50mL tampão/g fibra, pH 5), durante 48 h. Durante a hidrólise enzimática, alíquotas foram retiradas do meio em determinados intervalos de tempo, e as fibras que não reagiram foram separadas por filtração do licor contendo os

açúcares hidrolisados. As fibras que não reagiram foram caracterizadas conforme as fibras de partida. As curvas DTG mostraram uma diminuição na intensidade do pico referente à decomposição térmica da celulose (em torno de 375 °C) em diferentes tempos de reação da hidrólise enzimática devido à conversão da mesma em glicose, e mostraram redução do “ombro” referente a decomposição das hemiceluloses, devido a hidrólise das mesmas durante a reação. Os resultados referentes à avaliação das dimensões das fibras indicaram que a enzima atuou preferencialmente a partir da superfície das mesmas, comparativamente às extremidades. As análises dos licores por CLAE foram realizadas tanto para as fibras pré-tratadas quanto para as fibras não pré-tratadas (esta somente em 48 h). Em 48 h de reação, utilizando 0,5 mL.g⁻¹ de enzima, os rendimentos foram de 58,6% (fibra não pré-tratada), 72,0% (AC0915AM), 74,8% (AC091560), 77,4% (AC093060) e 71,6% (NaOH202060). Para as fibras AC091560, utilizando 1,5 mL.g⁻¹ de enzima o rendimento aumentou para 81,9%, mas uma análise de viabilidade econômica é necessária para avaliar se o gasto com enzimas não se contrapõe ao aumento no rendimento. As micrografias (MEV) mostraram que durante o pré-tratamento o ácido atacou a superfície das fibras de partida, diminuindo as espessuras das fibras mais espessas e a cristalinidade decaiu de 74% para 65%. O aumento no rendimento de glicose em relação à fibra de partida indica que esses fatores facilitaram o acesso das enzimas às cadeias de celulose. O tratamento alcalino resultou em rendimento maior (71,6 %) em relação aos estudos anteriores realizados no grupo. No entanto, este resultado foi satisfatório, indicando que o aumento na cristalinidade de 61% (fibras não pré-tratadas) para 79% dificultou o acesso das enzimas às cadeias de celulose. O presente estudo aprofundou investigações prévias, levando a um importante conjunto de resultados que podem embasar futuros estudos.

Palavras-chave: fibra de curauá, hidrólise enzimática, pré-tratamento ácido, pré-tratamento básico

ABSTRACT

This study aimed to contribute to the diversification of applications of Curauá fiber (76% α -cellulose, 16% hemicelluloses and 8% total Klason lignin) through the conversion of the polysaccharide fraction to fermentable sugars (saccharification) by enzymatic hydrolysis. The present study aimed to explore relatively mild conditions for pre-treatments of the fibers using aqueous solution of oxalic acid (AO, 0.9M), selected because it can be obtained from natural sources, as well as to test different conditions in relation to pretreatment alkali. Fibers previously washed with water at room temperature and at 70 ° C (to remove residues or salts adhered to fiber), and then extracted with a mixture of ethanol and cyclohexane 1: 1 (to remove waxes, terpenes and fatty acids) were submitted to pre-treatments using 0.9M oxalic acid solution at a ratio of 1:30 mass of fiber per solution volume (g / mL), during 1,5h at room temperature (AC0915AM), 1,5h at 60 ° C (AC091560) and 3,0 h at 60 ° C (AC093060), and pretreatment using 20% sodium hydroxide solution for 2 h (NaOH202060) and 5 h at 60 ° C (NaOH205060). The pretreated fibers were characterized by holocellulose, α -cellulose, hemicelluloses, total lignin, scanning electron microscopy (SEM), crystallinity (XRD), thermogravimetric analysis (TGA, DTG) and dimensions. The results indicated the following most relevant modifications compared to untreated fibers: increase in holocellulose content from $92,1 \pm 0,4\%$ to $93,1 \pm 0,7\%$ (AC0915AM), reduction in α -cellulose content of $76,3 \pm 0,1\%$ for $70,1 \pm 0,1\%$ (AC091560), increase in hemicelluloses content from $15,9 \pm 0,4\%$ to $21,9 \pm 0,6\%$ (AC091560), and variation in crystallinity from 61% (starting fiber) to 75% (AC093060), indicating consumption of cellulose chains present in the non-crystalline domains during pretreatment. The lignin content did not present significant variation. The results also indicated that both oxalic acid and sodium hydroxide were preferred in attacking the surfaces of the fibers compared to the ends, decreasing the thickness thereof. Enzymatic hydrolysis was performed using the enzyme complex Accellerase 1500 (Genecor) having exoglucanases, endoglucanases, hemicellulases and β -glucanases and was run in 0,1M citrate buffer (50mL buffer / g fiber, pH 5) for 48 h. During the enzymatic hydrolysis, aliquots were withdrawn at certain time intervals, and the unreacted fibers were separated by filtration of the liquor containing the hydrolysed sugars. Unreacted fibers were characterized according to the starting fibers. The DTG curves showed a decrease in peak intensity relative to the thermal decomposition of cellulose (around 375 ° C) at different reaction times of the enzymatic hydrolysis due to the conversion of the same to glucose, and showed reduction of the

"shoulder" of the hemicelluloses, due to their hydrolysis during the reaction. Results regarding fiber size assessment indicated that the enzyme acted preferentially from the surface compared to the ends. The analyzes of the liquors by HPLC were performed for both pretreated fibers and non-pretreated fibers (only 48 h). The yields were 58.6% (non-pretreated fiber), 72.0% (AC0915AM), 74.8% (AC091560), 77.4% (AC093060) and 71.6% (NaOH202060). For AC091560 fibers, using 1.5 mL.g⁻¹ enzyme the yield increased to 81.9%, but an economical viability analysis is required to assess whether the expense with enzymes does not counteract the increase in yield. The micrographs (SEM) showed that during pretreatment the acid attacked the surface of the starting fibers, decreasing the thicknesses of the thicker fibers and the crystallinity decreased from 74% to 65%. The increase in glucose yield relative to the starting fiber indicates that these factors facilitated the access of the enzymes to the cellulose chains. The alkaline treatment resulted in a higher yield (71.6%) than previous studies performed in the group. However, this result was satisfactory, indicating that the increase in crystallinity from 61% (non-pretreated fibers) to 79% made it difficult for enzymes to reach the cellulose chains. The present study deepened previous investigations, leading to an important set of results that may support future studies.

Keywords: Curaua fiber; enzymatic hydrolysis; acid pretreatment; basic pretreatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção de Etanol Anidro e Hidratado no Brasil.....	22
Figura 2 - Estrutura de uma fibra vegetal.....	23
Figura 3 - Estrutura da celobiose presente na cadeia de celulose.....	24
Figura 4 - Microscopia de força atômica do eixo da fibra apresentando os domínios cristalinos e não cristalinos.....	25
Figura 5 - Projeções das duas células unitárias da Celulose I e II respectivamente em dois diferentes planos.....	26
Figura 6 - Componentes principais das hemiceluloses.	27
Figura 7 – Precusores para a formação da lignina.	28
Figura 8 - Planta de curauá (<i>Ananas erectifolius</i>).....	28
Figura 9 - Representação esquemática de possíveis efeitos de pré-tratamentos sobre a biomassa lignocelulósica	31
Figura 10 - Mecanismo proposto para a amorfogênese/despolimerização da celulose pelas celulasas.	36
Figura 11- Analisador de fibras (MorFiCompact).	46
Figura 12 - Micrografia da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.....	53
Figura 13 - Gráfico em barras de espessura e comprimento da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.	54
Figura 14 - Mapa de densidade da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.....	55
Figura 15 - Curvas TG e DTG da fibra de curauá de partida e das fibras submetidas a diferentes pré-tratamentos com ácido oxálico 0,9M. Atmosfera de N ₂ , vazão de 50 mL.min ⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ . c) e d), ampliações dos “ombros”/picos referentes a decomposição de hemiceluloses e de celulose, respectivamente	56
Figura 16 - Micrografia da fibra de partida e das fibras submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio.....	59
Figura 17 - Gráfico em barras de espessura e comprimento da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o hidróxido de sódio 20%.	60
Figura 18 - Mapa de densidade da fibra de partida e das fibras submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio 20%.	61

Figura 19 - Curvas TG e DTG da fibra de curauá de partida e das fibras submetidas aos diferentes pré-tratamentos com hidróxido de sódio 20%.Atmosfera de N ₂ , vazão de 50 mL.min ⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ . c) e d), ampliações dos “ombros”/picos referentes a decomposição de hemiceluloses e de celulose, respectivamente.....	63
Figura 20 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC0915AM, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.	65
Figura 21 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM.	66
Figura 22 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.	68
Figura 23 - Gráfico em barras de espessura e de comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM durante a hidrólise enzimática.....	70
Figura 24 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e a espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM.	71
Figura 25 – Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05AC0915AM obtidos via hidrólise enzimática.....	74
Figura 26 - Rendimento de glicose da fibra H05AC0915AM em função do tempo reacional a partir da hidrólise enzimática.	77
Figura 27 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC091560, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.	78
Figura 28 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560.	79
Figura 29 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 durante a hidrólise enzimática c), d), g), h), k) e l) ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.	81
Figura 30 - Gráfico em barras de espessura e de comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 durante a hidrólise enzimática.	83
Figura 31 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e a espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560, proveniente das reações de hidrólise enzimática.....	84
Figura 32 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise enzimática da fibra de curauá H05AC091560.	87
Figura 33 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H05AC091560.	88
Figura 34 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC093060, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.	89

Figura 35 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060.....	89
Figura 36 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses..	91
Figura 37 - Gráfico em barras de espessura e comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060 durante a hidrólise enzimática.	94
Figura 38 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060, proveniente das reações de hidrólise enzimática.	95
Figura 39 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05AC093060.	98
Figura 40 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H05AC093060 via hidrólise enzimática.....	99
Figura 41 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H15AC091560, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.	101
Figura 42 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560 via hidrólise enzimática.....	102
Figura 43 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.	104
Figura 44 - Gráfico em barras de espessura e o comprimento das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560 durante a hidrólise enzimática.	106
Figura 45 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560, proveniente das reações de hidrólise enzimática.	107
Figura 46 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H15AC091560 via hidrólise enzimática.	110
Figura 47 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H15AC091560 via hidrólise enzimática.....	112
Figura 48 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05NaOH202060, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.	113
Figura 49 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060.	114
Figura 50 - Fibra de curauá que não reagiu mercerizada utilizando hidróxido de sódio 20% durante 2 h a temperatura ambiente e submetida posteriormente a hidrólise enzimática	

utilizando 0,5mL de enzima por g. de fibra. a) 30 min e b) 48 horas de hidrólise enzimática.	116
Figura 51 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e suas ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.	116
Figura 52 - Gráfico em barras de espessura e comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060 durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.	119
Figura 53 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060, proveniente das reações de hidrólise enzimática...	120
Figura 54 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05NaOH202060.	123
Figura 55 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05NaOH202060 após a hidrólise enzimática.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de holocelulose (celulose e hemiceluloses), lignina insolúvel, cinzas e extrativos de algumas fibras lignocelulósicas.	29
Tabela 2 - Massa resultante da fibra de curauá lavada utilizando água a temperatura ambiente e a 70 °C, e utilizando mistura cicloexano:etanol (1:1).	50
Tabela 3 - Componentes químicos da fibra de partida de curauá.....	50
Tabela 4 - Condições utilizadas para o pré-tratamento da fibra de partida de curauá antes de submetê-la a hidrólise enzimática.	51
Tabela 5 - Teor de lignina Klason solúvel e insolúvel, de holocelulose, α -celulose, hemiceluloses, cinzas, umidade e índice de cristalinidade para a fibra de curauá pré-tratada com o ácido oxálico 0,9M e submetida a diferentes condições de tratamento.	51
Tabela 6 - Condições utilizadas para o pré-tratamento da fibra de partida de curauá utilizando hidróxido de sódio 20%.....	58
Tabela 7 - Teor de lignina Klason solúvel e insolúvel, de holocelulose, α -celulose, hemiceluloses, cinzas, umidade e índice de cristalinidade para a fibra de curauá pré-tratada com hidróxido de sódio 20% submetida a diferentes condições.	58
Tabela 8 - Tabela de nomenclaturas de fibras pré-tratadas submetidas a hidrólise enzimática.	64

Tabela 9 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560 e H05AC093060.	98
Tabela 10 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560 e H05AC093060 via hidrólise enzimática.	99
Tabela 11 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC091560 e H15AC091560.	111
Tabela 12 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC091560 e H15AC091560.	112
Tabela 13 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560, H05AC093060 e H05NaOH202060.	123
Tabela 14 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560, H05AC093060 e H05NaOH202060.	125

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Cenário Brasileiro do Consumo de Biocombustível	20
1.2	Fibras Lignocelulósicas	22
1.2.1	<i>Celulose.....</i>	24
1.2.2	<i>Hemiceluloses.....</i>	26
1.2.3	<i>Lignina</i>	27
1.3	Fibras Lignocelulósicas	28
1.4	Pré-tratamentos	30
1.4.1	<i>Pré-tratamento em Meio Ácido.....</i>	32
1.4.2	<i>Pré-tratamento em Meio Básico (Mercerização)</i>	33
1.4.3	<i>Hidrólise Enzimática</i>	34
1.4.3.1	<i>Celulases</i>	35
1.4.3.2	<i>Hemicelulases</i>	36
2	OBJETIVOS	38
2.1	Objetivo Geral.....	38
2.2	Objetivos Específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	MATERIAIS.....	38
3.2	MÉTODOS.....	39
3.2.1	<i>Lavagem da Fibra de Curauá em Água a Temperatura Ambiente e a 70 °C</i>	39
3.2.2	<i>Eliminação de Extrativos da Fibra de Curauá usando Mistura Etanol e Cicloexano (1:1)</i>	40
3.2.3	<i>Moagem da Fibra de Curauá.....</i>	40
3.3	Pré-tratamento com Ácido Oxálico 0,9 M	41
3.4	Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio 20%	41

3.5	Caracterização da Fibra Lignocelulósica de Curauá	41
3.5.1	<i>Determinação do Teor de Lignina.....</i>	41
3.5.1.1	<i>Teor de Lignina Klason Insolúvel</i>	42
3.5.1.2	<i>Teor de Lignina Klason Solúvel</i>	42
3.5.2	<i>Determinação do Teor de Holocelulose</i>	43
3.5.3	<i>Determinação do Teor de α-celulose</i>	44
3.5.4	<i>Determinação do Teor de Umidade.....</i>	44
3.5.5	<i>Determinação do Teor de Cinzas</i>	45
3.5.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	45
3.5.7	<i>Comprimento e Espessura Médios das Fibras.....</i>	46
3.5.8	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	46
3.5.9	<i>Índice de Cristalinidade (I_c).....</i>	47
3.6	Hidrólise Enzimática	47
3.6.1	<i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</i>	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1	Caracterização da Fibra de Curauá de Partida e Pré-tratada com Ácido Oxálico 0,9M	49
4.1.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	53
4.1.2	<i>Comprimento e Espessura Médio das Fibras.....</i>	54
4.1.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	56
4.2	Caracterização da Fibra de Curauá Mercerizada com Hidróxido de Sódio 20%	57
4.2.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	59
4.2.2	<i>Comprimento e Espessura Médio das Fibras.....</i>	60
4.2.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	62
4.3	Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM	65
4.3.1	<i>Caracterização da Fibra Que Não Reagiram Durante Hidrólise.....</i>	65

4.3.1.1	DRX.....	65
4.3.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.3.1.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	68
4.3.1.4	Comprimento e Espessura Médio das Fibras	70
4.3.2	Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM.....	74
4.3.2.1	Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM.....	75
4.4	Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560.....	78
4.4.1	Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise	78
4.4.1.1	DRX.....	78
4.4.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	79
4.4.1.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	81
4.4.1.4	Comprimento e Espessura Médio das Fibras	83
4.4.2	Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560.....	87
4.4.2.1	Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560	88
4.5	Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC093060.....	88
4.5.1	Caracterização da Fibra Não Reagida Durante Hidrólise.....	88
4.5.1.1	DRX.....	88
4.5.1.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	89
4.5.1.3	Análise Termogravimétrica (TGA).....	91
4.5.1.4	Comprimento e Espessura Médio das Fibras	94
4.5.2	Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC093060.....	98
4.5.2.1	Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC093060	99
4.6	Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560.....	100

4.6.1	<i>Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise</i>	100
4.6.1.1	<i>DRX</i>	100
4.6.1.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	101
4.6.1.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	103
4.6.1.4	<i>Comprimento e Espessura Médio das Fibras</i>	106
4.6.2	<i>Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560</i>	110
4.6.2.1	<i>Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560</i>	111
4.7	<i>Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060</i>	112
4.7.1	<i>Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise</i>	113
4.7.1.1	<i>DRX</i>	113
4.7.1.2	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	114
4.7.1.3	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	116
4.7.1.4	<i>Comprimento e Espessura Médio das Fibras</i>	119
4.7.2	<i>Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060</i>	123
4.7.2.1	<i>Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060</i>	124
5	CONCLUSÃO	126
	REFERÊNCIAS	128

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é uma fonte renovável abundante em açúcares. Adicionalmente, esta fonte serve como matéria-prima para produtos químicos, além de combustíveis, podendo ser derivada de subprodutos agrícolas ou de resíduos industriais (IMAMOGLU; SUKAN, 2014). A possibilidade de obter etanol a partir da biomassa lignocelulósica vem atraindo a atenção de governos, indústrias e de centros de pesquisa, dada as suas vantagens em relação ao combustível derivado de fontes não renováveis: pode ser obtido a partir de resíduos agroindustriais, sendo portanto um recurso de baixo custo, oferecendo ao mesmo tempo uma solução mais compatível com o meio ambiente, atendendo às expectativas de setores da economia e da sociedade (IMAMOGLU; SUKAN, 2014; LIANG; XU; ZHANG, 2012; MOHAMED ABDUL GHANI; VOGIATZIS; SZMERKOVSKY, 2018), e é um recurso disponível em grande quantidade em várias partes do mundo (CHEN, 2014).

1.1 Cenário Brasileiro do Consumo de Biocombustível

Desde a década de 1970, quando surgiu a crise do petróleo, até os dias atuais, a preocupação com a emissão de gases do efeito estufa e com a poluição ambiental ressaltam ainda mais a importância de se produzir biocombustíveis, como o etanol ou o biodiesel. As razões para a adoção dos biocombustíveis são várias, porém três se destacam: controlar o efeito estufa na atmosfera a partir do controle da concentração dos gases, reduzir a poluição veicular e reduzir a dependência do petróleo (LEITE; LEAL, 2007).

O biodiesel começou a ser desenvolvido juntamente com o Programa Pro-álcool, como alternativa para a redução do consumo de petróleo, porém, com os baixos preços do diesel à época, as atividades encerraram. A produção só voltou a ser desenvolvida a partir da década de 80 quando o governo brasileiro constatou que a produção e o consumo de biodiesel passaram a crescer na Europa, principalmente na Alemanha; e quando o governo vislumbrou uma forma de intensificar a agricultura familiar, melhorando, assim, a inclusão social (KOHLHEPP, 2010; LEITE; LEAL, 2007).

O etanol é usado no Brasil desde 1920, porém, apenas com o advento do Programa Pro-álcool, em 1975, houve um crescimento massivo de investimento na produção do

biocombustível e seu papel ficou definido a longo prazo no mercado. O principal motivo do governo em lançar tal programa foi a intenção de minimizar a conta do petróleo na balança do pagamento do país, pois à época o Brasil importava 80% do petróleo que consumia, sendo em 2016 de 44,9% (ANL, 2017; LEITE; LEAL, 2007; SILVA et al., 2013). Além disso, o governo encorajou a produção da agricultura familiar, criando novas oportunidades de emprego, reduzindo, portanto as desigualdades socioeconômicas regionais. O Pro-álcool trouxe resultados positivos, substituindo a gasolina por bioetanol, bem como melhorando as condições socioeconômicas. Hoje o Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol e o maior produtor de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, o que contribui significativamente para a matriz energética limpa (SALLES-FILHO et al., 2016).

A tecnologia para a obtenção do bioetanol a partir da biomassa no Brasil e no mundo foi baseada na primeira geração, ou seja, na produção de etanol a partir de matérias-primas açucaradas e amiláceas, como cana de açúcar, trigo, milho, dentre outros, e biodiesel a partir de óleos vegetais ou gordura animal, como soja, mamona, gordura suína, sebo bovino, óleo de aves, dentre outros (JARDINE, [s.d.]; LEITE; LEAL, 2007). Paralelamente, estão em desenvolvimento tecnologias que utilizam materiais lignocelulósicos como matérias-primas, como bagaço de cana-de-açúcar, resíduos agroflorestais e lixo urbano, que são mais abundantes e baratos que outras fontes, podendo ser produzidos nos mais variados tipos de solo e clima (LEITE; LEAL, 2007).

Segundo dados publicados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP(2017), em 2016 a produção de etanol anidro aumentou 2,4%, acréscimo acompanhado pelo aumento das vendas da Gasolina A (4,6%), para gerar a gasolina C que é a mistura da Gasolina A com o etanol; enquanto que a produção de etanol hidratado diminuiu em 2,8%, devido ao aumento do consumo da Gasolina C. Apesar dessa redução, a taxa média anual de crescimento de produção de etanol, de 2007 a 2016, foi de 2,4%. A Figura 1 ilustra o progresso da produção de etanol de 22557 mil m³ em 2007 até 28693 mil m³ em 2016, indicando aumento da demanda pelo combustível no país.

Figura 1 - Produção de Etanol Anidro e Hidratado no Brasil.

Fonte: ANP (2017).

Apesar do crescimento na produção, em 2016 o Brasil importou 832,1 mil m³ de etanol, elevação de 62,2% em relação a 2015, e exportou 1,8 milhões m³, queda de 4,2% em relação a 2015. Para reverter esse quadro, fazendo do Brasil um país mais autossuficiente em etanol, é preciso buscar novas alternativas para a obtenção de etanol, como o uso de materiais lignocelulósicos como matéria-prima, os quais, como mencionado, possuem potencial para serem convertidos em etanol, neste caso chamado também de *etanol celulósico*, *etanol de segunda geração* ou *bioetanol*.

1.2 Fibras Lignocelulósicas

A biomassa vegetal é composta por três componentes principais: celulose, hemiceluloses, sendo as duas quando juntas chamadas de holocelulose, e lignina, as quais estão fortemente interligadas. A composição e a proporção dessas macromoléculas variam de acordo com o tipo de planta, das condições climáticas, do tempo de colheita e do solo (SINGH; MAHANTA; BORA, 2017). A Figura 2 ilustra a estrutura de uma fibra lignocelulósica composta por camadas de parede secundária S3, S2 e S1 e parede primária. A parede primária possui uma camada de 0,1 a 0,2 µm e é composta por celulose, hemiceluloses, pectina e proteína, todas envolvidas em lignina. As paredes secundárias S1, S2 e S3 formam de 10 a 20%, 70 a 90% e 2 a 8% de toda a parede celular respectivamente, em que a parede primária apresenta

uma rede de microfibrilas de celulose cristalina desordenadas e a parede secundária apresenta a mesma rede, porém em arranjo ordenado. Todas as paredes apresentam regiões amorfas constituídas principalmente de lignina e de hemiceluloses (SUN, 2010).

Figura 2 - Estrutura de uma fibra vegetal.

Fonte: Adaptado de Silva (2009).

Para a produção de etanol celulósico a partir da biomassa lignocelulósica, é necessário hidrolisar a celulose , em seguida, fermentar o açúcar (glicose) proveniente da celulose, produzido da hidrólise, separar a lignina residual e, por final, recuperar e purificar o etanol(ALVIRA et al., 2010).

A celulose é o componente em maior proporção na fibra lignocelulósica, seguido de hemiceluloses (polioses) e lignina, sendo que os teores podem variar nos intervalos 35-40, 25-40 e 10-20% respectivamente (AMIN et al., 2017). As hemiceluloses são os mais complexos componentes da parede celular, formando ligações covalentes com a lignina. A celulose e as hemiceluloses estão ligados principalmente por ligações hidrogênio. Além disso, existem interações do tipo ligação hidrogênio na parte interna da lignina, formando um complexo de carboidrato – lignina estável (CHEN, 2014).

1.2.1 Celulose

A celulose é um homopolímero de cadeia linear em que as unidades repetitivas de $(C_6H_{10}O_5)_n$ são compostas por moléculas de glicose (SÁNCHEZ, 2009; SILVA et al., 2009). A unidade repetitiva da celulose é constituída por moléculas de glicose eterificadas por ligações β -1,4-glicosídicas. Esta unidade é chamada de celobiose e contém seis grupos hidroxila que podem realizar ligações hidrogênio tanto intramolecular quanto intermolecular (SILVA et al., 2009). A Figura 3 ilustra a estrutura da celobiose em uma cadeia de celulose, em que as diferentes reatividades dos grupos hidroxilas nas extremidades da celulose geram um terminal redutor e outro não redutor, ou seja, um terminal contendo carbono anomérico livre ou não envolvido em ligação glicosídica (KASCHUK, 2014; NELSON, D., AND COX, 2014).

Figura 3 - Estrutura da celobiose presente na cadeia de celulose.

Fonte: Próprio autor.

As cadeias de celulose são agregadas em estruturas denominados de microfibrilas, com cadeias lineares ligadas lateralmente por ligações hidrogênio e estão organizadas em regiões extremamente ordenadas (regiões cristalinas) e regiões menos ordenadas (regiões não cristalinas) (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017; LIU; SUN, 2010), Figura 4.

Figura 4 - Microscopia de força atômica do eixo da fibra apresentando os domínios cristalinos e não cristalinos.

Fonte: BHATTACHARYA; GERMINARIO; WINTER (2008).

Existem diversos tipos de celulose, porém a Celulose I é a mais abundante na fibra lignocelulósica. A Celulose I possui dois polimorfos: Celulose I_α, com célula unitária do tipo triclinico de cadeia única e Celulose I_β com a célula unitária do tipo monoclinico de duas cadeias. Além da Celulose I, existem os polimorfos II, III e IV, que são estruturas cristalinas modificadas da celulose, ou seja, não estão disponíveis na natureza. A Celulose II é obtida principalmente do tratamento alcalino da Celulose I, sendo que o polimorfo II consiste em duas cadeias de celulose dispostas de forma antiparalela, diferentemente da Celulose I, em que as cadeias estão paralelas (WADA; HEUX; SUGIYAMA, 2004). A Figura 5 ilustra as posições das cadeias gerando células unitárias diferentes.

Figura 5 - Projeções das duas células unitárias da Celulose I e II respectivamente em dois diferentes planos.

Fonte: KROON-BATENBURG; KROON (1997) e O'SULLIVAN (1997).

A rigidez da estrutura criada pelas ligações hidrogênio é uma propriedade típica da celulose, bem como a sua resistência a forças de tensão e a sua insolubilidade na maioria dos solventes (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017).

1.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são macromoléculas constituídas por diferentes açúcares. Correspondem a heteropolissacarídeos com uma estrutura complexa contendo unidades de glicose, xilose, manose, galactose, arabinose, frutose, ácido glicurônico, dentre outros (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017). A Figura 6 apresenta os principais açúcares presentes nas estruturas das hemiceluloses.

Figura 6 - Componentes principais das hemiceluloses.

Fonte: Próprio Autor.

O conteúdo e a estrutura das hemiceluloses são diferentes dependendo da natureza das plantas, sendo as diferenças relacionadas às composições da cadeia principal e das ramificações. Devido ao baixo grau de polimerização, aproximadamente entre 80 e 200, e ao fato de as cadeias estarem presentes em regiões não cristalinas, as hemiceluloses são mais facilmente degradadas em ácidos moderados ou bases em relação a celulose (CHEN, 2014). Logo, é possível aplicar pré-tratamentos na biomassa utilizando ácidos moderados e bases fortes, visando remover parcial ou totalmente as hemiceluloses.

1.2.3 Lignina

A lignina é um dos mais abundantes constituintes de plantas, sendo uma macromolécula aromática derivada de precursores fenilpropanóides. Possui natureza aromática e sua estrutura varia de acordo com a espécie da planta, e como uma determinada planta foi cultivada. Três precursores podem ser considerados: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, Figura 7.

Figura 7 – Precursores para a formação da lignina.

Fonte: Próprio Autor.

A lignina pode interferir na hidrólise da celulose e das hemiceluloses, quando se deseja convertê-las em açúcares solúveis. Pré-tratamentos que visem remover a lignina, podem levar a maior eficiência na obtenção dos açúcares provenientes da celulose (KASCHUK et al., 2017).

1.3 Fibras Lignocelulósicas

O curauá (*Ananas erectifolius*), Figura 8, é uma planta cultivada na região amazônica, em condições semiáridas. Uma composição típica das fibras desta planta corresponde a 63% de celulose, 30% de hemiceluloses, 5% de lignina total e 0,5% de cinzas (CASTRO, 2014). Pertence à família das Bromeliáceas, de porte herbáceo, atribuído a espécies caracterizadas por não possuir o caule lenhoso, sendo, portanto flexíveis e verdes em geral. Suas folhas são rígidas, eretas e com faces planas, podendo alcançar mais de um metro de comprimento e cerca de quatro centímetros de largura (MONTEIRO et al., 2006).

Figura 8 - Planta de curauá (*Ananas erectifolius*).

Fonte:(MONTEIRO et al., 2006).

A cana de açúcar é uma das plantas mais cultivadas no mundo com a produção, em 2016, estimada em mais de 1,89 bilhão de tonelada, sendo que 40% foram produzidas no Brasil (FAO, 2017). A produção de açúcar gera uma grande quantidade de bagaço da cana (SATYANARAYANA; GUIMARÃES; WYPYCH, 2007), em que, de 2016 a 2017, foram produzidas 186 milhões de toneladas de bagaço, ou seja, em torno de 24% da cana (DAVID et al., 2018). Diversos estudos estão associados ao seu aproveitamento para a obtenção de açúcares. Outras fibras lignocelulósicas, que possuem grande potencial de obtenção de açúcares devido ao alto teor de celulose são menos exploradas (BHATTACHARYA; GERMINARIO; WINTER, 2008; BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; GIRISUTA et al., 2013). O bagaço da cana de açúcar possui 71% de holocelulose (celulose + hemiceluloses), 23% de lignina insolúvel e 3% de cinzas. A Tabela 1 ilustra o teor de holocelulose (celulose + hemiceluloses), lignina, cinzas e de extrativos (ceras, terpenos e ácidos graxos) de algumas plantas cultivadas no Brasil e no mundo.

Tabela 1 - Teor de holocelulose (celulose e hemiceluloses), lignina insolúvel, cinzas e extrativos de algumas fibras lignocelulósicas.

Fibra	Holocelulose (%)	Lignina Insolúvel (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)
Algodão	90,0	-	-	-
Abacaxi	93	12	0,1-1,0	-
Palha de arroz	51-70	12-16	15-20	-
Bagaço de cana-de-açúcar	71	23	3	-
Curauá	93	5	0,5	-

Fonte: Satyanarayana (2018) e Castro (2014).

Nota-se que algumas fibras possuem teor de holocelulose (celulose e hemiceluloses) superior ao bagaço de cana de açúcar, o que indica um bom potencial de conversão de açúcares a etanol celulósico. Destaca-se que a fibra de curauá (*Ananas erectifolius*) também possui alto teor de holocelulose (aproximadamente entre 85% e 90%, CASTRO, 2014), podendo, portanto, ser considerada como fibra com alto potencial para ser usada na produção de etanol celulósico

A fibra de curauá é leve e resistente, sendo empregada como matéria-prima na produção de compósitos poliméricos em indústrias automotivas e têxteis (CORRÊA et al.,

2010) e compósitos cimentícios por extrusão (TEIXEIRA, 2015). No grupo MacromoLignocell, grupo de pesquisa voltado para exploração de biomassa vegetal, onde o presente trabalho foi desenvolvido, a fibra já foi empregada para preparo de compósitos de matriz polimérica bio-baseadas (CASTRO et al., 2017; CASTRO; RUVOLLO-FILHO; FROLLINI, 2012; FROLLINI et al., 2015).

A fibra de curauá, também foi considerada no grupo MacromoLignocell quanto ao processo de sacarificação (conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares fermentescíveis, via hidrólise), via hidrólise enzimática (Gomes, 2017), devido ao potencial desta fibra para a geração de açúcares solúveis, devido ao seu alto teor de celulose. **O estudo realizado por Gomes (2017) correspondeu a uma exploração inicial da fibra de curauá, submetendo a um pré-tratamento via solução básica com a posterior hidrólise enzimática e o presente estudo correspondeu a um aprofundamento na investigação do processo de sacarificação da fibra de curauá, submetendo a mesma a pré-tratamentos, utilizando soluções ácida e básica, visando favorecer a etapa de hidrólise enzimática.**

1.4 Pré-tratamentos

O pré-tratamento é uma etapa importante do processamento da biomassa vegetal, pois podem levar a extração de componentes que interfiram na hidrólise enzimática, bem como modificar a morfologia e a cristalinidade das fibras lignocelulósicas. Estas modificações podem exercer grande influência no processo de sacarificação, pois a interação entre os catalisadores, como as enzimas, com a superfície pode ser modificada, assim como o acesso às cadeias de celulose (BEHERA et al., 2014). A Figura 9 ilustra possíveis efeitos que os pré-tratamentos podem exercer sobre as fibras lignocelulósicas, em que o pré-tratamento pode afetar as interações entre as cadeias de celulose, hemiceluloses e lignina, gerando hexoses, pentoses e fragmentos de lignina.

Figura 9 - Representação esquemática de possíveis efeitos de pré-tratamentos sobre a biomassa lignocelulósica

Fonte: ZHAO; ZHANG; LIU (2012) modificado.

Pré-tratamentos físico, físico-químico, biológico e químico são utilizados na biomassa lignocelulósica, visando melhorar a hidrólise enzimática, prevenir a perda ou degradação dos carboidratos, evitar a formação de inibidores para a subsequente hidrólise enzimática, gerar aumento no rendimento de monossacarídeos, fracionar os componentes da lignocelulose para melhor performance econômica e reduzir o gasto energético, químico e enzimático, reduzindo consequentemente o custo econômico (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017).

Alguns tipos de pré-tratamentos físicos são: a moagem, que altera o grau de polimerização, porosidade, superfície de contato e cristalinidade, beneficiando a hidrólise enzimática, já que a enzima é dependente do contato com lignocelulose, e ultrassom, que visa quebrar as ligações entre as macromoléculas da biomassa (AGBOR et al., 2011).

Como pré-tratamentos físico-químicos pode-se citar a explosão a vapor, que resulta na utilização de vapores a alta pressão e subsequentemente numa súbita redução dela, gerando uma ruptura da matriz polimérica; CO₂ supercrítico, que utiliza um gás comprimido de CO₂ com temperatura acima da crítica desestruturando a matriz polimérica, gerando menos

inibidores em relação a explosão a vapor; e pré-tratamento líquido com água quente (LWH – Liquid Hot Water) que submete a biomassa lignocelulósica a elevadas temperaturas utilizando água, resultando na hidrólise de hemiceluloses e remoção de lignina (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

O pré-tratamento biológico causa uma deslignificação parcial da biomassa usando agentes biológicos, como o fungo branco ou marrom (*Basidiomycetes*) que produz enzimas capazes de desestruturar a biomassa lignocelulósica. Ele só pode ser considerado utilizável quando combinado com o pré-tratamento químico ou físico. A combinação dos pré-tratamentos pode criar um sinergismo capaz de aumentar a eficiência do produto final e encurtar o tempo de reação (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017).

O pré-tratamento químico se divide em: hidrólise ácida, que utiliza ácidos fortes ou fracos a baixas concentrações para hidrolisar as hemiceluloses, tornando a celulose mais acessível na biomassa; hidrólise básica, em que são utilizados NaOH, KOH, Ca(OH)_2 ou hidrazina para reduzir o grau de polimerização e a cristalinidade da celulose, e romper a estrutura da lignina; deslignificação oxidativa, que consiste na utilização de um agente oxidante como o peróxido de hidrogênio que oxida parcialmente a lignina e as hemiceluloses, resultando em ácidos carboxílicos de baixa massa molar; e processo em solução orgânica (Organosolv), que consiste na utilização de solventes orgânicos para remover as hemiceluloses e a lignina (AGBOR et al., 2011; ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

No presente trabalho aplicou-se um pré-tratamento físico utilizando a moagem, e posteriormente um pré-tratamento com solução aquosa alcalina (NaOH), e outro usando solução aquosa ácida (ácido oxálico, $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) antes de submeter a fibra lignocelulósica de curauá a hidrólise enzimática.

1.4.1 Pré-tratamento em Meio Ácido

A lignina é um obstáculo em potencial para a eficiência da sacarificação enzimática de polissacarídeos presentes nas fibras lignocelulósicas, pois a sua presença dificulta o acesso das enzimas aos mesmos. Também uma parte das enzimas pode se adsorver sobre a lignina, tornando menos eficiente a hidrólise enzimática da celulose e das hemiceluloses. Além disso, a lignina dificulta o acesso da enzima à celulose e às hemiceluloses, resultando em tempos mais

extensos de reação. O ácido pode também remover total ou parcialmente as hemiceluloses, tornando a celulose mais facilmente acessível (QING; YANG; WYMAN, 2010).

O pré-tratamento implica no uso de ácido concentrado ou diluído. O ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorídrico (HCl), ácido nítrico (HNO_3) e ácido trifluoroacético (TFA) são os mais utilizados. A temperatura é um outro fator importante. A reação pode ser conduzida a baixas temperaturas na presença de alta concentração de ácido ou elevadas temperaturas com baixa concentração do ácido utilizado. Concentrações podem variar de 0,5 a 1,5% dos ácidos utilizados a 140-210 °C, evitando-se problemas associados à corrosão de reatores. Por conta disso, reações envolvendo ácido diluído têm sido um dos métodos mais empregados para pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017).

Apesar da disponibilidade de diversos tipos de ácidos, usou-se neste trabalho um ácido que pode ser obtido a partir de fontes naturais, ou seja, o ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ – ácido etanodióico), o qual já foi utilizado para sacarificação via hidrólise ácida em estudo prévio no grupo Macromolignocell (LACERDA; ZAMBON; FROLLINI, 2015) e como pré-tratamento (LEE et al., 2011). O ácido está presente em muitas plantas e vegetais, sendo também produto do metabolismo de fungos. Algumas destas espécies convertem açúcares em oxalato de cálcio, podendo, subsequentemente, ser convertido em ácido oxálico (BUDAVARI, 1996). **Utilizou-se neste estudo o ácido oxálico para pré-tratamento da fibra lignocelulósica de curauá, a fim de avaliar o seu respectivo efeito na hidrólise enzimática realizada posteriormente.**

1.4.2 Pré-tratamento em Meio Básico (Mercerização)

A lignina presente na biomassa pode interagir com as enzimas usadas na hidrólise da celulose, reduzindo, dessa forma, a eficiência da interação entre as enzimas e a celulose, diminuindo a taxa de reação e o respectivo rendimento, conforme mencionado. O tratamento com hidróxido de sódio pode aumentar a acessibilidade de solventes, de reagentes, ou de catalisadores às cadeias de celulose (KASCHUK et al., 2017; LACERDA et al., 2012).

O pré-tratamento com solução aquosa alcalina (mercerização) pode aumentar a superfície interna das fibras por intumescimento, reduzir o grau de polimerização e cristalinidade da celulose e destruir as ligações entre a lignina e as hemiceluloses (BADIEI et al., 2014). NaOH, KOH e $\text{Ca}(\text{OH})_2$ são as bases mais utilizadas no pré-tratamento alcalino, em condições de temperatura e concentração brandas, e pode hidrolisar parcialmente a biomassa

lignocelulósica (AMIN et al., 2017). Vale destacar que a mercerização depende do tempo, da concentração da solução de NaOH, da razão celulose/solução e das propriedades inerentes a celulose utilizada, sendo que a extensão com que as modificações na fibra celulósica ocorrem pode variar dependendo desses fatores (KASCHUK, 2014).

Os resultados do pré-tratamento alcalino em farinha de milho, bagaço de cana de açúcar, trigo, palha de arroz, madeira dura e macia e sisal revelaram a eficácia do método empregado para a remoção parcial ou total da lignina presente na fibra lignocelulósica (BADIEI et al., 2014; KASCHUK et al., 2017). **Neste contexto, o pré-tratamento alcalino foi empregado na fibra lignocelulósica de curauá antes de submetê-la a hidrólise enzimática.**

1.4.3 Hidrólise Enzimática

A conversão da biomassa lignocelulósica a etanol celulósico ocorre em três etapas: pré-tratamento da fibra lignocelulósica (pré-tratamento químico, físico, físico-químico ou biológico) (JAISWAL; RAVINDRAN, 2015), a hidrólise enzimática e a fermentação. Depois de pré-tratada, a fibra pode se submetida a diversas formas de hidrólise enzimática e de fermentação, podendo até mesmo ser conduzido com a mistura gerada pelo pré-tratamento, ou seja, sem separação do sólido com as frações líquidas. A opção mais comum é realizar a filtração do licor gerado no pré-tratamento, seguida de hidrólise enzimática e a fermentação do sólido pré-tratado. Diante disso, existem 3 possibilidades de promover a hidrólise e a fermentação: a) realizar a hidrólise enzimática e a fermentação separadamente (SHF); realizar a hidrólise e a fermentação simultaneamente (SSF), c) realizar a hidrólise previamente e inocular posteriormente o microrganismo fermentador (PSSF) (MESA et al., 2011). A SHF possui a vantagem da hidrólise enzimática da fibra pré-tratada ocorrer na ausência de inibidores, os quais podem reduzir o rendimento da fermentação (KÁDÁR; SZENGYEL; RÉCZEY, 2004). **No presente trabalho foram realizados estudos da produção de açúcares fermentescíveis a partir da fibra lignocelulósica de curauá, os quais podem ser convertidos em etanol. A SHF foi utilizada neste trabalho, porém apenas na etapa de obtenção de açúcares foi investigada.**

A hidrólise enzimática da celulose é realizada por enzimas denominadas celulasas, compostas por endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases, as quais agem simultaneamente na conversão da celulose em oligossacarídeos e glicose (YU et al., 2015). A

reação é conduzida em condições brandas, com pH variando entre 4 e 5 e temperaturas entre 40 e 50 °C. Problemas associados à corrosão de reatores são inexistentes, os custos de energia elétrica são menores e a toxicidade dos reagentes é baixa, fazendo desta hidrólise um processo vantajoso para a sacarificação da biomassa, comparativamente à sacarificação via catálise ácida (LACERDA, 2012a).

No entanto, as reações enzimáticas demandam um grande tempo de reação, que podem ser de 48 h, 60 h e 120 h, (KASCHUK; FROLLINI, 2018; LIU et al., 2016; ZHOU et al., 2015) em relação a hidrólise ácida que pode ser de 1 h ou menos (IONEL BALCU, CORINA AMALIA MACARIE, 2011; ZHOU et al., 2014), e possui um custo mais elevado em relação a hidrólise ácida ou básica. A via enzimática possui baixa eficiência devido às dificuldades de acesso ao substrato dada à heterogeneidade do material (KUMAR; WYMAN, 2009). Para aumentar o rendimento, pré-tratamentos são realizados para facilitar o acesso das enzimas a celulose.

A hidrólise enzimática consiste na utilização de enzimas específicas produzidas por bactérias ou fungos. Os produtos gerados pela hidrólise enzimática são essencialmente a glicose e alguns outros produtos, como a celobiose. A vantagem deste processo, com relação à catálise ácida, é que não ocorre a formação de produtos derivados da decomposição dos açúcares como o furfural. O mecanismo é dado pela ação simultânea de endoglucanases e celobio-hidrolases que hidrolisam a celulose, que possui domínios cristalinos e não cristalinos, modificando o comprimento e a espessura das fibras, no estado sólido gerando glicoses solúveis (LACERDA, 2012b; LEE R. LYND, PAUL J. WEIMER, WILLEM H. VAN ZYL, 2002), conforme ilustrado na Figura 10.

1.4.3.1 Celulases

As celulases são enzimas formadas por endoglucanases, exoglucanas e β -glicosidases (KASCHUK, 2014). As endoglucanases são responsáveis por romper aleatoriamente a cadeia de celulose. As exoglucanases são responsáveis por romper as unidades a partir do final da cadeia. Existem dois tipos de exoglucanases: a exo-celobio-hidrolase (1,4- β -D-glucanos celobiohidrolases) que remove resíduos de celobiose pelo terminal não redutor; e a exo-glicohidrolase (β -1,4-D-glicanase) que remove resíduos de glicose pelo terminal não redutor (MENEZES; BARRETO, 2015).

A Figura 10 apresenta a ilustração provável da hidrólise enzimática da celulose à glicose. Postulou-se um elemento desconhecido do sistema da celulase chamado C1 (fator de intumescimento) que cria uma abertura na matriz da celulose, permitindo, diante disso, maior acesso ao substrato para sua despolimerização pela enzima. Esse processo foi chamado de amorfogênese (ARANTES; SADDLER, 2010).

Figura 10 - Mecanismo proposto para a amorfogênese/despolimerização da celulose pelas celulases.

Fonte: Adaptado ARANTES; SADDLER (2010).

As β -glicosidases são enzimas que hidrolisam a celobiose e a celodextrina formando glicose. Eles são a chave catalítica da degradação da biomassa lignocelulósica, porque liberam glicose, que pode ser convertida em etanol via fermentação. Não são consideradas uma celulase específica, mas uma enzima auxiliar que pode ser inibida se houver elevadas quantidades de resíduos de celobiose (GUPTA, 2016). As endoglucanases e as exoglucanases realizam uma função conjunta hidrolisando a celulose em celo-oligossacarídeos e celobiose que são solúveis (MENEZES; BARRETO, 2015).

1.4.3.2 Hemicelulases

As propriedades químicas e estruturais das hemiceluloses podem ser influenciadas pela presença de componentes presentes em sua estrutura e pela forma como eles estão

distribuídos, necessitando uma série de enzimas para a sua degradação. O sistema enzimático capaz de hidrolisar as hemiceluloses, que contém xilana como componente principal, é composto principalmente por β -1,4-endoxilanase e β -xilosidases (MENEZES; BARRETO, 2015).

A enzima β -1,4-endoxilanase (β -1,4-D-Xilana Xilo-hidrolase) promove a quebra de ligações glicosídicas do esqueleto heteroxilana, resultando na redução do grau de polimerização do substrato. Seu ataque não ocorre ao acaso, bem como as ligações a serem hidrolisadas dependem do comprimento, do grau de ramificação do composto e da presença de substituintes. Os principais compostos gerados no início da hidrólise da xilana são os xilo-oligossacarídeos (GUPTA, 2016; VA; ALONSO, 2000). As β -D-xilosidase são exoglicosidases que são capazes de hidrolisar os xilo-oligossacarídeos, gerando compostos com grau de polimerização menores, chegando até a xilose (MENEZES; BARRETO, 2015).

O acesso à celulose pelas enzimas, visando a respectiva hidrólise, deve ser facilitado para que haja o aumento da eficiência da reação. Para isso, pré-tratamentos podem ser realizados, por exemplo visando separar a lignina, um dos interferentes da hidrólise enzimática, e as hemiceluloses. O álcali ou o ácido podem romper as ligações hidrogênio entre as hemiceluloses e a celulose, aumentando a disponibilidade dos grupos hidroxila das cadeias de celulose e a respectiva reatividade. Este objetivo pode ser alcançado via tratamento com solução aquosa alcalina (KASCHUK et al., 2017), via ultrassom combinado com soluções alcalinas (ARENAS-CÁRDENAS et al., 2017; SUBHEDAR; GOGATE, 2014) ou usando soluções ácidas (YUNUS et al., 2010), dentre outros, visando maior acessibilidade das cadeias de celulose para hidrólise.

Neste estudo, a fibra lignocelulósica de curauá foi submetida a pré-tratamentos utilizando solução de ácido oxálico. Adicionalmente, os estudos associados a mercerização feitos por Gomes (GOMES, 2017) foram aprofundados, sendo as fibras pré-tratadas submetidas a hidrólise enzimática

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Otimizar a sacarificação da fibra lignocelulósica de curauá via pré-tratamentos químicos, via solução ácida ou básica e pré-tratamento físico aplicados às mesmas, assim como buscar condições de hidrólise enzimática para aumentar a eficiência do processo.

2.2 Objetivos Específicos

Submeter a fibra lignocelulósica de curauá a pré-tratamento utilizando solução aquosa de ácido oxálico ou de hidróxido de sódio (mercerização), caracterizar as fibras de partida e as pré-tratadas.

Submeter as fibras lignocelulósicas de curauá pré-tratadas à hidrólise enzimática.

Caracterizar as fibras que não reagiram durante a hidrólise, assim como os licores, isolados durante e após o final da hidrólise enzimática.

Obter maior rendimento na de açúcares durante a hidrólise enzimática usando a fibra lignocelulósica de curauá submetida previamente a pré-tratamento com solução aquosa de ácido oxálico ou de hidróxido de sódio, comparativamente a fibra não tratada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Fibra de curauá: foi cedida pela empresa PEMATEC Triangel do Brasil Ltda (São Paulo – SP, Brasil).

- Cicloexano (Synth) e etanol 98% (Synth), usado na extração de extrativos;
- Clorito de sódio (Sigma-Aldrich), usado na determinação de holocelulose;
- Hidróxido de sódio em lentilhas (Qhemis), usado na determinação de α -celulose e na mercerização;

- Ácido acético glacial (Synth), usado na determinação do teor de α -celulose e holocelulose;
- Citrato de sódio e ácido cítrico (Qhemis) para a preparação de tampão citrato, usado nas reações de hidrólise enzimática;
- Complexo enzimático Accellerase 1500 (Genencor), usado nas reações de hidrólise enzimática I;
- Ácido Sulfúrico 95-98% (Sigma-Aldrich), usado na determinação de lignina Klason insolúvel.
- Celobiose, D-xilose (Sigma-Aldrich), L-arabinose (Sigma- Aldrich), ácido acético (49-51%, Sigma-Aldrich), ácido fórmico (49-51%, Sigma- Aldrich), 5-hidroximetil-2-furfuraldeído (HMF, Sigma-Aldrich) e 2-furfuraldeído (furfural, Sigma-Aldrich), todos de grau cromatográfico, usados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Lavagem da Fibra de Curauá em Água a Temperatura Ambiente e a 70 °C*

A lavagem foi realizada com o objetivo de remover resíduos e sais aderidos às fibras, e que possam comprometer as etapas de pré-tratamentos e da hidrólise enzimática (FROLLINI et al., 2013).

Pesou-se 40,0 g de fibras de curauá. Transferiu-se as fibras para um béquer de 5 L e lavou-se as fibras com água (temperatura ambiente) sucessivamente para a eliminação de poeiras e partículas aderidas às fibras, e, após a eliminação da água, as fibras foram secas por 24 h, a temperatura ambiente. Na sequência, as fibras foram desfiadas manualmente e novamente lavadas. A nova lavagem foi efetuada para eliminar resíduos liberados durante o desfiação, sendo a última lavagem realizada com água destilada. Na sequência, as fibras foram secas em estufa a 105 °C até massa constante.

Posteriormente, as fibras (aproximadamente 34 g), foram lavadas utilizando 3 L de água destilada a 70 °C, durante 1 h para remover açúcares residuais. Subsequentemente, as fibras foram secas a temperatura ambiente e postas em estufa a 105 °C até obter massa constante, sendo então pesadas e subsequentemente submetidas a extração usando uma mistura de

etanol e cicloexano (1:1) para remoção de possíveis ceras, terpenos e ácidos graxos (FROLLINI et al., 2013).

3.2.2 Eliminação de Extrativos da Fibra de Curauá usando Mistura Etanol e Cicloexano (1:1)

Esse método foi utilizado por Santos (2012), com o objetivo de remover os extrativos orgânicos, bem como as impurezas inorgânicas presentes na fibra. Utilizou-se um balão de fundo redondo de 5 L previamente seco em estufa. Adicionou-se as fibras anteriormente lavadas ao balão. Adicionou-se em seguida a mistura de etanol e cicloexano (1:1). O balão foi colocado em uma manta de aquecimento para manter o aquecimento homogêneo do sistema, sob refluxo utilizando condensador de bolas para condensar os vapores da mistura de etanol e cicloexano, mantendo o sistema sob refluxo durante 10 min. Após isso, desligou-se a manta de aquecimento e, após resfriamento, o solvente foi separado e as fibras foram exaustivamente lavadas com água, sendo após, transferidas para uma bandeja, a fim de eliminar o excesso de solventes à temperatura ambiente. Em seguida, as fibras foram colocadas em estufa, elevando-se a temperatura gradativamente até atingir 105 °C, permanecendo nesta temperatura até manter a massa constante, sendo então resfriadas e na sequência pesadas.

3.2.3 Moagem da Fibra de Curauá

A fibra, após submetida às etapas anteriores, foi moída utilizando um moinho Marconi (MA048) a 1725 RPM e coletada através de uma tela com mesh 32 (0,05 mm). Com a fibra moída, reduz-se o tamanho dela, aumentando a área de superfície acessível para posteriores tratamentos.

3.3 Pré-tratamento com Ácido Oxálico 0,9 M

As fibras, anteriormente lavadas e moídas, foram submetidas ao pré-tratamento utilizando o ácido oxálico 0,9 mol.L⁻¹ sob agitação mecânica na proporção de 1:30 em massa. Tais condições foram utilizadas com base em estudos feitos por Lacerda (2012) ao utilizar ácido oxálico para hidrolisar a polpa de sisal. Três condições foram utilizadas: pré-tratamento durante 1 h e 30 min, a temperatura ambiente e a 60 °C, e durante 3 h a 60 °C. Após esse tempo, as fibras foram lavadas várias vezes até o pH da água de lavagem se igualar ao da água destilada de partida. Em seguida, as fibras foram secas em estufa, elevando-se a temperatura gradativamente até atingir 105 °C, permanecendo nesta temperatura até massa constante.

3.4 Pré-tratamento com Hidróxido de Sódio 20%

As fibras, anteriormente lavadas e moídas, foram submetidas a pré-tratamento utilizando hidróxido de sódio 20%, sob agitação mecânica, na proporção de 1:20 em massa. Tais condições foram utilizadas com base em estudos feitos por Gomes (2017) e por Kaschuk (2017) ao utilizarem hidróxido de sódio para pré-tratarem as fibras de curauá e a polpa de sisal respectivamente. Duas condições foram utilizadas: pré-tratamento durante 2 h a 60 °C e outro durante 5 h a 60°C, sendo estas condições selecionadas a partir de resultados de estudo anterior (GOMES, 2017), visando o aprofundamento do mesmo. Após esse tempo, as fibras foram lavadas várias vezes até o pH da água de lavagem se igualar ao da água destilada de partida. Em seguida, as fibras foram colocadas em estufa, elevando-se a temperatura gradativamente até atingir 105 °C, permanecendo nesta temperatura até massa constante.

3.5 Caracterização da Fibra Lignocelulósica de Curauá

3.5.1 Determinação do Teor de Lignina

O método foi baseado na hidrólise ácida dos polissacarídeos presentes na fibra e, subsequentemente, na separação e determinação, por gravimetria, da lignina insolúvel em ácido sulfúrico (H₂SO₄ 72%) (FENGEL; WEGENER, 1989). O teor foi determinado a partir da

soma do teor de lignina solúvel e insolúvel quantificadas pelos métodos a seguir. As análises foram realizadas em triplicata.

3.5.1.1 Teor de Lignina Klason Insolúvel

Para esta medida, pesou-se 1 g da amostra de fibra previamente seca em estufa a 105 °C. A amostra foi adicionada em um erlenmeyer de 250 mL. Em seguida, adicionou-se 15 mL de ácido sulfúrico 72%. A amostra foi submetida a agitação mecânica durante 2 h. Após isso, a amostra foi transferida a um balão de 1 L, adicionando-se em seguida, 560 mL de água destilada, seguido de refluxo (utilizando condensador de bolas) por 4 h. Subsequentemente, filtrou-se a lignina insolúvel em um funil de vidro sinterizado – nº 3 (previamente tarado), lavando a amostra várias vezes com água destilada até pH igual ao da água de partida. Em seguida, o funil contendo a lignina foi colocado em uma estufa a 105 °C até obter uma massa final constante (SANTOS, 2012). O método é descrito pela norma TAPPI (T 222 om-02). O teor foi obtido de acordo com a Equação 1. A análise foi realizada em triplicata.

$$Lig. insolúvel = \frac{(m_{funil+lignina} - m_{funil})}{m_{amostra\ inicial}} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

Sendo: $m_{funil+lignina}$ = massa do funil sinterizado + lignina

m_{funil} = massa do funil sinterizado

$m_{amostra}$ = massa inicial da amostra previamente seca em estufa a 105 °C

3.5.1.2 Teor de Lignina Klason Solúvel

O teor de lignina Klason solúvel foi obtido através da espectroscopia na região do ultravioleta (UV). O filtrado obtido da lignina Klason insolúvel foi analisado através da espectroscopia, sendo determinadas as absorbâncias nos comprimentos de onda 215 e 280 nanômetros (nm), conforme consta na norma TAPPI T13 m-54 (FENGEL; WEGENER, 1989). As concentrações foram determinadas através da Equação 2. A análise foi realizada em triplicata.

$$C \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{4,53 \times (A_{215}) - A_{280}}{300} \quad (\text{Eq. 2})$$

Sendo: C (g.L⁻¹) = concentração de lignina Klason solúvel em amostra diluída.

A₂₁₅ = absorbância em 215 nanômetros

A₂₈₀ = absorbância em 280 nanômetros

Através da soma dos resultados obtidos em 3.5.1.1 e 3.5.1.2, foi possível obter o teor total de lignina presente na fibra de curauá.

3.5.2 Determinação do Teor de Holocelulose

A holocelulose corresponde a soma dos teores de celulose e hemiceluloses (polioses). Foi utilizado o método descrito pela norma da TAPPI T 19 m-54, com modificações para a adaptação às fibras lignocelulósicas (RAZERA, 2006).

Em um frasco erlenmeyer de 1 L, adicionou-se 3,0 g de amostra previamente seca em estufa a 105 °C e moída, 250 mL de água destilada, 1,0 mL de ácido acético glacial (CH₃COOH) e 2,5 g de clorito de sódio (NaClO₂). Fechou-se o recipiente, mantendo a mistura em um banho termostatizado 70 ± 2 °C.

A mistura foi mantida sob agitação magnética. Após 1 h, adicionou-se mais 1,0 mL de ácido acético glacial e 2,5 g de clorito de sódio. Repetiu-se esta etapa mais 1 vez. Após 3 h de reação, resfriou-se a mistura até aproximadamente 10°C. Subsequentemente, filtrou-se a mistura em um funil sinterizado previamente tarado. A holocelulose, amostra retida no funil, foi lavada com água destilada até o pH ser idêntico ao da água de partida. Por fim, a amostra foi lavada com 15 mL de metanol por três vezes seguidas, e seca em estufa a 105 °C até obter uma massa constante.

Em seguida, a massa foi resfriada para ser finalmente pesada. O teor de celulose foi obtido pela Equação 3. A análise foi realizada em triplicata.

$$\text{Teor de holocelulose} = \frac{(m_{\text{funil+holocelulose}} - m_{\text{funil}})}{m_{\text{amostra inicial}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo: $m_{\text{funil+lignina}} = \text{massa do funil sinterizado} + \text{lignina}$

$m_{\text{funil}} = \text{massa do funil sinterizado}$

$m_{\text{amostra}} = \text{massa inicial da amostra previamente seca em estufa a } 105\text{ }^{\circ}\text{C}$

Neste processo, toda a lignina presente na fibra foi eliminada, sendo que a massa final foi composta apenas por celulose e hemiceluloses.

3.5.3 Determinação do Teor de α -celulose

Para a determinação de α -celulose, foram utilizadas as amostras de holocelulose da etapa 3.5.2. A α -celulose é insolúvel em solução de hidróxido de sódio (NaOH) 17,5%. Então, em 1,0 g de amostra de holocelulose previamente seca em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$, adicionou-se 10,0 mL de solução de NaOH 17,5%. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso por 2 min e triturada utilizando um almofariz e pistilo por 8 min. Subsequentemente, adicionou-se mais 10 mL de NaOH 17,5%, deixando em repouso por mais 20 min. Em seguida, adicionou-se 40,0 mL de água destilada, sendo a mistura, depois, filtrada a vácuo em funil de vidro sinterizado previamente tarado. A amostra remanescente no funil foi lavada com água destilada, seguida de adição de 200,0 mL de ácido acético diluído 20% e 200,0 mL de água destilada. Finalmente, a amostra foi seca em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ até obter uma massa constante. Tal massa correspondeu ao teor de α -celulose (BROWNING, 1967). A análise foi realizada em triplicata.

3.5.4 Determinação do Teor de Umidade

O método foi descrito na norma ABNT (NBR 9656). Pesou-se, em um pesa-filtro previamente tarado, 1,0 g de amostra. Esta foi seca em estufa de circulação de ar a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. Em seguida, esta foi transferida a um dessecador para resfriar e, subsequentemente, ser pesada até obter uma massa constante. O teor de umidade foi calculado pela Equação 4. A análise foi realizada em triplicata.

$$\text{Teor de umidade} = \frac{(m_{\text{pesa-filtro+amostra}} - m_{\text{pesa-filtro}})}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Sendo: $m_{\text{pesa-filtro} + \text{amostra}} = \text{massa do pesa-filtro} + \text{amostra}$

$m_{\text{pesa-filtro}} = \text{massa do pesa-filtro}$

$m_{\text{amostra}} = \text{massa da amostra}$

3.5.5 Determinação do Teor de Cinzas

O método foi descrito pela norma TAPPI T 211, sendo realizado em triplicata. Adicionou-se, em cadinhos de porcelana previamente tarados a 900 °C durante 4 h, 1,0 g de fibra seca e moída. Esses foram levado ao bico de Bunsen até ocorrer a combustão da amostra. Subsequentemente, os cadinhos foram levados a mufla, a 900 °C durante 4 h. Em seguida, as amostras, já calcinadas, foram transferidas para um dessecador para resfriarem e, subsequentemente, serem pesadas até obter uma massa constante. O teor de cinzas foi calculado a partir da Equação 5.

$$\text{Teor de cinzas} = \frac{(m_{\text{cadinho} + \text{amostra}} - m_{\text{cadinho}})}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

sendo: $m_{\text{cadinho} + \text{amostra}} = \text{massa do cadinho} + \text{amostra}$

$m_{\text{cadinho}} = \text{massa do cadinho}$

$m_{\text{amostra}} = \text{massa da amostra}$

3.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica que utiliza um feixe de elétrons ao invés de fotos que são utilizados na microscopia óptica convencional, permitindo solucionar problemas de resolução relacionados a fonte de luz branca (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007). As fibras, moídas ou não, foram submetidas a tal análise para avaliar eventuais mudanças decorrentes dos procedimentos realizados na fibra de curauá.

As micrografias de MEV foram obtidas em um equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 15kV, corrente de 2,82A e I probe de 200pA. As amostras foram recobertas com 6 nm de ouro em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) e

mantidas em dessecador até o momento de análise. Condições de metalização: pressão na câmara = $2,00 \times 10^{-2}$ mbar; corrente = 60mA; taxa de deposição 0,60nm/s).

3.5.7 Comprimento e Espessura Médios das Fibras

Para esta análise, foi utilizado o equipamento MorFiCompact (Techpap), que permite determinar o comprimento e espessura médios das fibras sob análise com dimensões na escala de micrômetros (μm). O material foi suspenso em água, em ambiente fechado e não necessitando de pré-preparo da amostra, fazendo com que no equipamento ocorresse uma medição estatística automatizada de 5 mil fibras aproximadamente, de forma precisa.

Figura 11- Analisador de fibras (MorFiCompact).

Fonte: Techpap (2016).

Com os dados obtidos, foi possível construir dois tipos de gráficos: um mapa de densidade formado por 3 eixos, em que os eixos x, y e z são, respectivamente, o comprimento médio, a espessura média e a densidade de ocorrência de fibras (milhões.g^{-1}); e um gráfico em barras gerando a ocorrência de fibras (milhões.g^{-1}) em função do comprimento médio ou da espessura média.

3.5.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que analisa a variação de massa da amostra em função da temperatura e/ou tempo, sendo a temperatura programada para

controle. A Termogravimetria Diferencial (DTG) é uma ferramenta que identifica os eventos através de picos presentes em uma curva obtida a partir da derivada da curva TG.

As curvas TG foram obtidas utilizando o equipamento da Shimadzu modelo T-50. 8,0 mg da fibra foi submetida a análise termogravimétrica utilizando uma célula de platina, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL.min⁻¹, de 20 a 700 °C e com taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹.

3.5.9 Índice de Cristalinidade (I_c)

Utilizou-se a técnica de difração de raios X para determinar o índice de cristalinidade (I_c) da celulose presente nas fibras lignocelulósicas.

Através do difratograma obtido, foi possível analisar os picos característicos da celulose referentes aos planos cristalográficos.

O I_c foi obtido conforme conta na Equação 6 de Buschle-Diller e Zeronian (1992)

$$I_c = \left(1 - \frac{I_1}{I_2}\right) \quad (\text{Eq. 6})$$

Sendo: I_c = índice de cristalinidade

I_1 = intensidade de refração mínima, composta pela região não cristalina (18 ° para celulose I e 16 ° para celulose II).

I_2 = intensidade de máxima refração, composto pela região cristalina (22° ≤ 2θ ≤ 23° para celulose I e 18° ≤ 2θ ≤ 22° para celulose II)

Foi utilizado o equipamento da marca Bruker, modelo D8 Advance equipado com detector LynxEye. As medidas foram realizadas no intervalo de estudo utilizando passos de 0,025 a partir do ângulo inicial com 0,5s de tempo de irradiação por passo.

3.6 Hidrólise Enzimática

As reações de hidrólise foram realizadas visando a produção de açúcares fermentescíveis ou etanol de segunda geração, que corresponde à primeira etapa da

produção de etanol celulósico. Foi usado o complexo enzimático Accellerase 1500 (Genencor), com atividade de endoglucanases de 2200 - 2800 CMC (carboximetilcelulose) U/g e atividade de Beta-glicosidase de 450 – 775 pNPG (para-nitrofenil-B-D-glicopiranoose) U/g, que é composto majoritariamente de exoglucanases, endoglucanases, hemicelulases e β -glucanases (LACERDA, 2012a)

As reações foram conduzidas em frascos de 250 mL (Schott), em tampão de citrato ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$), na proporção de 50 mL de tampão para 1 g de fibra, pH 5. O frasco, o tampão e as fibras foram previamente esterilizados em autoclave (121°C , 20 min). Após resfriados, foi adicionado o complexo enzimático ao sistema, na proporção de 0,5 mL para cada grama de fibra, sendo mantido em uma câmara incubadora com agitação orbital (300 rpm) (Marconi MA410) durante 48 h. O sistema foi mantido a 50°C , menor temperatura recomendada pelo fornecedor da enzima ($50\text{-}65^\circ\text{C}$). As condições foram utilizadas com base em trabalhos realizados para a hidrólise enzimática da polpa de sisal e de fibra de curauá (GOMES, 2017; KASCHUK, 2014)

Nos primeiros 30 min, foram retiradas 3 alíquotas a cada 10 min. Em seguida, as alíquotas foram retiradas de 30 em 30 min até o tempo total da reação de 6 h, de 1 em 1 h até 9 h de reação, de 2 em 2 h até 15 h de reação, de 8 em 8 h até 47 h de reação e, finalmente, uma a 48 h de reação. As alíquotas foram imediatamente filtradas para analisar o licor e as fibras que não reagiram separadamente. Os licores coletados durante os intervalos foram armazenados em frascos âmbar esterilizados previamente em autoclave (121°C , 20 min), evitando contaminação, e resfriados em freezer para em seguida serem analisados. Os licores, após retirada do freezer, até obter temperatura ambiente, foram analisados via **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência** (CLAE), que visa separar, identificar e quantificar os componentes presentes no licor. As fibras que não reagiram foram lavadas utilizando água destilada, em seguida secas em estufa a 105°C até massa constante, subsequentemente foram armazenadas em frascos eppendorf. As fibras foram caracterizadas por MEV, TGA, comprimento e espessura médio das fibras (Morfi) e difração de raios-X (DRX), conforme descrito anteriormente para as fibras de partida.

Para as fibras pré-tratadas utilizando ácido oxálico $0,9 \text{ mol.L}^{-1}$ durante 1 h e 30 min a 60°C , na hidrólise enzimática foram usadas as mesmas condições descritas previamente, mas também realizou-se outra hidrólise enzimática utilizando 1,5 mL de enzima por grama de fibra, a fim de avaliar os efeitos da concentração da enzima em relação ao licor obtido e às fibras

que não reagiram. Fibras submetidas à hidrólise enzimática usando 0,5 mL de enzima por g. de fibra receberam a denominação H05 antes da nomenclatura e aquelas submetidas a hidrólise enzimática utilizando 1,5 mL de enzima receberam a denominação H15.

3.6.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os licores foram diluídos 20 vezes antes de serem analisadas na cromatografia. Os licores foram analisados quanto ao teor de xilose, arabinose, ácido fórmico, ácido acético e glicose em equipamento da SHIMADZU, acoplado a um detector de índice de refração (RID-20^a SHIMADZU) e equipado com coluna Aminex HPX 87H (300 mm x 7,8 mm BIO-RAD). A mistura eluente foi composta de ácido sulfúrico 0,005 mol.L⁻¹ em fluxo de 0,6 mL.min⁻¹. A temperatura do forno (CTO-10A SHIMADZU) foi mantida a 45 °C e a pressão da bomba (LC-20A SHIMADZU) variou entre 60 e 80 kgf.cm⁻². As amostras foram inicialmente filtradas em filtros MILLEX 0,45 µm da Millipore para reter possíveis materiais em suspensão (KASCHUK, 2014).

A composição dos compostos presentes no licor foi identificada de acordo com as comparações no tempo de retenção dos padrões de grau de pureza cromatográficos analisadas por CLAE. Os componentes presentes nas amostras foram quantificados calculando-se a área dos picos dos padrões, criando a curva de calibração multipontual por padrão externo, gerando uma função que determina a concentração dos componentes na amostra com base na área dos picos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da Fibra de Curauá de Partida e Pré-tratada com Ácido Oxálico 0,9M

A fibra de curauá é composta predominantemente por celulose, hemiceluloses e lignina, existindo também outros componentes, porém em menores quantidades (GOMES, 2017). Tratando-se de um material de origem natural, para uma mesma espécie, as proporções dos componentes podem variar devido ao tipo de cultivo da planta, localidade, solo. As fibras, não sendo submetidas a nenhum processo de lavagem, podem carregar impurezas em sua superfície, as quais podem comprometer o processo de obtenção de açúcares fermentescíveis. Logo, as fibras foram submetidas à lavagem com água quente e

extraídas com uma mistura de cicloexano:etanol. A Tabela 2 apresenta os resultados da massa resultante do processo de lavagem utilizando água à temperatura ambiente e a 70 °C, bem como da extração com cicloexano e etanol.

Tabela 2 - Massa resultante da fibra de curauá lavada utilizando água a temperatura ambiente e a 70 °C, e utilizando mistura cicloexano:etanol (1:1).

Massa \ Lavagem	Água (Temperatura Ambiente e 70 °C)	Cicloexano e etanol (1:1)
Massa inicial (g)	40	34
Massa final (g)	34	33
Perda de massa (%)	15	3

As fibras de curauá submetidas a lavagem com água a temperatura ambiente e a 70 °C apresentaram perda de massa de 14,6% devido à grande quantidade de resíduos e constituintes da própria planta aderidos às fibras. Na sequência, as fibras foram submetidas a extração com uma mistura de etanol e cicloexano (1:1) o que levou a perda de massa de 2,9%, devido a extração de ceras, terpenos e ácidos graxos presentes nas fibras. Estas fibras foram denominadas fibras de partida e foram caracterizadas, quanto ao teor de holocelulose, α -celulose, lignina solúvel e insolúvel, umidade, cinzas e índice de cristalinidade, Tabela 3.

Tabela 3 - Componentes químicos da fibra de partida de curauá.

Propriedades	Teor (%) + Desvio Padrão
Holocelulose	92,1 $\pm$ 0,4
α-celulose	76,3 $\pm$ 0,1
Hemiceluloses	15,9 $\pm$ 0,4
Lignina Klason insolúvel	5,8 $\pm$ 0,2
Lignina Klason solúvel	1,8 $\pm$ 0,02
Lignina Klason Total	7,6 $\pm$ 0,2
Umidade	6,2 $\pm$ 0,3
Cinzas	0,3 $\pm$ 0,1
Índice de Cristalinidade (IC)	61

Os resultados na Tabela 3 indicam que o teor de holocelulose (92,1%) e o de α -celulose (76,3%) foram maiores em relação ao obtido por Gomes (2017) que foram de 85,9% e 70,4% respectivamente, sendo uma vantagem, pois o interesse reside no teor de celulose presente para sua conversão em açúcares fermentescíveis. O teor de lignina total obtido foi de 7,6%, menor em relação ao obtido por Gomes (2017) que foi de 9,4%, sendo mais uma vantagem,

pois a presença de lignina pode interferir no acesso das enzimas às cadeias de celulose. Os teores de hemiceluloses permaneceram próximos: 15,9% e 15,5% obtido por Gomes (2017). O teor de cinzas foi de 0,2%, enquanto que o de Gomes foi de 2,0%, apesar da mesma espécie, a fibra pode apresentar composição variada conforme as condições de cultivo, ambiente e solo (CASTRO; RUVOLO-FILHO; FROLLINI, 2012).

As fibras de partida foram posteriormente submetidas a pré-tratamentos com ácido oxálico 0,9M antes de serem submetidas a hidrólise enzimática. A Tabela 4 apresenta as condições e os códigos atribuídos a cada condição utilizada para pré-tratar a fibra de curauá.

Tabela 4 - Condições utilizadas para o pré-tratamento da fibra de partida de curauá antes de submetê-la a hidrólise enzimática.

Concentração Ácido Oxálico (M)	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Código
0,9	1,5	Ambiente	AC0915AM
0,9	1,5	60 °C	AC091560
0,9	3,0	60 °C	AC093060

A Tabela 5 apresenta os valores dos teores de lignina solúvel e insolúvel, de holocelulose, α -celulose, hemiceluloses, índice de cristalinidade, umidade e cinzas, da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento utilizando ácido oxálico 0,9M.

Tabela 5 - Teor de lignina Klason solúvel e insolúvel, de holocelulose, α -celulose, hemiceluloses, cinzas, umidade e índice de cristalinidade para a fibra de curauá pré-tratada com o ácido oxálico 0,9M e submetida a diferentes condições de tratamento.

Propriedades	Teor (%) + Desvio Padrão			
	Fibra de Partida	AC0915AM	AC091560	AC093060
Holocelulose	92,1 $\pm$ 0,4	93,1 $\pm$ 0,7	92,0 $\pm$ 0,6	92,1 $\pm$ 0,3
α-celulose	76,3 $\pm$ 0,1	74,0 $\pm$ 0,2	70,1 $\pm$ 0,1	72,2 $\pm$ 0,6
Hemiceluloses	15,8 $\pm$ 0,4	19,2 $\pm$ 0,8	21,9 $\pm$ 0,6	19,9 $\pm$ 0,7
Lignina Klason insolúvel	5,8 $\pm$ 0,2	5,9 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,2	6,0 $\pm$ 0,3
Lignina Klason solúvel	1,8 $\pm$ 0,02	2,0 $\pm$ 0,02	1,8 $\pm$ 0,03	2,0 $\pm$ 0,01
Lignina Klason Total	7,6 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,1	7,6 $\pm$ 0,2	8,0 $\pm$ 0,3
Umidade	6,2 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 0,2	6,7 $\pm$ 0,1	5,3 $\pm$ 0,1
Cinzas	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,2	0,1 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,02
Índice de Cristalinidade (IC)	61	58	62	75

Castro (2014) caracterizou a fibra de curauá obtendo proporções de 4,7% de lignina Klason insolúvel, 0,5% de lignina Klason solúvel, 93% de holocelulose, 63,4% de α -celulose, 29,6% de hemiceluloses, 0,5% de cinzas e 8,0% de umidade. O teor de cinzas e de umidade das fibras de partida estão próximos aos valores encontrados por Castro (2014), Tabela 5. Os

valores de lignina Klason foram maiores em relação ao relatado na literatura, porém, tratando-se de materiais lignocelulósicos, essa porcentagem pode variar devido ao tipo de cultivo da planta (Tabela 5). O teor de α -celulose encontrado foi maior em relação ao divulgado por Castro (2014), o que foi uma vantagem, já que o interesse reside na hidrólise da celulose.

Comparando os resultados obtidos na Tabela 5, observou-se que os teores de holocelulose da fibra de curauá e também os de lignina total, mesmo submetida a pré-tratamento com ácido oxálico, foram próximos, podendo essa pequena variação entre os resultados ser decorrente de erro experimental. Nas condições usadas, o ácido foi pouco efetivo na remoção da lignina em relação a holocelulose, o que poderia favorecer a posterior hidrólise, pois a lignina é um dos constituintes que mais dificulta o acesso das enzimas a celulose (ALVIRA et al., 2010).

Quando comparada a fibra de partida com a fibra AC091560 da Tabela 5, o teor de α -celulose reduziu, enquanto que o de hemiceluloses aumentou, indicando que o ácido oxálico hidrolisou parte da celulose presente na fibra. O pré-tratamento não mostrou eficiência quanto a redução do teor de lignina (Tabela 5).

Analisando os resultados de índice de cristalinidade (IC) da fibra de partida a fibra AC091560, percebe-se que a cristalinidade da fibra permaneceu aproximadamente constante, de 61 para 62%, indicando que cadeias das regiões cristalina e não cristalina da celulose foram possivelmente hidrolisadas na mesma proporção (Tabela 5). Entre a fibra de partida e a fibra AC093060, o índice de cristalinidade foi de 61% para 75% e o teor de α -celulose de 76,1% para 72,1%, indicando que cadeias da região não cristalina da celulose foram preferencialmente hidrolisadas.

Da fibra AC091560 para AC093060, o teor de lignina e de α -celulose aumentaram, enquanto que o teor de hemiceluloses diminuiu, indicando que ocorreu uma hidrólise de hemiceluloses (Tabela 5). O teor de umidade variou, porém de forma não significativa, entre as amostras e os pré-tratamentos adotados, o que pode ser consequência da pequena variação observada na composição da fibra, destacando que a água interage principalmente com os polissacarídeos (celulose, hemiceluloses) presentes na região não cristalina. Os teores de cinzas em todas as condições foram baixos e próximos entre si, indicando que a lavagem com água praticamente eliminou impurezas inorgânicas, e que nos pré-tratamentos realizados assim permaneceu.

As análises via HPLC permitem avaliar se o pré-tratamento foi efetivo para aumentar a eficiência da produção de açúcares fermentescíveis na hidrólise enzimática da polpa pré-tratada. Tais análises são discutidas nos tópicos 4.3.2, 4.4.2, 4.5.2, 4.6.2 e 4.7.2.

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias a seguir são referentes aos pré-tratamentos adotados utilizando o ácido oxálico 0,9M. A Figura 12 apresenta as micrografias obtidas para a fibra de partida e para as fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9 M.

Figura 12 - Micrografia da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.

Comparando as micrografias da fibra de partida com as micrografias das fibras pré-tratadas com o ácido oxálico, observou-se a presença de alguns fragmentos presentes nas fibras pré-tratadas, indicando que o ácido atacou sua superfície. A fibra AC091560 apresentou mais fragmentos em sua superfície em relação à fibra AC0915AM, indicando que a maior temperatura levou uma intensificação do ataque do ácido à superfície da fibra. A fibra AC093060 apresentou maior fragmentação em relação à fibra AC091560, indicando que um maior tempo de pré-tratamento também favoreceu o ataque do ácido à superfície da fibra. Destaca-se que mudanças na morfologia da superfície das fibras podem favorecer a interação das enzimas com as mesmas, facilitando o acesso das enzimas às cadeias de celulose.

4.1.2 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 13 mostra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento e a Figura 14 apresenta o mapa de densidade da fibra de partida e da fibra submetida a pré-tratamento com ácido oxálico 0,9M.

Figura 13 - Gráfico em barras de espessura e comprimento da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.

Figura 14 - Mapa de densidade da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M.

Os mapas de densidade da Figura 14 mostram a redução da densidade da fibra de partida às fibras AC0915AM e AC091560 na espessura de [11-14] μm, aumentando a densidade de fibra para espessuras inferiores a 11 μm, indicando um aumento preferencial no ataque de fibras com espessuras entre [11-14] μm. Em seguida, da fibra AC091560 para a fibra AC093060, observou-se o aumento na densidade da fibra com espessuras entre [6-8] μm. Aumentando-se a temperatura e tempo de pré-tratamento, observou-se o ataque preferencial às fibras com espessuras de [11-14] μm, aumentando a densidade de fibras com espessuras entre [6-8] μm, ou seja, o ataque ocorreu preferencialmente às fibras com espessuras maiores, pois possuem maior superfície de contato em relação a solução de ácido oxálico 0,9 M, resultado em fibras com espessuras menores, devido a ação do ácido na fibra pré-tratada.

Os gráficos da Figura 13 mostram que as maiores mudanças de densidade ocorreram na espessura da fibra e não no seu comprimento, ou seja, o ácido atuou mais na superfície da fibra que na sua extremidade. Entre a fibra de partida e a fibra AC093060, analisando o gráfico da espessura, percebe-se o aumento de densidade de fibras entre $[5-11]\mu\text{m}$ e $[30-39]\mu\text{m}$; uma oscilação da densidade entre $[11-18]\mu\text{m}$ e $[39->]\mu\text{m}$, e uma redução de densidade entre $[18-30]\mu\text{m}$. O ácido mostrou preferência em atacar fibras de espessuras entre $[18-30]\mu\text{m}$, gerando aumento proporcional no número de fibras com espessuras entre $[5-11]\mu\text{m}$.

Analisando os dados de comprimento, entre a fibra de partida e a fibra AC093060, percebeu-se que a densidade de comprimento foi pouco modificada em relação a espessura da fibra. Entre $[77-129]\mu\text{m}$ houve uma redução de densidade, enquanto que entre $[129-599]\mu\text{m}$ houve aumento de densidade. Estes resultados indicam que o ácido interagiu preferencialmente com as fibras com comprimentos $[77-129]\mu\text{m}$, aumentando a densidade de fibras de comprimentos entre $[129-599]\mu\text{m}$. Os resultados indicaram, portanto, que o ataque do ácido se deu preferencialmente ao longo das fibras e não pelas extremidades.

4.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Na Figura 15, estão apresentadas as curvas TG e DTG da fibra de partida e das fibras submetidas a diferentes pré-tratamentos com o ácido oxálico 0,9M.

Figura 15 - Curvas TG e DTG da fibra de curauá de partida e das fibras submetidas a diferentes pré-tratamentos com ácido oxálico 0,9M. Atmosfera de N_2 , vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e razão de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. c) e d), ampliações dos “ombros”/picos referentes a decomposição de hemiceluloses e de celulose, respectivamente

Para todas as fibras, houve um evento próximo a 100 °C, indicando uma redução de aproximadamente 4% da massa total, ocasionada pela perda de água aderida a fibra devido ao seu caráter hidrofílico. Todas as fibras foram estáveis até 275°C.

As curvas TG da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o ácido oxálico 0,9M apresentaram um primeiro evento em torno de 100 °C decorrente da perda de água, o seguinte ocorreu a partir de 275 °C, referente ao início da decomposição de hemiceluloses superposto à decomposição da celulose. O terceiro evento ocorreu, com início em aproximadamente 390 °C e foi referente a decomposição da lignina, porém não foi possível observar o mesmo na curva DTG (Figura 15b), devido a pequena porcentagem de lignina nas fibras (Tabela 5).

Analisando as curvas DTG da Figura 15. d, percebeu-se que o pico da fibra de partida em 366 °C possui intensidade maior em relação ao pico das fibras AC0915AM, AC091530 e AC093060 em 360 °C, indicando uma parcial hidrólise da celulose durante o pré-tratamento. As intensidades dos picos em 360 °C das fibras pré-tratadas com o ácido oxálico foram próximas, indicando que as mudanças nos teores de α -celulose devido às variações nas condições utilizadas no pré-tratamento da fibra de curauá (Tabela 5) não foram suficientes para serem detectadas nesta análise.

4.2 Caracterização da Fibra de Curauá Mercerizada com Hidróxido de Sódio 20%

A fibra de curauá, antes submetida a lavagem com água à temperatura ambiente e a 70 °C, bem como submetida a lavagem com uma mistura de etanol e ciclohexano (1:1) foi, posteriormente, submetida ao pré-tratamento com hidróxido de sódio 20% antes de ser submetida a hidrólise enzimática.

A Tabela 7 apresenta as condições e os códigos atribuídos a cada condição utilizada para pré-tratar a fibra de curauá.

Tabela 6 - Condições utilizadas para o pré-tratamento da fibra de partida de curauá utilizando hidróxido de sódio 20%.

Reagente/Concentração	Tempo de reação (h)	Temperatura (°C)	Código
Hidróxido de Sódio 20%	2,0	60	NaOH202060
Hidróxido de Sódio 20%	5,0	60	NaOH205060

Tabela 7 - Teor de lignina Klason solúvel e insolúvel, de holocelulose, α -celulose, hemiceluloses, cinzas, umidade e índice de cristalinidade para a fibra de curauá pré-tratada com hidróxido de sódio 20% submetida a diferentes condições.

Propriedades	Teor (%) + Desvio Padrão		
	Fibra de Partida	NaOH202060	NaOH205060
Holocelulose	92,1 $\pm$ 0,4	97,7 $\pm$ 0,4	92,5 $\pm$ 0,4
α -celulose	76,3 $\pm$ 0,1	91,0 $\pm$ 0,7	87,0 $\pm$ 0,7
Hemiceluloses	15,9 $\pm$ 0,4	6,7 $\pm$ 0,3	5,5 $\pm$ 1,1
Lignina Klason insolúvel	5,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2
Lignina Klason solúvel	1,8 $\pm$ 0,02	1,4 $\pm$ 0,02	1,5 $\pm$ 0,1
Lignina Klason Total	7,6 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1
Umidade	6,2 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,5
Cinzas	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1
Índice de Cristalinidade (IC)	61	79	76

Comparando os resultados do teor de holocelulose obtidos, observou-se um aumento no teor de 92,1% para 97,7%, devido a redução do teor de lignina de 7,6% para 3,0% (Tabela 7). O pré-tratamento foi efetivo na remoção da lignina presente na fibra, podendo representar uma vantagem durante a hidrólise enzimática, já que a lignina dificulta o acesso da enzima a celulose (ALVIRA et al., 2010).

Comparando a fibra NaOH202060 com a fibra NaOH205060, o teor de holocelulose reduziu de 97,7% a 92,5%, o de α -celulose reduziu de 91,0% a 87,0%, o de hemiceluloses reduziu de 6,7% a 5,5% e o de lignina Klason total permaneceu constante (3,1%). O aumento no tempo de mercerização promoveu o consumo de α -celulose na fibra lignocelulósica.

Analisando o índice de cristalinidade da fibra de partida em relação às fibras tratadas NaOH202060 e NaOH205060, observou-se que a mercerização aumentou o IC da fibra de 61%, da fibra de partida, para 79% (NaOH202060) e 76% (NaOH205060). O hidróxido de sódio hidrolisa, preferencialmente, domínios não cristalinos em relação a domínios cristalinos, pois

aquele é mais facilmente hidrolisados pela base. As hemiceluloses, bem como a lignina possuem apenas domínios não cristalinos, sendo que houve uma redução de 15,9% (fibra de partida) de hemiceluloses para 6,7% (NaOH202060) e 5,5% (NaOH205060), e redução de 5,8% (Fibra de partida) para 1,6% (NaOH202060 e NaOH205060) resultando no aumento do IC na fibra lignocelulósica. Domínios não cristalinos da celulose também podem ter sido afetados durante o pré-tratamento já que é uma região de fácil acesso ao álcali. Em etapas mais avançadas, o álcali pode atingir os domínios cristalinos da celulose, resultado em alterações no índice de cristalinidade (GOMES, 2017; KASCHUK et al., 2017).

O teor de umidade variou pouco entre a fibra de partida e as fibras mercerizadas, e os teores de cinzas em todas as condições foram baixos e próximos entre si, indicando que não havia NaOH residual nas fibras tratadas, ou seja, a lavagem com água realizada foi eficiente.

Pelo alto teor de α -celulose, e baixo teor de lignina e de hemiceluloses, pelo fato do tempo de mercerização ter sido o mesmo empregado por Gomes (2017), sob as mesmas proporções de fibra/solução e concentração de hidróxido de sódio, com exceção da temperatura,; a fibra NaOH202060 foi escolhida para ser submetida a hidrólise enzimática.

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias a seguir são referentes aos pré-tratamentos adotados utilizando hidróxido de sódio 20%. A Figura 16 apresenta as micrografias obtidas para a fibra de partida e para as fibras submetidas a mercerização.

Figura 16 - Micrografia da fibra de partida e das fibras submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio.

Comparando as micrografias da fibra de partida com as micrografias das fibras mercerizadas, observa-se a presença de alguns fragmentos presentes nas fibras pré-tratadas, indicando que a base reagiu com a superfície do material. Analisando as micrografias das fibras com escala de 6 μm , observou-se que as fibras mercerizadas apresentam espessuras menores em relação à fibra de partida. As fibras NaOH202060 e NaOH205060 apresentaram espessuras semelhantes, porém a fibra NaOH202060 apresenta uma superfície mais lisa em relação a fibra NaOH205060, que apresentou fragmentos em sua superfície. O tempo maior de pré-tratamento favoreceu maior ataque alcalino a fibra lignocelulósica, resultando em fibras mais finas e com mais fragmentos.

Analisando as micrografias das fibras pré-tratadas com ácido oxálico 0,9M da Figura 12 com as micrografias das fibras mercerizadas da Figura 16, observou-se que as morfologias das fibras mercerizadas diferiram muito mais em relação a fibra de partida em comparação com a mudança que o ácido oxálico promoveu na fibra em relação a fibra de partida da Figura 12. Referente às mudanças observadas, o pré-tratamento com solução alcalina se mostrou mais eficiente que o com solução ácida, o que pode impactar a etapa de hidrólise enzimática.

4.2.2 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 17 mostra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento da fibra de partida e da fibra submetida ao pré-tratamento com hidróxido de sódio 20%.

Figura 17 - Gráfico em barras de espessura e comprimento da fibra de partida e das fibras submetidas ao pré-tratamento com o hidróxido de sódio 20%.

A Figura 18 apresenta o mapa de densidade da fibra de partida e da fibra submetida a pré-tratamento com hidróxido de sódio 20%.

Figura 18 - Mapa de densidade da fibra de partida e das fibras submetidas a pré-tratamento com hidróxido de sódio 20%.

Os gráficos da Figura 17 mostram que, para o pré-tratamento utilizando hidróxido de sódio, as maiores mudanças ocorrem na espessura da fibra e não no comprimento, ou seja, o álcali atuou preferencialmente ao longo da superfície da fibra e não nas extremidades. As fibras mercerizadas apresentaram densidades bem próximas entre si, apresentando uma pequena diferença de densidade nas fibras entre $[14-18]\mu\text{m}$ ($15,1 \text{ milhões.g}^{-1}$ na fibra NaOH202060), e $16,3 \text{ milhões.g}^{-1}$ (fibra NaOH205060)). Ao longo da escala de espessura, a densidade variou entre as fibras mercerizadas, em que, da fibra NaOH202060 para NaOH205060, ocorre aumento de densidade para as fibras de espessuras entre $[5-6]\mu\text{m}$, $[11-18]\mu\text{m}$ e $[23-39]\mu\text{m}$; e uma redução nas fibras entre $[6-11]\mu\text{m}$, $[18-23]\mu\text{m}$ e $[39-50]\mu\text{m}$. As maiores mudanças ocorreram da fibra de partida para as fibras mercerizadas, em que houve um aumento de densidade nas fibras entre $[14-18]\mu\text{m}$, entre $[5-11]\mu\text{m}$ e, principalmente, entre $[30-50]\mu\text{m}$, comportamento semelhante ao que foi encontrado por Gomes (2017) que encontrou um aumento de densidade da fibra com espessuras superiores a $18 \mu\text{m}$. A mercerização pode ter atacado as fibras com espessuras maiores ao detectado pelo equipamento, resultando em aumento de densidade das fibras com espessuras presentes na Figura 17, principalmente entre $[30-50]\mu\text{m}$. O álcali teve preferência em atacar fibra com

espessuras maiores, pois possuem maior superfície de contato. O aumento de densidade em relação a espessura foi maior na fibra mercerizada em comparação a fibra pré-tratada com ácido oxálico 0,9M, nos intervalos de [14-28] μm e [18-50] μm . O álcali pode ter atacado mais fortemente, em relação ao ácido oxálico, fibras com espessuras acima do detectado pelo equipamento, resultando em fibras com espessuras menores detectáveis, como observado no gráfico da Figura 17.

Analisando o gráfico do comprimento na Figura 17, observou-se que a densidade em relação ao comprimento variou pouco, sendo observado mudanças apenas em densidades de fibras com comprimentos entre [77-599] μm . Analisando as densidades entre a fibra de partida e a fibra NaOH202060, observou-se que a densidade das fibras entre [77-129] μm diminuiu, enquanto que a densidade das fibras entre [129-599] μm aumentou, ou seja, o álcali teve preferência em atacar fibras com comprimentos entre [77-129] μm , aumentando, consequentemente, a densidade de fibras com comprimento entre [129-599] μm .

Os mapas de densidade da Figura 18 mostram que a região que apresentou maior densidade na fibra de partida foi nas fibras com espessura entre [11-14] μm , enquanto que na fibra NaOH202060 as maiores densidades encontram-se nas fibras com espessura entre [6-8] μm , ou seja, o álcali teve preferência em atacar fibras com espessuras entre [11-14] μm , deslocando a densidade para as fibras com espessuras entre [6-8] μm . Entre a fibra NaOH202060 e NaOH205060, ocorreu um aumento de densidade em todo o mapa. A partir de 2 h de reação, provavelmente ocorreu o ataque preferencial das fibras com espessuras e comprimentos superiores ao detectado pelo equipamento, resultando em um aumento de densidade das fibras presente na região do mapa de densidade, o mesmo observado no gráfico 2D da Figura 17.

4.2.3 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

Na Figura 19, estão apresentadas as curvas TG e DTG da fibra de partida e das fibras submetidas aos diferentes pré-tratamentos com hidróxido de sódio 20%.

Figura 19 - Curvas TG e DTG da fibra de curauá de partida e das fibras submetidas aos diferentes pré-tratamentos com hidróxido de sódio 20%. Atmosfera de N_2 , vazão de 50 mL.min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$. c) e d), ampliações dos “ombros”/picos referentes a decomposição de hemiceluloses e de celulose, respectivamente.

Observou-se, com base na Figura 19, nas curvas TG, um evento em torno de $100 \text{ }^\circ\text{C}$, decorrente da redução de aproximadamente 4% da massa total, ocasionada pela perda de água, presente devido ao caráter hidrofílico das fibras. Todas as fibras foram estáveis até $275 \text{ }^\circ\text{C}$. Em relação as curvas TG e DTG da Figura 15, correspondente a fibra pré-tratada com ácido oxálico $0,9\text{M}$, as curvas TG da Figura 19 também apresentaram 3 eventos: O segundo evento ocorreu a partir de $275 \text{ }^\circ\text{C}$, com o início da decomposição de hemiceluloses quase superposto a decomposição da celulose. O terceiro, com início em $390 \text{ }^\circ\text{C}$, que foi referente a decomposição da lignina,

Na curvas DTG da Figura 19, não foram observados picos referentes a decomposição da lignina na fibra de partida (7,6% de lignina total). Diante disso, seria pouco provável o surgimento do mesmo pico nas fibras mercerizadas, já que essas fibras apresentaram menor teor de lignina Klason total 3,0% para a fibra NaOH202060 e 3,1% para a fibra NaOH205060. O mesmo foi observado para as curvas das fibras submetidas ao pré-tratamento com ácido oxálico $0,9\text{M}$ que apresentaram o mesmo teor de lignina Klason total em relação a fibra de partida.

Na Figura 19.b), observou-se 3 eventos: um pico em 50 °C decorrente da liberação de água aderida a fibra lignocelulósica, um ombro em 294 °C decorrente da decomposição da hemiceluloses e um pico em 376 °C decorrente da decomposição da celulose.

Na Figura 19.c), foi possível observar um ombro na curva DTG da fibra de partida, resultante da decomposição de hemiceluloses. O mesmo ombro apareceu nas curvas das fibras pré-tratadas com o ácido oxálico 0,9M, indicando que o pré-tratamento ácido não foi efetivo na remoção de hemiceluloses. Nas fibras NaOH202060 e NaOH205060 não foi possível observar esse ombro, indicando que, a fibra, a partir do pré-tratamento apresentou menor teor de hemiceluloses, indicando a eficácia do método para a remoção deste polissacarídeo macromolecular.

Na Figura 19.d), observou-se um pico em 376 C relacionado a decomposição da celulose. A fibra de partida apresentou um pico de menor intensidade com relação as fibras submetidas a mercerização, indicando um teor menor de celulose. A intensidade dos picos das fibras NaOH202060 e NaOH205060 foram maiores em relação a fibra de partida, indicando que as condições utilizadas para o pré-tratamento da fibra de curauá variou consideravelmente o teor de celulose.

Após o pré-tratamento utilizando hidróxido de sódio 20% ou ácido oxálico 0,9M, as fibras AC0915AM, AC091560, AC093060 e NaOH202060 foram submetidas a hidrólise enzimática. A fibra AC091560 foi submetida a duas condições: uma utilizando 0,5mL de enzima por grama de fibra e outra utilizando 1,5mL de enzima por grama de fibra. Tais denominações foram definidas no Tópico 3.5 em que se descreveu os resultados da hidrólise enzimática. Portanto, as fibras receberam os códigos descritos na Tabela 8.

Tabela 8 - Tabela de nomenclaturas de fibras pré-tratadas submetidas a hidrólise enzimática.

Fibra Pré-tratada	Volume de Enzima (mL)	Código
AC0915AM	0,5	H05AC0915AM
AC091560		H05AC091560
AC093060		H05AC093060
NaOH202060		H05NaOH202060
AC091560	1,5	H15AC091560

4.3 Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM

4.3.1 Caracterização da Fibra Que Não Reagiram Durante Hidrólise

4.3.1.1 DRX

A técnica permite estimar o índice de cristalinidade como um indicativo do quanto que o material é cristalino e como a cristalinidade muda durante o pré-tratamento ou com hidrólise enzimática. A Figura 20 ilustra os índices de cristalinidade (IC) das fibras que não reagiram, isoladas do meio ao longo da hidrólise enzimática. Os intervalos escolhidos para a retirada das alíquotas do meio reacional foram de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h de reação.

Figura 20 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC0915AM, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

O índice de cristalinidade da fibra de partida foi 61%. Até 4 h de reação, a cristalinidade aumentou para 68%, indicando o consumo de cadeias presentes no domínio não cristalino. A caracterização dos licores gerados pelas fibras H05AC0915AM durante a hidrólise foram avaliados (seção 4.3.2), e os resultados mostraram produção de xilose, desde o início da reação, devido a hidrólise de hemiceluloses, as quais estão presentes nos domínios não cristalinos. A degradação deste polissacarídeo pode também ter contribuído para o aumento

na cristalinidade. A partir de 11 h de reação, observou-se uma diminuição na cristalinidade, até atingir 58% em 23h de reação, observando-se oscilações até o final da reação.

4.3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura permite avaliar, por meio de micrografias, a morfologia das superfícies das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática. Destaca-se que o que foi observado para estas fibras, secas, não se correlaciona diretamente com o que foi observado durante a análise Morfi, realizada com as fibras suspensas em meio aquoso. As micrografias da Figura 21 são referentes as fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM .

Figura 21 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM.

Percebeu-se que a fibra que não reagiu ao longo da reação apresentou mais fragmentos em sua superfície comparativamente a fibra de partida, indicando a ação da enzima durante todo intervalo de tempo. A partir de 30 min de reação, já foi possível observar a presença de fragmentos aderidos às fibras lignocelulósicas. A partir de 23 h, e até o final da reação, percebeu-se que pequenos filamentos estavam agregados (Figura 21).

Ao longo da reação a espessura dos feixes de fibras foi reduzida, aproximando-os e aumentando as interações físicas entre elas, o que pode ter dificultado o acesso das enzimas nos estágios finais da reação, bem como a enzima pode ter diminuído sua eficácia

4.3.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 22 ilustra as curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

Figura 22 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.

Nas curvas DTG das fibras tratadas e da fibra de partida não foram observados picos referentes à decomposição da lignina, devido a pequena porcentagem da mesma na fibra de curauá, mas na curva TG se observou a etapa de decomposição da lignina, com início em aproximadamente 390 °C. Nas curvas DTG da Figura 22.b), f) e j), observou-se um pico em 45 °C, referente a perda de água. O “ombro” em 294 °C pode ser atribuído à decomposição de hemiceluloses. Na fibra de partida este “ombro” não foi visualizado, mas após 30 min de ação das enzimas já aparece, indicando que as hemiceluloses se tornaram mais expostas à ação do calor (Figura 22c). Nesta figura se observou que a intensidade do “ombro” diminui até 4h de

reação, como consequência da diminuição no teor de hemiceluloses, devido à hidrólise das mesmas, gerando principalmente xiloses (Figura 25), conforme será discutido posteriormente. Após 15 h de reação este ombro já foi pouco perceptível. O pico em 366, 374 e 376 °C, (Figura 22.b), f) e j) pode ser atribuído a decomposição da celulose.

Nas Curvas DTG da Figura 22.d), h) e l), observou-se a presença do pico referente a decomposição da celulose da fibra que não reagiram. Na fibra de partida, o pico apresentou uma intensidade máxima, e pode ser relacionado ao teor de celulose presente antes da fibra sofrer a hidrólise enzimática. Após 48 h de reação, o pico teve a menor intensidade, indicando um baixo teor de celulose na fibra que não reagiu. As intensidades dos picos após 31 h e 48 h foram próximas, devido a pouca variação na hidrólise da celulose entre 31 e 48 h de reação (Figura 25) devido a conversão da celulose em glucose (Figura 25).

As curvas TG mostram a decomposição da lignina a partir de aproximadamente 390 °C. Não foram observados os picos nas curvas DTG referentes à decomposição da lignina, em todos os tempos da reação de hidrólise, devido ao baixo teor desta macromolécula na fibra de curauá (Tabela 2), conforme já mencionado, o que levou a pequena inclinação na curva TG referente a decomposição da mesma (Figura 15).

4.3.1.4 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 23 mostra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento das fibras de curauá H05AC0915AM que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 23 - Gráfico em barras de espessura e de comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM durante a hidrólise enzimática

A Figura 24 apresenta o mapa de densidade das fibras H05AC0915AM que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 24 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e a espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC0915AM.

As figuras referentes às variações nas densidades dos comprimentos das fibras (Figura 23) mostram que fibras com comprimentos entre $[129-215]\mu\text{m}$ tiveram a redução mais significativa nas respectivas densidades durante a reação (destacado com blocos pontilhados na figura), indicando o ataque preferencial da enzima para as fibras com comprimentos intermediários, o que levou a um aumento na densidade das fibras com menor comprimento, como no intervalo $[44-77]\mu\text{m}$, melhor observado nos mapas de densidade (Figura 24).

Analisando o gráfico de espessuras, observou-se que as densidades das fibras mais espessas no geral sofreram uma redução ao longo da reação (indicado por linha pontilhada na Figura 23), como consequência do ataque das enzimas, comparativamente a fibra de partida (0 min), aumentando a densidade em certos intervalos de fibras menos espessas, como também pode ser observado nos mapas de densidade (Figura 24).

Durante a reação, a variação na densidade das fibras ocorreu de forma mais significativa na espessura das fibras comparativamente ao comprimento, indicando preferência do ataque das enzimas a partir de suas superfícies das fibras.

4.3.2 Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM

Nas reações de hidrólise enzimática, não ocorre a formação de produtos de decomposição ao contrário da hidrólise catalisada por ácido, sendo uma grande vantagem para a obtenção de açúcares fermentescíveis. As enzimas agem de forma específica na hidrólise, produzindo predominantemente glicose e celo-oligossacarídeos a partir da celulose e xilose e arabinose presentes nas hemiceluloses (GOMES, 2017). Os licores foram analisados quanto ao teor de glicose, xilose, ácido fórmico, celobiose e ácido acético, mas estes três últimos não foram detectados. A celobiose e os celo-oligossacarídeos podem se encontrar em baixas concentrações, não detectáveis pela técnica da CLAE (KASCHUK, 2014).

A Figura 25 apresente o gráfico das concentrações de glicose e de xilose detectadas via CLAE durante a hidrólise enzimática da fibra H05AC0915AM.

Figura 25 – Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05AC0915AM obtidos via hidrólise enzimática.

Inicialmente, a enzima está presente em uma concentração suficiente para catalisar a reação a uma velocidade máxima. Sua velocidade diminui a medida que o substrato é convertido em produto. A enzima [E] combina-se primeiramente de modo reversível com o substrato [S], formando um complexo enzima-substrato [ES], que é uma etapa relativamente rápida e, em seguida, o complexo ES é rompido em uma segunda etapa, fornecendo a enzima livre e o produto, que é uma etapa mais lenta. Pelo fato da segunda etapa ser mais lenta, diminui a velocidade de reação total. Além disso, a presença do produto pode interferir na velocidade de reação, devido as condições de acesso da enzima ao substrato, reduzindo sua velocidade (NELSON, D., AND COX, 2014), o que pode ser visto no gráfico da Figura 25, em que até aproximadamente 15h a concentração aumentou acentuadamente e após esta etapa, a concentração aumentou em taxas menores de velocidade.

Nos primeiros 10 min, já foi possível observar a formação de glicose de $0,27 \text{ g.L}^{-1}$. O teor máximo de glicose foi de $11,8 \text{ g.L}^{-1}$, após 48 h de reação (Figura 25). Não foi detectado a presença de arabinose no licor, indicando o baixo teor do componente nas hemiceluloses.

A xilose foi gerada pela hidrólise das xilanas presentes nas hemiceluloses da fibra de curauá AC0915AM. Observou-se também um crescimento acentuado na concentração deste açúcar no meio, até 15 h de reação, e após 20 h de reação, considerando os erros indicados na Figura 25, praticamente não ocorreu variação na concentração de xilose no meio após 15 h de reação, indicando que as hemiceluloses foram consumidas a grande velocidade até aproximadamente 15 h de reação, bem como presente nos estudos realizado por GOMES (2017).

4.3.2.1 Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC0915AM

Desprezando o valor de glicose que pode ser originada pelas hemiceluloses, e considerando apenas o total de α -celulose presente na massa inicial de fibra lignocelulósica de curauá pré-tratada, via ácido oxálico $0,9\text{M}$ durante 1,5 h a temperatura ambiente, foi possível calcular o rendimento das reações de hidrólise enzimática da fibra. Para isso foi calculada a glicose potencial que seria obtida, se toda celulose presente na fibra celulósica fosse hidrolisada a glicose. Para o cálculo da glicose potencial (glicose máxima) foram utilizadas as Equações 7 e 8

$$[glicose]_{max} = \frac{Mi. \%celulose. q}{V} \quad Eq. 7$$

Sendo

$$q = \frac{MM_{glicose}}{MM_{anidroglicose}} = \frac{180g.mol^{-1}}{162g.mol^{-1}} = 1,1111$$

- “q” é um fator de conversão necessário para calcular o quanto de glicose seria formada a partir da celulose inicial, já que na celulose, glicose está na forma anidra, ou seja, difere, em massa, por uma molécula de água;
- Mi = Massa inicial de polpa celulósica (para todos os casos Mi = 1g)
- V = volume da solução (para todos os casos V = 0,05 L)
- %celulose. = porcentagem de celulose na fibra.

Para 74% de α-celulose presente na fibra AC0915AM, tem-se:

$$[glicose]_{max} = \frac{1,0g. 0,74\%. 1,111}{0,05L} = 16,44 g.L^{-1} de glicose máxima$$

Estes cálculos forneceram o valor máximo de 16,44 g.L⁻¹ de glicose que poderia estar presente no licor, ou seja, se toda a celulose da fibra fosse convertida em glicose este valor seria detectado via CLAE. Assim, a partir deste valor, foi possível calcular o rendimento das reações realizadas. Para este cálculo foram considerados os valores de concentração de glicose gerados após 15 e 48 h de reação, em cada condição reacional. A porcentagem de celulose hidrolisada foi calculada pela razão entre glicose detectada no licor, e a concentração máxima de glicose, que seria obtida se toda celulose fosse hidrolisada em glicose. Para a realização desses cálculos foi utilizada a Equação 8.

$$\% celulose hidrolisada = \frac{[glicose]_{detectada}}{[glicose]_{máxima}} \times 100 \quad Eq. 8$$

Em 15 h de reação, detectou-se 8,71 g.L⁻¹ de glicose, logo a % será:

$$\% celulose hidrolisada = \frac{8,71 g.L^{-1}}{16,44 g.L^{-1}} \times 100 = 53,0\%$$

Em 48 h de reação, detectou-se 11,84 g.L⁻¹ de glicose, logo:

$$\% celulose hidrolisada = \frac{11,84 g.L^{-1}}{16,44 g.L^{-1}} \times 100 = 72,0\%$$

Foi possível construir o gráfico de rendimento a partir da glicose obtida na hidrólise enzimática para todos os tempos reacionais considerados, Figura 26.

Figura 26 - Rendimento de glicose da fibra H05AC0915AM em função do tempo reacional a partir da hidrólise enzimática.

A Figura 26 mostra que após 15 h de reação, o rendimento foi de 53,0%, indicando que a enzima consumiu metade da celulose disponível na fibra até este tempo reacional. Após 48 h de reação o rendimento foi de 72,0%. A velocidade reacional da hidrólise enzimática foi máxima no início da reação. Quando ocorreu a formação de glicose, devido ao consumo de celulose, a velocidade reacional foi reduzida, logo, o rendimento aumentou mais lentamente. As condições do substrato favorecem a velocidade e o rendimento da reação. Para o caso de fibras lignocelulósicas, a presença de lignina interfere no rendimento de obtenção de glicose, logo pré-tratamentos são realizados na intenção de remover a lignina da fibra, tornando a celulose mais facilmente acessível. O próximo tópico, 4.4, abordará a hidrólise enzimática da fibra H05AC091560, ou seja, da fibra pré-tratada, porém com o aumento da temperatura para 60°C. Cabe analisar se esta condição foi mais efetiva em relação ao pré-tratamento aplicado na fibra H05AC0915AM.

A hidrólise enzimática da fibra não tratada foi investigada em detalhes em estudo prévio (GOMES, 2017), e foi realizada novamente no presente estudo, visando somente avaliar o

rendimento de glicose após 48 h de reação. O rendimento obtido para a fibra não tratada foi de 58,5%. O pré-tratamento com ácido oxálico em condições brandas (temperatura ambiente), elevou o rendimento de glicose para 72,0%. Conforme discutido previamente, as Figuras 12 referente ao MEV mostraram que o ácido atacou a superfície das fibras, diminuindo a densidade das fibras mais espessas (Figura 13) e diminuiu a cristalinidade de 61% para 58% (Tabela 2). O aumento no rendimento de glicose indicou que esses fatores facilitaram o acesso das enzimas às cadeias de celulose.

4.4 Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560

4.4.1 Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise

4.4.1.1 DRX

A Figura 20 apresenta os índices de cristalinidade (IC) das fibras que não reagiram, isoladas do meio ao longo da hidrólise enzimática. Os intervalos escolhidos para retirada das alíquotas do meio reacional foram de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h de reação.

Figura 27 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC091560, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Observou-se uma tendência no aumento de IC, havendo um aumento de 62% (0 min) a 73% (15 h) durante a hidrólise enzimática, indicando o consumo preferencial de cadeias

presentes em domínios não cristalinos. Os resultados da caracterização de licores da fibra H05AC091560, na Seção 4.4.2, mostraram a produção de xilose desde o início da hidrólise, devido ao consumo de hemiceluloses, ricos em xilana, presentes no domínio não cristalino. Após 15 h, observou-se uma redução no IC para aproximadamente 62%, indicando o consumo de cadeias de celulose presentes nos domínios cristalinos.

4.4.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da Figura 28 são referentes às fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 submetidas a hidrólise enzimática.

Figura 28 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560.

Observou-se a formação de fragmentos a partir de 30 min de reação comparativamente à fibra de partida. Em seguida, observou-se fragmentos e rupturas a partir de 4 h de reação indicando o ataque enzimático à fibra lignocelulósica.

A partir de 23 h, observou-se novamente a presença de pequenos filamentos agregados, tal como ocorreu com a fibra H05AC0915AM, atenuando também a presença de fragmentos em até 48 h de reação, indicando a ação da enzima ao longo da reação de hidrólise.

4.4.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 29 ilustra as curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

Figura 29 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 durante a hidrólise enzimática c), d), g), h), k) e l) ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.

Não se observou o pico referente a decomposição da lignina nas curvas DTG da Figura 29, devido ao seu baixo teor na fibra, sendo observado apenas na curva TG em 390 °C. Na Figura 29. c) g) e k), observou-se que os “ombros” referentes a decomposição das hemiceluloses foram próximas entre si, diminuindo a intensidade do “ombro” até 48 h de reação, indicando que as hemiceluloses foram consumidas durante a hidrólise enzimática, gerando xilose. Os resultados estão discutidos na Seção 4.4.2

Nas Curvas DTG da Figura 29.d), h) e l), observou-se a presença do pico referente a decomposição da celulose da fibra que não reagiu. De 0 min a 48 h, houve uma redução na intensidade do pico, com proximidade entre os picos de 31 h e 48 h de reação devido a pouca variação no consumo de cadeias na hidrólise enzimática para gerar a glicose no licor, conforme foi discutido posteriormente.

As curvas TG mostram a decomposição da lignina a partir de aproximadamente 390 °C, o mesmo foi observado na Figura 22 da fibra H05AC091560. Não foram observados picos nas curvas DTG referentes a decomposição da lignina, em todos os tempos da reação de hidrólise, devido ao baixo teor de lignina na fibra de curauá (Tabela 2), levando a apenas uma pequena inclinação da curva TG referente a sua decomposição.

4.4.1.4 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 30 mostra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento das fibras de curauá H05AC091560 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 30 - Gráfico em barras de espessura e de comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 durante a hidrólise enzimática.

A Figura 31 apresenta o mapa de densidade das fibras H05AC091560 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 31 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e a espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC091560, proveniente das reações de hidrólise enzimática.

Observou-se que a densidade oscilou em fibras de comprimentos entre [46-359]μm ao longo de toda a reação, enquanto que em demais intervalos de comprimentos mostrados no gráfico permanecem constantes. Fibras com comprimentos entre [129-359]μm tiveram redução significativa, indicando o ataque preferencial nas fibras com comprimentos medianos, aumentando a densidade de fibras com comprimentos menores, melhor visualizado nos mapas de densidade da Figura 31.

Analisando o gráfico de espessuras da Figura 30, notou-se que a densidade das fibras com espessuras maiores a 18μm diminuiu ao longo da reação, havendo um aumento de densidade com espessuras inferiores ao valor supracitado, indicando que a enzima teve preferência em atuar a partir da superfície das fibras.

Ao longo da reação, a variação na densidade ocorreu significativamente na espessura das fibras em relação ao comprimento, indicando o ataque preferencial da enzima foi a partir da superfície das fibras.

4.4.2 Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560

A Figura 32 apresenta o gráfico de concentração de glicose e xilose obtidas durante a hidrólise enzimática da fibra H05AC091560.

Figura 32 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise enzimática da fibra de curauá H05AC091560.

Observou-se que a curva aumentou acentuadamente até 15 h de reação, gerando 8,9 g.L⁻¹ de glicose, devido a presença de celulose na fibra AC091560, e 2,0 g.L⁻¹ de xilose no licor, devido a presença de hemiceluloses na fibra, o mesmo que foi observado para a fibra H05AC0915AM. Em seguida, a concentração aumentou lentamente até 48 h de reação, formando 11,7 g.L⁻¹ de glicose e 3,0 g.L⁻¹ de xilose. Para a fibra H05AC0915AM, o teor de glicose e xilose obtidos foram de 8,7 g.L⁻¹ e 1,8 g.L⁻¹ em 15 h de reação, e 11,8 g.L⁻¹ e 2,7 g.L⁻¹ em 48 h de reação, respectivamente. Para esta hidrólise, não foi detectado a presença de arabinose no licor, indicando seu baixo teor nas hemiceluloses da fibra H05AC091560.

4.4.2.1 *Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC091560*

Com base nas equações 7 e 8, foi obtido o gráfico de rendimento da hidrólise enzimática da fibra H05AC091560(Figura 33).

Figura 33 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H05AC091560.

Observou-se que após 15 h de reação, o rendimento foi de 57,2% e em 48 h de reação, o rendimento foi de 74,8%. Para a fibra H05AC0915AM, os rendimentos após 15 h e 48 h foram respectivamente de 53,0% e 72,0%. Houve pouca variação na obtenção de glicose em relação a fibra H05AC0915AM, indicando que o aumento de temperatura no pré-tratamento (da ambiente para 60 °C), não impactou as propriedades das fibras para que o acesso das enzimas às cadeias de celulose fosse significativamente facilitado.

4.5 *Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC093060*

4.5.1 *Caracterização da Fibra Não Reagida Durante Hidrólise*

4.5.1.1 *DRX*

A Figura 34 ilustra os índices de cristalinidade (IC) das fibras que não reagiram, isoladas do meio ao longo da hidrólise enzimática. Os intervalos escolhidos para a retirada das

alíquotas do meio reacional foram de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h de reação.

Figura 34 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05AC093060, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Em 0 min, a fibra apresentou o IC de 75%, enquanto aos 10 min, o índice foi de 65%, indicando que inicialmente a enzima consumiu preferencialmente a celulose presente no domínio cristalino por estar mais disponível na fibra. No período de 30 min a 6 h, o IC aumentou para 71%, indicando que a enzima hidrolisou preferencialmente cadeias presentes no domínio não cristalino. Enquanto que de 6h até 31 h, o IC foi de 61%, indicando hidrólise preferencial da celulose presente nos domínios cristalinos. No final da reação, o IC subiu novamente para 65%.

4.5.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da Figura 35 são referentes as fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 submetidas a hidrólise enzimática.

Figura 35 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060.

Observou-se que a fibra apresentou uma superfície lisa até 30 min de reação em comparação à fibra de partida. Em 2 h de reação, observou-se a presença de fragmentos e rupturas que se intensificaram até 48 h de reação. A partir de 23 h de reação, observou-se a presença de fibras agregadas. Os mesmos eventos foram observados nas fibras H05AC0915AM e H05AC091560. A enzima novamente atuou ao longo de toda a reação.

4.5.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 29 ilustra as curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

Figura 36 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.

Observou-se que, nas curvas TG da Figura 26, apenas a curva de 0 min diferiu em relação aos tempos de 30 min, 2 h e 4 h. As curvas TG de outros tempos de reação foram muito próximas. Para todas as curvas TG, observou-se apenas uma curva referente à decomposição de lignina em 390 °C, não sendo observado o pico referente à sua decomposição nas curvas DTG devido ao seu baixo teor na fibra, conforme já mencionado.

Na Figura 36. c) g) e k), notou-se que os “ombros” referentes a decomposição das hemiceluloses foram próximas entre si, com exceção da curva da fibra de partida, em que não se observou a presença desse “ombro”, salientando que sua intensidade diminuiu ao longo da reação, sugerindo que a hidrólise enzimática consumiu hemiceluloses presentes na fibra, gerando principalmente xilose, conforme foi discutido posteriormente.

Notou-se, nas curvas DTG da Figura 36.d), h) e l), a presença do pico característico da decomposição da celulose, no período de 0 min a 48 h, ocorreu a redução na intensidade do pico, indicando que o consumo se deu ao longo de toda reação, enquanto que de 0 min a 30 min, notou-se a grande redução de intensidade do pico, devido à produção de glicose nos tempos iniciais da reação, havendo, portanto, menos celulose na fibra que não reagiram em

30 min. Entre 23 h à 31 h, as intensidades dos picos foram próximos, indicando pouca variação na hidrólise da celulose, decorrente da conversão da celulose em glicose.

As curvas TG da Figura 36 mostram a decomposição da lignina a partir de 390 °C, o mesmo observado nas Figura 22 e 27 da fibra H05AC0915AM e H05AC091560 respectivamente. Não foram observados picos nas curvas DTG referentes a decomposição da lignina, em todos os tempos da reação de hidrólise, devido ao baixo teor de lignina na fibra lignocelulósica.

4.5.1.4 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 37 ilustra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento das fibras de curauá H05AC093060 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 37 - Gráfico em barras de espessura e comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060 durante a hidrólise enzimática.

A Figura 38 apresenta o mapa de densidade das fibras H05AC093060 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 38 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H05AC093060, provenientes das reações de hidrólise enzimática.

Notou-se, avaliando os gráficos de barras referentes ao comprimento da fibra, que a densidade oscilou entre fibras com comprimento que variou de [46-359] μm ao longo da hidrólise enzimática (vide retângulo tracejado azul da Figura 37). Vale destacar que entre [129-215] μm , a densidade reduziu até 15 h de reação, pouco variando para mais e para menos até 48 h de reação (vide retângulo tracejado verde da Figura 37). A enzima teve preferência em atacar as fibras com comprimentos intermediários, aumentando a quantidade de fibras com comprimentos menores, o que pode ser observado também na Figura 38. As demais densidades dos comprimentos presentes no gráfico de barras pouco variaram ao longo da reação.

Analisando o gráfico de espessuras, notou-se que as densidades das fibras com espessuras entre [5-14] μm reduziu de 0 min a 48 h, enquanto que a densidade aumentou em fibras com espessuras entre [14→] μm , principalmente entre [14-18] μm (vide retângulo preto da Figura 37), sendo observado um pico de densidade de fibras com espessuras entre [14-18] μm .

Observou-se que ao longo da reação, a densidade de fibras foi maior entre as fibras com espessuras e comprimentos intermediários e as enzimas atuam preferencialmente ao longo da fibra e não nas extremidades, conforme os resultados na Figura 37.

4.5.2 Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05AC093060

A Figura 39 apresenta o gráfico de glicose e xilose obtidas durante a hidrólise enzimática da fibra H05AC093060.

Figura 39 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05AC093060.

Não foram observados picos referentes a detecção de arabinose por CLAE, indicando um baixo teor desse componente nas hemiceluloses da fibra H05AC093060.

A curva mostra um crescimento acentuado de glicose presente no licor em até 15 h de reação de 9,0 g.L⁻¹. Em 48 h, a concentração foi de 12,43 g.L⁻¹. A curva referente a xilose apresentou também um crescimento acentuado até 15 h obtendo 1,24 g.L⁻¹ e 1,83 g.L⁻¹ até 48 h de reação. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos de glicose e xilose nos tempos de 15 h e 48 de reação das fibras H05AC0915AM, H05AC091560 e H05AC093060.

Tabela 9 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560 e H05AC093060.

Fibra \ Tempo	Concentração Glicose/Xilose (g.L ⁻¹)	
	15 h	48 h
H05AC0915AM	8,7/1,8	11,8/2,7
H05AC091560	8,9/2,0	11,7/3,0
H05AC093060	9,0/1,2	12,4/1,8

Comparando os resultados obtidos na Tabela 10, observou-se que os valores foram próximos entre os pré-tratamentos, porém o teor de α -celulose para as fibras não foi o mesmo, o que levou a variações nos rendimentos, conforme discutido a seguir.

4.5.2.1 *Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibrilha de Curauá H05AC093060*

A partir do teor de celulose na fibra AC093060, foi possível construir o gráfico de rendimento da hidrólise enzimática da fibra H05AC093060.

Figura 40 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H05AC093060 via hidrólise enzimática.

Observando o gráfico da Figura 40, em 13 h de reação, a enzima consumiu 49,6% da celulose. Em 48 h de reação, o rendimento foi de 77,4%. A Tabela 11 apresenta os rendimentos nos tempos de 15 h e 48 h da hidrólise enzimática.

Tabela 10 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560 e H05AC093060 via hidrólise enzimática.

Fibra	Tempo	Rendimento Glicose (%)	
		15 h	48 h
Fibra de Partida		-	58,5
H05AC0915AM		53,0	72,0
H05AC091560		57,2	74,8
H05AC093060		56,0	77,4

Nota-se que todas as fibras pré-tratadas apresentaram um rendimento superior em relação a fibra de partida de 58,5%, indicando que o pré-tratamento foi efetivo no aumento do rendimento de glicose a partir da celulose da fibra de curauá e que, quanto maior a temperatura e o tempo de pré-tratamento, maior foi o rendimento de glicose. Comparando-se as fibras H05AC0915AM e H05AC093060, notou-se que o rendimento aumentou ao elevar o tempo de reação de 1,5 h para 3,0 h e aumentando a temperatura da ambiente para 60 °C. No entanto, cabe futuramente avaliar se em termos de custo compensa as alterações em temperatura e tempo de pré-tratamento, considerando as variações encontradas nos rendimentos das respectivas reações de hidrólise enzimática.

4.6 Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560

A fibra H15AC091560 foi submetida a hidrólise enzimática, porém utilizando 3 vezes mais enzima por grama de fibra. Os licores foram analisados e as fibras que não reagiram foram caracterizadas. A seguir, serão discutidos os resultados obtidos para avaliar o efeito causado pelo aumento da enzima na fibra.

4.6.1 Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise

4.6.1.1 DRX

A Figura 41 ilustra os índices de cristalinidade (IC) das fibras que não reagiram, isoladas do meio ao longo da hidrólise enzimática. Os intervalos escolhidos para a retirada das alíquotas do meio reacional foram de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h de reação.

Figura 41 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H15AC091560, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

A fibra em 0 min apresentou o IC de 62%, em 30 min, o índice foi de 64%, decorrente do consumo preferencial de cadeias em domínios não cristalinos. Em 2 h de reação houve uma redução no IC para 54%, indicando que os domínios cristalinos foram preferencialmente afetados pela hidrólise enzimática, reduzindo o índice de cristalinidade. Entre 2 h a 6 h houve um crescimento no IC para 66%. Esse valor permaneceu constante em até 31 h de reação, havendo uma leve redução no valor para 62%. O índice de cristalinidade permaneceu elevado durante toda a reação, indicando que a enzima consumiu preferencialmente cadeias de celulose e de hemiceluloses presentes em domínios não cristalinos que são mais facilmente hidrolisados. Em relação a fibra H05AC091560, essas não apresentaram IC superior a 70%.

Pode ser que o fato de haver muita enzima no sistema tenha corroborado para o aumento no consumo de celulose no domínios cristalino, pois boa parte das enzimas já estavam presentes nos domínios não cristalinos, impedindo o aumento do IC ao longo da reação.

4.6.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da Figura 42 são referentes as fibras que não reagiram de curauá H05AC091560 submetidas a hidrólise enzimática.

Figura 42 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560 via hidrólise enzimática.

Observou-se a presença de fragmentos na fibra logo nos 30 primeiros minutos de reação, o que foi observado apenas em 2 h de reação na fibra H05AC091560. A triplicação da quantidade de enzima levou a rápida modificação na morfologia da superfície das fibras. Ao longo da reação, as fibras apresentaram mais fragmentos e rupturas em relação a fibra H05AC091560, devido a quantidade de enzima utilizada. Houve o surgimento de filamentos aglomerados apenas após 23 h de reação, o mesmo observado em relação a fibra H05AC091560.

4.6.1.3 *Análise Termogravimétrica (TGA)*

A Figura 43 ilustra as curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

Figura 43 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e as ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.

Na Figura 43. c) g) e k), observou-se que os “ombros” referentes a decomposição das hemiceluloses têm maior intensidade em relação a decomposição de hemiceluloses nos tempos reacionais da fibra H15AC091560, indicando que o aumento da concentração de enzimas durante a hidrólise enzimática aumentou o consumo de hemiceluloses de forma mais efetiva nas 15 primeiras horas em relação a fibra H05AC091560, como se observou na Figura 46, referente ao teor de xilose obtida ao longo da hidrólise enzimática.

O pico em 366 °C e 376 °C (Figura 43.b), f) e j)) pode ser atribuído a decomposição da celulose. Nas Curvas DTG da Figura 43.d), notou-se que houve uma grande diferença entre o pico de 0 min de reação e o de 2 h, sugerindo que o consumo de celulose nas 2 primeiras horas de reação foi mais acentuado em relação a fibra H05AC091560. Nas curvas DTG da Figura 43.d), h) e l) o pico foi de menor intensidade ao longo da reação, indicando que a celulose estava sendo consumida ao longo da hidrólise, além disso, houve pouca diferença na intensidade dos picos entre 31 h e 48 h, devido a pouca variação de glicose obtida durante a hidrólise enzimática entre 31 e 48 h, conforme foi discutido na Seção 4.6.2.

As curvas TG mostram a decomposição da lignina a partir de aproximadamente 390 °C, o mesmo observado na fibra H05AC091560, porém não foi possível observar um pico referente a sua decomposição nas curvas DTG da Figura 43, dado o baixo teor de lignina presente na fibra lignocelulósica.

A análise por CLAE foi realizada para verificar se houve aumento na obtenção de glicose no licor em relação a fibra H05AC091560.

4.6.1.4 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 44 ilustra o gráfico em barras para a espessura e o comprimento das fibras de curauá H15AC091560 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 44 - Gráfico em barras de espessura e o comprimento das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560 durante a hidrólise enzimática.

A Figura 45 apresenta o mapa de densidade das fibras H15AC091560 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 45 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H15AC091560, proveniente das reações de hidrólise enzimática.

Observando-se os resultados obtidos na Figura 44, notou-se que a densidade alterou nas fibras de comprimentos entre $[46-599]\mu\text{m}$ ao longo de toda a reação, enquanto que os demais comprimentos presentes no gráfico permaneceram constantes. Vale destacar que houve uma redução significativa de densidade de fibras com espessuras entre $[77-129]\mu\text{m}$ e $[215-359]\mu\text{m}$ (retângulos azul e vermelho no gráfico de barras), enquanto que a densidade aumentou de $[129-215]\mu\text{m}$ (retângulo verde) de 0 a 48 h de reação. Para os demais comprimentos detectados pelo equipamento, não houve modificações na densidade.

Analisando o gráfico de espessuras, observou-se que houve uma redução de densidade de fibras com espessuras entre $[5-11]\mu\text{m}$ e $[18-50]\mu\text{m}$, havendo um aumento significativo em fibras com espessuras entre $[11-18]\mu\text{m}$, como consequência do ataque intensificado das enzimas na fibra. Fato que pôde ser observado nos mapas de densidade da Figura 45.

As enzimas reduziram significativamente a densidade de fibras localizados fora do pico, indicando que houve um consumo de fibras com espessuras indicadas no gráfico, com exceção daquelas com espessuras entre $[11-18]\mu\text{m}$. As enzimas tiveram preferência em atuar ao longo

da fibra e não em suas extremidades, modificando fortemente as espessuras das fibras e não os seus comprimentos.

4.6.2 Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560

A Figura 46 apresenta o gráfico de concentrações de glicose e de xilose obtidas durante a hidrólise enzimática da fibra H15AC091560.

Figura 46 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H15AC091560 via hidrólise enzimática.

A curva apresentou um crescimento acentuado em até 5 h de reação, reduzindo a obtenção de açúcares em até 15 h. Em seguida, a curva foi atenuada até 48 h de reação. Em 15 h de reação, o teor de glicose foi de 10,9 g.L⁻¹ e em 48 h de reação, o teor foi de 12,8 g.L⁻¹. O teor de xilose, em 15 h, foi de 2,5 g.L⁻¹ e, em 48 h, foi de 3,1 g.L⁻¹. A Tabela 12 apresenta os resultados referentes a hidrólise enzimática das fibras H05AC091560 e H15AC091560, em que a diferença na hidrólise residiu apenas no teor de enzima presente na solução.

Tabela 11 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC091560 e H15AC091560.

Fibra \ Tempo	Concentração de Glicose/Xilose (g.L ⁻¹)	
	15 h	48 h
H05AC091560	8,9/2,0	11,7/3,0
H15AC091560	10,9/2,5	12,8/3,1

Considerando o tempo de 15 h de reação para as fibras H05AC091560 e H15AC091560, observa-se que houve diferença nas concentrações de glicose e de xilose geradas, de 2 g.L⁻¹ e 0,5 g.L⁻¹ respectivamente. Enquanto que após 48 h de reação, a diferença de concentração entre as fibras foi de 1,8 g.L⁻¹ e 0,1 g.L⁻¹ de glicose e xilose respectivamente.

Com relação a formação de glicose e xilose, ao aumentar a concentração de enzima houve aumento na velocidade de reação na obtenção dos açúcares, aumentando a concentração de glicose em xilose na fibra H15AC091560 nos tempos de 15 h e 48 h em relação a fibra H05AC091560. Com o passar do tempo, a concentração de glicose e xilose no licor aumentaram e isso pode ter dificultado a hidrólise enzimática (GOMES, 2017). Quando o produto é formado pode ocorrer inibição da ação enzimática no sistema devido a interferências nas condições de acesso da enzima ao substrato, o que pode levar a redução na velocidade de reação (NELSON, D., AND COX, 2014) Entre 15 h e 48 h se observou um pequeno aumento na obtenção de açúcares em relação às 15 h iniciais da hidrólise enzimática.

4.6.2.1 *Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H15AC091560*

Com base no teor de α -celulose, construiu-se um gráfico de rendimento da hidrólise enzimática da fibra H15AC091560.

Figura 47 - Gráfico de rendimento da obtenção de glicose da fibra H15AC091560 via hidrólise enzimática.

Foi possível observar no gráfico que em 5 h de reação, a enzima consumiu metade da celulose disponível na fibra, diferente da fibra H05AC091560 em que o mesmo rendimento foi obtido em 11 h de reação, porém devido a grande quantidade de glicose no licor, a velocidade na formação de glicose reduziu acentuadamente. A Tabela 13 apresenta o rendimento dos tempos de reação de 15 h e 48 h das fibras H05 e H15AC091560.

Tabela 12 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC091560 e H15AC091560.

Fibra \ Tempo	Rendimento Glicose (%)	
	15 h	48 h
Fibra de Partida	-	58,5
H05AC091560	57,20	74,83
H15AC091560	69,85	81,93

O aumento da proporção de enzima aumentou o rendimento da hidrólise enzimática em 12,6% em 15 h e 7,1% em 48 h. O custo do complexo enzimático pode se contrapor ao aumento observado no rendimento da hidrólise quando triplicou a proporção de enzimas.

4.7 Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060

A hidrólise enzimática da fibra H05NaOH202060 foi realizada visando comparar os resultados com os obtidos por GOMES (2017) para a fibra de curauá tratada com solução alcalina a temperatura ambiente, enquanto no presente estudo a temperatura foi de 60 °C,

mantendo-se as outras condições. A seguir, são apresentados os resultados das caracterizações realizadas nas fibras que não reagiram e no licor da hidrólise enzimática.

4.7.1 Caracterização das Fibras que Não Reagiram Durante a Hidrólise

4.7.1.1 DRX

A Figura 48 ilustra os índices de cristalinidade (IC) das fibras que não reagiram, isoladas do meio ao longo da hidrólise enzimática de 48 h. Os intervalos escolhidos foram de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h de reação.

Figura 48 - Índice de cristalinidade (%) das fibras de curauá H05NaOH202060, que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Em 0 min de reação o IC foi de 79%. Até 23 h de reação, houve uma queda no IC para 61%, indicando que ocorreu um consumo preferencial de celulose em regiões cristalinas. O IC aumentou novamente para 75% no final da reação, indicando que, de 0 min a até 48 h de reação, de 79% a 75% de IC, as enzimas atacaram preferencialmente domínios cristalinos, reduzindo o índice de cristalinidade da fibra, o que pode ser uma vantagem, já que as celuloses presentes nos domínios não cristalinos são mais facilmente acessadas pela enzima, podendo aumentar a obtenção de açúcares a partir da celulose.

O pré-tratamento alcalino hidrolisou boa parte das hemiceluloses que é predominantemente não cristalina. Logo, durante toda a hidrólise enzimática, o IC se manteve

elevado. Apesar do diferente pré-tratamento, o IC oscilava para mais e para menos, devido a acesso a celulose presente em regiões cristalinas ou não cristalinas.

4.7.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias da Figura 49 são referentes as fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060 submetidas a hidrólise enzimática.

Figura 49 - Micrografias das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060.

Observou-se que as fibras são mais finas em relação a fibra de partida durante toda a hidrólise enzimática. Entre 30 minutos até 48 horas, observou-se a presença de fragmentos presentes na fibra, porém, ao contrário do que se observou na fibra pré-tratada com ácido oxálico 0,9M, as fibras apresentaram a mesma intensidade de fragmentação. Além disso, pequenos filamentos não se agregaram.

Na Figura 50, há duas micrografias referentes a fibra estudada por Gomes (2017) que foi submetida a mesma condição de hidrólise enzimática e de pré-tratamento alcalino, com exceção da temperatura empregada da mercerização que foi branda, ou seja temperatura ambiente.

Figura 50 - Fibra de curauá que não reagiu mercerizada utilizando hidróxido de sódio 20% durante 2 h a temperatura ambiente e submetida posteriormente a hidrólise enzimática utilizando 0,5mL de enzima por g. de fibra. a) 30 min e b) 48 horas de hidrólise enzimática.

Fonte: Gomes (2017).

Observou-se que as fibras também apresentaram fragmentos, porém de forma mais acentuada em relação as fibras presentes nas micrografias da Figura 49.

4.7.1.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 51 ilustra as curvas TG e DTG das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060 durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

Figura 51 - Curvas TG e DTG das fibras que não reagiram durante a hidrólise enzimática e suas ampliações dos picos/ombros referentes à decomposição da celulose e de hemiceluloses.

Analisando as curvas TG da Figura 51, observou-se que as curvas se diferem bastante em cada tempo de reação. Na Figura 51.a), foi notável a diferença do tempo inicial do tempo de 30 min de reação, indicando que as enzimas hidrolisaram fortemente a celulose nos 30 primeiros minutos de reação. Foi possível observar na curva DTG da Figura 51.b), a diferença das curvas dos tempos de 0 min a 4 h.

Nas Figuras 51. c), g) e k), não foi possível observar o “ombro” referente a decomposição de hemiceluloses. A mercerização removeu boa parte da macromolécula durante o pré-tratamento, não sendo possível observar seu evento na curva DTG pelo fato de ter baixo teor de hemiceluloses na fibra lignocelulósica.

Nas Figuras 51. d), h) e l), notou-se uma grande diferença de intensidade dos picos referente a celulose na fibra que não reagiu. As diferenças nos picos foram maiores em relação aos picos obtidos nas curvas DTG da fibra H05AC091560. Devido a grande quantidade de enzima, houve um consumo acelerado de celulose na fibra lignocelulósica. Diante disso houve maior diferença na composição da fibra nos intervalos coletados. A fibra em 0 min apresentou um maior pico em relação ao teor de celulose, o pico de menor intensidade está em 48 h, indicando que, ao longo da reação, a celulose foi consumida.

Como ocorreu nas análises envolvendo as outras fibras tratadas, não foi possível observar o pico característico da decomposição da lignina, sendo possível apenas observar na curva TG a etapa referente à sua decomposição a partir de 390 °C, devido ao seu baixo teor na fibra lignocelulósica.

4.7.1.4 Comprimento e Espessura Médio das Fibras

A Figura 52 ilustra o gráfico em barras para a espessura e comprimento das fibras de curauá H05NaOH202060 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 52 - Gráfico em barras de espessura e comprimento das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060 durante a hidrólise enzimática nos tempos de 0 min, 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 11 h, 15 h, 23 h, 31 h e 48 h.

A Figura 53 apresenta o mapa de densidade das fibras NaOH202060 que não reagiram durante a hidrólise enzimática.

Figura 53 - Mapas de densidade referentes ao comprimento e espessura das fibras que não reagiram de curauá H05NaOH202060, proveniente das reações de hidrólise enzimática.

Observando-se os resultados obtidos na Figura 55, notou-se que a densidade oscilou em fibras de comprimentos entre $[46-599]\mu\text{m}$ ao longo de toda a reação, enquanto que para os comprimentos presentes no gráfico permanecem constantes. Vale ressaltar que ocorreu redução acentuada de densidade em fibras com comprimentos entre $[129-215]\mu\text{m}$ (retângulo pontilhado azul) e um aumento em fibras entre $[77-129]\mu\text{m}$ (retângulo pontilhado laranja), indicando o ataque preferencial da fibra foi em comprimentos intermediários.

Observando o gráfico de espessuras, percebeu-se que, ao longo da reação, a densidade de fibras com espessuras superiores a $18\mu\text{m}$ diminuiu, enquanto que a densidade das fibras com espessuras entre $[4-18]\mu\text{m}$ aumentou, indicando que a enzima preferencialmente agiu em fibras com espessuras maiores por ter maior superfície de contato para ataque enzimático. Diante disso, essas fibras sofreram uma redução na espessura aumentando a densidade de fibras com espessuras entre $[4-18]\mu\text{m}$, o que pode ser também observado nos mapas de densidade da Figura 53. Durante a reação, o ataque enzimático modificou mais as espessuras das fibras em relação aos seus comprimentos, indicando que a enzima atuou preferencialmente ao longo da fibra (maior superfície de contato) e não nas suas extremidades.

4.7.2 Caracterização dos Licores Obtidos Durante a Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060

A Figura 54 apresenta o gráfico de glicose e xilose obtidas durante a hidrólise enzimática da fibra H05NaOH202060.

Figura 54 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05NaOH202060.

Não foi detectado a presença de arabinoses, obtido a partir de hemiceluloses, no licor, resultante do seu baixo teor na fibra mercerizada. A curva apresentou uma acentuada ascensão nas 10 primeiras horas de reação. Em seguida, aos 10 primeiros minutos já foi possível observ a formação de glicose. Para facilitar a comparação entre os pré-tratamentos, a Tabela 14 apresenta as concentrações obtidas de açúcares no licor nos tempos de 15 h e 48 h de reação.

Tabela 13 - Concentração de glicose/xilose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560, H05AC093060 e H05NaOH202060.

Fibra \ Tempo	Concentração Glicose/Xilose (g.L ⁻¹)	
	15 h	48 h
H05AC0915AM	8,7/1,8	11,8/2,7
H05AC091560	8,9/2,0	11,7/3,0
H05AC093060	9,0/1,2	12,4/1,8
H05NaOH202060	11,3/0,8	14,5/1,0

Comparando os resultados obtidos entre a fibra H05AC093060 e a fibra H05NaOH202060, observou-se que a concentração de glicose obtida aumentou $2,3 \text{ g.L}^{-1}$ de diferença em 15 h de reação e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de diferença em 48 h de reação. A distinção no final da reação foi menor, pois a enzima foi menos efetiva na reação devido a saturação do meio com glicose, dificultando a hidrólise da celulose. Quanto ao teor de xilose, a concentração caiu $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ da fibra H05AC093060 a fibra H05NaOH202060. A fibra pré-tratada com o ácido oxálico apresentou maior teor hemiceluloses, que apresenta principalmente xilanas em sua composição estrutural. Ao reduzir o teor de hemiceluloses, reduziu-se o teor de xilana disponível para hidrólise. Dentre todos os pré-tratamentos aplicados, a fibra H05NaOH202060 foi a que apresentou o maior teor de glicose por litro em relação aos pré-tratamentos com ácido oxálico.

4.7.2.1 *Rendimento da Hidrólise Enzimática da Fibra de Curauá H05NaOH202060*

Com base nas Equações 7 e 8, montou-se o gráfico de rendimento da hidrólise enzimática da fibra H05NaOH202060. Os resultados estão na Figura 55.

Figura 55 - Gráfico de açúcares solúveis presente no licor da hidrólise da fibra de curauá H05NaOH202060 após a hidrólise enzimática.

O gráfico obtido foi semelhante a curva de obtenção de glicose. Observou-se que com 8 h de reação, o rendimento foi de 49,8%, diferente da fibra H05AC093060, em que o rendimento próximo a 50% foi obtido em 13 h de reação. Por possuir menos lignina e hemiceluloses em sua composição (Tabelas 5 e 7), a enzima conseguiu hidrolisar mais rápida a celulose disponível na fibra mercerizada, comparativamente a fibra H05AC093060, pois este apresentou um teor maior de hemiceluloses e de lignina, sendo que este componente afeta consideravelmente a hidrólise enzimática da celulose. A Tabela 15 apresenta o rendimento obtido nos tempos de 15 h e de 48 h.

Tabela 14 - Rendimento de glicose na hidrólise enzimática das fibras H05AC0915AM, H05AC091560, H05AC093060 e H05NaOH202060.

Fibra \ Tempo	Rendimento Glicose (%)	
	15 h	48 h
Fibra de Partida	-	58,5
H05AC0915AM	53,0	72,0
H05AC091560	57,2	74,8
H05AC093060	56,0	77,4
H05NaOH202060	55,7	71,6

Todos os pré-tratamentos resultaram em hidrólise enzimática com rendimento superior a hidrólise da fibra de partida (58,5%). Observou-se que a maior diferença de rendimento em 15 h ocorreu entre a fibra H05AC091560 e H05AC0915AM de 4,2%. Em 48 h de reação, a maior diferença se dá entre a fibra H05NaOH202060 e a fibra H05AC093060, que foi de 5,8%. A fibra mercerizada apresentou rendimento menor em relação a fibra pré-tratada com ácido oxálico. A mercerização hidrolisou parte da celulose presente nos domínios não cristalinos, aumentando a cristalinidade de 61% para 79% (Tabela 7), dificultando o acesso das enzimas às cadeias de celulose.

5 CONCLUSÃO

As mudanças nos teores de α -celulose, hemiceluloses e lignina, levando em consideração a temperatura empregada, o tempo de pré-tratamento e a concentração do ácido oxálico comparando as fibras não pré-tratadas (Tabela 3) com as fibras pré-tratadas (Tabela 5) não foram significativas.

A hidrólise enzimática das fibras pré-tratadas levou a aumentos significativos nos rendimentos de glicose para todas as fibras tratadas com AO, aumentando de 58,5% para a fibra de partida para 77,4%, referente a fibra H05AC093060. Estes resultados indicaram que as variações nas morfologias das superfícies e nas dimensões das fibras, em decorrência dos pré-tratamentos, facilitaram de forma significativa o acesso das enzimas às cadeias de celulose.

As fibras H05AC093060 foram também submetidas à hidrólise triplicando a proporção de enzimas no meio, o que aumentou o rendimento de 77,4 % para aproximadamente 82%. No entanto, seria necessário um estudo de viabilidade econômica para avaliar se o aumento no custo referente a quantia de enzimas usada não se contrapõe ao aumento observado no rendimento.

O tratamento com solução aquosa alcalina (20%, 2 h, a 60 °C, NaOH202060), reduziu o teor de lignina de 7,6% (fibra de partida, Tabela 3) para 3,0% e o teor de hemiceluloses de 15,9% a 6,7% (Tabela 7). Este pré-tratamento aumentou o rendimento da hidrólise enzimática de 58,5%, após 48 h de reação para a fibra de partida, para 71,6%. Este pré-tratamento levou à diminuição nos teores de lignina e hemiceluloses, componentes que podem dificultar as interações das enzimas com as cadeias de celulose, o que não ocorreu com os tratamentos com solução ácida, nas condições consideradas neste estudo. No entanto, o aumento no rendimento de glicose, comparativamente às fibras de partida, foi mais significativo para as fibras pré-tratadas com soluções de AO. Estes resultados indicam que o aumento na cristalinidade devido ao pré-tratamento com solução alcalina (de 61%, fibras não pré-tratadas, Tabela 3, para 79% (Tabela7) dificultou o acesso das enzimas às cadeias de celulose. O resultado obtido quanto ao rendimento de glicose para as fibras NaOH202060 foi (71,6%) foi similar ao obtido para a fibra H05AC0915AM (72,0%).

O presente estudo aprofundou as investigações feitas previamente, levando a um conjunto de resultados significativos referentes a diversificados pré-tratamentos das fibras de

curauá, com detalhada caracterização das fibras pré-tratadas ou em natura. Durante a hidrólise enzimática das mesmas, amostras foram retiradas do meio, separando-se as fibras que não reagiram dos licores, as quais foram detalhadamente caracterizadas, assim como os licores. Até nosso conhecimento que se tem, este estudo sobre as fibras de curauá não tem precedentes na literatura.

Os resultados obtidos apontam para um excelente potencial das fibras de curauá como fonte de açúcares fermentescíveis, sendo que em futuras investigações outros pré-tratamentos poderão ser considerados, visando aumentar o rendimento de glicose, usando os resultados aqui descritos e discutidos.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. B. et al. **Biomass pretreatment: Fundamentals toward application**. Biotechnology Advances, v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011.
- ALVIRA, P. et al. **Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review**. Bioresource Technology, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- AMIN, F. R. et al. **Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion**. AMB Express, v. 7, n. 1, p. 72, 2017.
- Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis: 2017**. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, Rio de Janeiro, RJ. p. 263, 2017, ISSN 1983-5884: [s.n.].
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. **Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: The role of amorphogenesis**. Biotechnology for Biofuels, v. 3, n. 1, p. 1–11, 2010.
- ARENAS-CÁRDENAS, P. et al. **Current pretreatments of lignocellulosic residues in the production of bioethanol**. Waste and Biomass Valorization, v. 8, n. 1, p. 161–181, 2017.
- BADIEL, M. et al. **Comparison of chemical pretreatment methods for cellulosic biomass**. APCBEE Procedia, v. 9, n. Icbec 2013, p. 170–174, 2014.
- BEHERA, S. et al. **Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 36, p. 91–106, 2014.
- BHATTACHARYA, D.; GERMINARIO, L. T.; WINTER, W. T. **Isolation, preparation and characterization of cellulose microfibrils obtained from bagasse**. Carbohydrate Polymers, v. 73, n. 3, p. 371–377, 2008.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1967.
- BUDAVARI, S. **The MERCK index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biological**. 1. ed. NJ: Merck: Whitehouse, 1996.
- BUSCHLE-DILLER, G.; ZERONIAN, S. H. **Enhancing the reactivity and strength of cotton fibers**. Journal of Applied Polymer Science, v. 45, n. 6, p. 967–979, 1992.
- BUSSAMRA, B. C.; FREITAS, S.; COSTA, A. C. DA. **Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail**. Bioresource Technology, v. 187, p. 173–181, 2015.
- CASTRO, D. O. et al. **Use of castor and canola oils in “biopolyethylene” curauá fiber**

- composites**. Composites Part A: Applied Science and Manufacturing, v. 95, p. 22–30, 2017.
- CASTRO, D. O.; RUVOLO-FILHO, A.; FROLLINI, E. **Materials prepared from biopolyethylene and curaua fibers: Composites from biomass**. Polymer Testing, v. 31, n. 7, p. 880–888, 2012.
- CASTRO, D. O. DE. **Biocompósitos a partir de “polietileno verde”, óleos vegetais, macro e nano fibras de curauá**. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 201, 2014.
- CHEN, H. **Biotechnology of Lignocellulose Materials**. 1. ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2014. v. 218419139
- CORRÊA, A. C. et al. **Cellulose nanofibers from curaua fibers**. Cellulose, v. 17, n. 6, p. 1183–1192, 2010.
- DAVID, G. F. et al. **Thermochemical conversion of sugarcane bagasse by fast pyrolysis: High yield of levoglucosan production**. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, v. 133, n. March, p. 246–253, 2018.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia Eletrônica de Varredura: Aplicações e Preparação de Amostras: Materiais Poliméricos, Metálicos e Semicondutores**. 1ª ed. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: Walter de Gruyter & Co, 1989.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- FROLLINI, E. et al. **Poly (butylene succinate) reinforced with different lignocellulosic fibers**. Industrial Crops & Products, v. 45, p. 160–169, 2013.
- FROLLINI, E. et al. **Biocomposites based on poly(butylene succinate) and curaua: Mechanical and morphological properties**. Polymer Testing, v. 45, p. 168–173, 2015.
- GIRISUTA, B. et al. **A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid**. Chemical Engineering Journal, v. 217, p. 61–70, 2013.
- GOMES, B. L. **Pré-tratamento e sacarificação da fibra de curauá**. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 120, 2017.
- GUPTA, V. K. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications**. [s.l: s.n.].
- IMAMOGLU, E.; SUKAN, F. V. **The effects of single and combined cellulosic agrowaste**

substrates on bioethanol production. Fuel, v. 134, p. 477–484, 2014.

IONEL BALCU, CORINA AMALIA MACARIE, A.-E. S. AND R. O. P. (2011). **Combined microwave - acid pretreatment of the biomass.** Progress in Biomass and Bioenergy Production, p. 223–240, 2011.

JAISWAL, A.; RAVINDRAN, R. **A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food.** Bioresource Technology, v. 85, p. 78–96, 2015.

JARDINE, T. D. B.; J. G. **Gordura Animal.** Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1om7kf02wyiv802hvm3jholyyoom.html>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÉCZEY, K. **Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol.** Industrial Crops and Products, v. 20, n. 1, p. 103–110, 2004.

KASCHUK, J. J. **Hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal.** Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 170, 2014.

KASCHUK, J. J. et al. **Enzymatic hydrolysis of mercerized and unmercerized sisal pulp.** Cellulose, v. 24, n. 6, p. 2437–2453, 2017.

KASCHUK, J. J.; FROLLINI, E. **Effects of average molar weight, crystallinity, and hemicelluloses content on the enzymatic hydrolysis of sisal pulp, filter paper, and microcrystalline cellulose.** Industrial Crops and Products, v. 115, n. October 2017, p. 280–289, 2018.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos Avançados, v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; KROON, J. **The crystal and molecular structures of cellulose I and II.** Glycoconjugate Journal, v. 14, n. 5, p. 677–690, 1997.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. **Does change in accessibility with conversion depend on both the substrate and pretreatment technology?** Bioresource Technology, v. 100, n. 18, p. 4193–4202, 2009.

LACERDA, T. M. et al. **Saccharification of Brazilian sisal pulp: Evaluating the impact of mercerization on non-hydrolyzed pulp and hydrolysis products.** Cellulose, v. 19, n. 2, p. 351–362, 2012.

LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais.** Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São

Paulo, São Carlos, p. 252, 2012a.

LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. [s.l.: s.n.].

LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. **Oxalic acid as a catalyst for the hydrolysis of sisal pulp**. *Industrial Crops and Products*, v. 71, p. 63–172, 2015.

LEE, J. W. et al. **Scale-up study of oxalic acid pretreatment of agricultural lignocellulosic biomass for the production of bioethanol**. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 16, p. 7451–7456, 2011.

LEE R. LYND, PAUL J. WEIMER, WILLEM H. VAN ZYL, I. S. P. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.

LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil**. *Novos Estudos - CEBRAP*, v. 78, p. 15–21, 2007.

LIANG, S.; XU, M.; ZHANG, T. **Unintended consequences of bioethanol feedstock choice in China**. *Bioresource Technology*, v. 125, p. 312–317, 2012.

LIU, C. F.; SUN, R. C. **Cellulose**. 1. ed. [s.l.] Elsevier, 2010.

LIU, W. et al. **Effects of fibrillation on the wood fibers' enzymatic hydrolysis enhanced by mechanical refining**. *Bioresource Technology*, v. 206, p. 99–103, 2016.

MENEZES, C. R. DE; BARRETO, A. R. **Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos : Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico**. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 19, p. 1365–1391, 2015.

MESA, L. et al. **Comparison of process configurations for ethanol production from two-step pretreated sugarcane bagasse**. *Chemical Engineering Journal*, v. 175, n. 1, p. 185–191, 2011.

MOHAMED ABDUL GHANI, N. M. A.; VOGIATZIS, C.; SZMERKOVSKY, J. **Biomass feedstock supply chain network design with biomass conversion incentives**. *Energy Policy*, v. 116, n. January, p. 39–49, 2018.

MONTEIRO, S. N. et al. **Comportamento mecânico e características estruturais de compósitos poliméricos reforçados com fibras contínuas e alinhadas de curauá**. *Matéria (Rio de Janeiro)*, v. 11, p. 197–203, 2006.

NELSON, D., AND COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. New York: W.H.Freeman and Company, 2014.

OSULLIVAN, A. C. **Cellulose: the structure slowly unravels**. *Cellulose*, v. 4, n. 3, p. 173–207,

1997.

QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C. E. **Impact of surfactants on pretreatment of corn stover**. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 5941–5951, 2010.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. **A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities**. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 92–102, 2016.

RAZERA, I. A. T. **Fibras lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofenólica**. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 166, 2006.

SALLES-FILHO, S. L. M. et al. **Global Bioethanol: Evolution, Risks and Uncertainties**. 1ª ed. Longo: Elsevier, 2016.

SÁNCHEZ, C. **Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi**. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 185–194, 2009.

SANTOS, R. P. DE O. **Compósitos baseados em PET reciclado, fibras de sisal e plasticizantes oriundos de fontes renováveis: estudo do processamento e propriedades destes materiais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo, p. 157, 2012.

SATYANARAYANA, K. G.; GUIMARÃES, J. L.; WYPYCH, F. **Studies on lignocellulosic fibers of Brazil. Part I: Source, production, morphology, properties and applications**. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, v. 38, n. 7, p. 1694–1709, 2007.

SATYANARAYANA K.G.; T.H.S., F.-S.; P., B. **Lignocellulosic Materials of Brazil—Their Characterization and Applications in Polymer Composites and Art Works**. In: SUSHEEL, K. (Ed.). *Lignocellulosic Composite Materials*. [s.l: s.n.]. p. 96.

SILVA, A. T. B. DA et al. **Cenários prospectivos para o comércio internacional de etanol em 2020**. *Revista de Administração*, v. 48, n. 4, p. 727–738, 2013.

SILVA, R. et al. **Aplicações de fibras lignocelulósica na química de polímeros e em compósitos**. *Química nova*, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

SINGH, Y. D.; MAHANTA, P.; BORA, U. **Comprehensive characterization of lignocellulosic biomass through proximate, ultimate and compositional analysis for bioenergy production**. *Renewable Energy*, v. 103, p. 490–500, 2017.

SUBHEDAR, P. B.; GOGATE, P. R. **Alkaline and ultrasound assisted alkaline pretreatment for intensification of delignification process from sustainable raw-material**. *Ultrasonics*

Sonochemistry, v. 21, n. 1, p. 216–225, 2014.

SUN, R.-C. **Cereal Straw as a Resource for Sustainable Biomaterials and Biofuels: Chemistry, Extractives, Lignins, Hemicelluloses and Cellulose**. 1ª ed. Netherlands: [s.n.].

TECHPAP. **Techpap innovation for paper**. Disponível em: <<http://www.techpap.com/fiber-and-shive-analyzer,lab-device,31.html>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

TEIXEIRA, R. S. **Efeito das fibras de curauá e de polipropileno no desempenho de compósitos cimentícios produzidos por extrusão**. Tese (Doutorado em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, p. 149, 2015.

VA, M. J.; ALONSO, J. L. **Xylooligo- saccharides : manufacture and applications**. Trends in Food Science & Technology, v. 11, n. 11, p. 387–393, 2000.

WADA, M.; HEUX, L.; SUGIYAMA, J. **Polymorphism of cellulose I family: Reinvestigation of cellulose IVI**. Biomacromolecules, v. 5, n. 4, p. 1385–1391, 2004.

YU, X. et al. **Measurement of filter paper activities of cellulase with microplate-based assay**. Saudi Journal of Biological Sciences, v. 23, n. 1, p. S93–S98, 2015.

YUNUS, R. et al. **Effect of ultrasonic pre-treatment on low temperature acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch**. Bioresource Technology, v. 101, n. 24, p. 9792–9796, 2010.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. **Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose**. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2012.

ZHOU, X. et al. **Dilute acid pretreatment differentially affects the compositional and architectural features of Pinus bungeana Zucc. compression and opposite wood tracheid walls**. Industrial Crops and Products, v. 62, p. 196–203, 2014.

ZHOU, Y. et al. **Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose**. Bioresource Technology, v. 182, p. 136–143, 2015.