Bianca Lovezutti Gomes

Pré-tratamento e sacarificação da fibra de curauá

**Dissertação apresentada ao instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em ciências.**

Área de concentração: Química analítica

Orientador: Prof.^a Dra. Elisabete Frollini

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2017

Dedico a todas as pessoas que mesmo longe, estiveram presentes a cada momento, me fortalecendo e apoiando cada decisão tomada. A meus pais pelo apoio fundamental não somente nesta etapa mas em todas que já conquistei até aqui

AGRADECIMENTOS

A minha família como um todo, Ana, Wado e Bruno, pelo apoio e principalmente pelos momentos de distração mais que necessário em uma semana ou mês ou ano cheio de cobranças e tensões. Em especial a minha mãe, Ana, sempre dando suporte sendo ele emocional, físico ou até mesmo financeiro.

A você Matheus pela paciência em entender que as vezes eu não era eu, que o cansaço, incertezas e preocupações tomavam conta e que você soube entender que um dia tudo isso passaria. Obrigada pelo apoio, pela presença constante mesmo que distante em alguns momentos, sem você tudo seria muito mais difícil tenho certeza disso.

Ao Benício que mesmo tendo acabado de nascer me trazia a mais pura felicidade a cada sorriso seu, foi com certeza um incentivo poder compartilhar de algumas horas dessa “fofura” toda.

Aos amigos antigos, sejam os conhecidos em São Carlos, Paula, Tamyris, Thalita, Renato, o apoio, as conversas foram essenciais para que chegasse até aqui. Seja os da infância que sempre estiveram presentes proporcionando o alívio necessário da rotina estressante de pós-graduando, Raísa, Bárbara, Ovo, Lopez, Isa vocês também têm parte nessa conquista.

Aos novos, nem tão novos assim, amigos que me entendem mais do que ninguém porque vivem a mesma vida, o mesmo ambiente, Virgínia, Dani, Danilo, Andrea. Os momentos de distração, sejam no horário de café ou naquele momento de cansaço do dia, foram no mínimo aliviantes. Em especial, a Joice, pelas discussões sobre o nosso trabalho, pela ajuda em simplesmente tudo que fiz, obviamente pela paciência, mas mais que isso obrigada por ser o apoio a mais que eu sempre preciso ter, descobri em você uma grande amiga ao longo dos meses em que passávamos juntas, trabalhando, no bar ou em casa mesmo.

Aos colegas de laboratório do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas, Gleyciara, Lucas, Ana, Rachel e Patrícia pela paciência, por compartilhar o espaço todos os dias, pelos cafés, bolos e afins.

Aos técnicos, Márcia Dib Zambon pela atenção com as análises de cromatografia e Luís Antônio Ramos pela ajuda com os problemas corriqueiros do dia-a-dia e pelos cafés e desabafos.

Aos técnicos José Augusto Lopes da Rocha (IFSC-USP) e Marcelo Luiz Calegari pela ajuda na obtenção dos dados de raios X, e Márcio de Paula pelas tantas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

À Profa. Dra. Elisabete Frollini, pela orientação e por tudo que me ensinou esses anos, pelas palavras acolhedoras quando eu precisei e pelas cobranças quando necessárias.

RESUMO

O cenário energético mundial traz à tona a necessidade da busca por fontes renováveis que contribuam de maneira positiva para a diminuição de emissões de gases nocivos, como o CO₂. Neste contexto estudos como o presente constituem importante contribuição para o melhor entendimento destas questões ambientais, para tanto o mesmo teve como objetivo avaliar o efeito de pré-tratamento com solução alcalina aquosa (mercerização, NaOH 20%, 20 g.L⁻¹, temperatura ambiente, 5h) sobre a sacarificação, via hidrólise ácida e enzimática de fibras lignocelulósicas de curauá (Teor de: umidade 8,2% ±0,2, cinzas 2,0% ±0,1, holocelulose 85,9% ±0,7, hemiceluloses 15,5% ±0,2, α-celulose 70,4% ±0,2, lignina total de 9,4% ±0,3 e índice de cristalinidade (Ic) 69,4%. Alíquotas retiradas durante a mercerização foram caracterizadas, por exemplo, a alíquota referente a 2h apresentou as seguintes propriedades: α-celulose 81,6% ±0,2, lignina total 3,2% ±0,3 e índice de cristalinidade (Ic) 75,5%. Análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), comprimento e espessura médio (MorFi) mostraram, ao longo da mercerização, aumento de rugosidade e fragmentos aderidos a superfície da fibra, e diminuição de comprimento e espessura. Fibras não tratadas e tratadas (2h) foram submetidas a hidrólise ácida (1:30 vol./massa, H₂SO₄ a 24%, 80°C, 6h), onde as fibras não reagidas foram separadas do licor via filtração, e caracterizadas por difração de raios X, MEV, MorFi, e os açúcares do licor e produtos de decomposição foram analisados via Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados da hidrólise ácida com a fibra mercerizada, apresentaram maior produção de glicose (fração celulósica) e diminuição dos teores de xilose e arabinose, (fração hemicelulósica). A glicose atingiu teor máximo de 2,68 g.L⁻¹, no entanto para a hidrólise com a fibra não tratada atingiu um máximo de 1,3 g.L⁻¹, com formação em baixa escala de produtos de decomposição (HMF e furfural). Fibras de partida e mercerizada também foram submetidas a hidrólise enzimática (48h, enzimas *celulase* comercial-Accellerase 1500, 0,5mL/g). Alíquotas das polpas não reagidas e licor foram extraídas durante a reação, e caracterizadas conforme descrito para hidrólise ácida. Microscopias mostraram que houve aumento da rugosidade e da abertura dos feixes de fibras nas fibras mercerizadas. Os valores de Ic apresentaram aumento inicial e posterior queda indicando hidrólise da fração não cristalina da celulose seguida da fração cristalina. O comprimento e espessura médio das fibras, sofreram diminuição, sendo mais acentuada na hidrólise com a fibra mercerizada e mais intenso para a espessura. Houve formação de glicose e xilose e não houve formação de produtos de decomposição como ocorrido na hidrólise ácida. A fibra não tratada apresentou um máximo de 12,0 g.L⁻¹ de glicose e 2,30 g.L⁻¹ de xilose, já a fibra mercerizada apresentou máximos de 17,5 g.L⁻¹, 1,36 g.L⁻¹ de glicose e xilose respectivamente, indicando aumento de 45% de glicose e diminuição de 56% de xilose. Esta investigação do efeito da mercerização sobre a sacarificação da fibra de curauá forneceu informações importantes para o aprofundamento deste estudo, assim como indicou que o curauá pode posteriormente se tornar fonte de produção de etanol de segunda geração.

Palavras chaves: fibra de curauá, mercerização, hidrólises ácida e enzimática, glicose

ABSTRACT

The global energy scenario brings to light the need for the search for renewable sources that contribute positively to the reduction of harmful gases emission, such as CO₂. In this context, studies such as the one herein constitute an important contribution to a better understanding of these environmental issues. The purpose of this study was to evaluate the effect of the alkaline pre-treatment (mercerization, NaOH 20%, 20 g.L⁻¹, room temperature, 5h) on saccharification, via acid and enzymatic hydrolysis of curauá lignocellulosic fibers (moisture content 8.2% ± 0.2, ashes 2.0% ± 0.1, holocellulose 85.9% ± 0.7, hemicellulose 15.5% ± 0.2, α-cellulose 70.4% ± 0.2, total lignin 9.4% ± 0.3 and crystallinity index, (Ic, 69.4%). Aliquots removed during mercerization were characterized. For example, the aliquot referring to 2h had the following properties: α-cellulose 81.6% (± 0.2), total lignin 3.2% (± 0.3) and crystallinity index (Ic) 75.5%. Analyses of scanning electron microscopy (SEM), length and average thickness (MorFi) showed increased roughness and fragments adhered to the fiber surface and a decrease in length and thickness throughout the mercerization. Untreated and treated fibers (2h) were subjected to acid hydrolysis (1:30 vol./M.H₂SO₄ 24%, 80°C, 6h), in which the unreacted fibers were separated from the liquor via filtration, and then characterized by X-ray diffraction, MEV, MorFi; liquor sugars and decomposition products were analyzed via High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results of the acid hydrolysis with the mercerized fiber presented higher glucose production (cellulose fraction) and decreased xylose and arabinose contents (hemicellulosic fraction). The maximum glucose content obtained was 2.68 g.L⁻¹, while for the hydrolysis with the untreated fiber the maximum was 1.3 g.L⁻¹, in which there was low-scale formation of decomposition products (HMF and furfural). No mercerized and mercerized fibers were also subjected to enzymatic hydrolysis (48h, commercial cellulase enzymes-Accellerase 1500, 0.5mL / g). Aliquots of the unreacted pulps and liquor were extracted during the reaction, and then characterized as described for acid hydrolysis. Microscopies showed that there was an increase in roughness and in the opening of fiber bundles in the mercerized fibers. The crystallinity indexes showed an initial increase and a subsequent decrease indicating hydrolysis of the non-crystalline fraction of the cellulose followed by the crystalline fraction. The length and average thickness of the fibers decreased, which was more accentuated in the hydrolysis with the mercerized fiber and more intense as for the thickness. There was formation of glucose and xylose and there was no formation of decomposition products as occurred in acid hydrolysis. For the untreated fiber, a maximum glucose of 12.0 gL⁻¹ and 2.30 gL⁻¹ of xylose was obtained, whereas the mercerized fiber presented a maximum of 17.5 gL⁻¹, 1.36 gL⁻¹ of glucose and xylose respectively, indicating a 45% increase in glucose and a 56% decrease in xylose. This investigation of the effect of mercerization on the saccharification of the curauá fiber provided important information for further studies, as well as indicating that the curauá can later become a source of second generation ethanol production.

Keywords: Curauá Fiber. Mercerization. Acid and Enzymatic Hydrolysis. Glucose.

Lista de figuras

Figura 1. Panorama nacional e mundial da participação de fontes renováveis na produção de energia e balanço de produção e consumo de gasolina e etanol.	17
Figura 2. Produção global de etanol por ano.	17
Figura 3. Representação esquemática de fibra lignocelulósica e principais componentes.	22
Figura 4. Representação das unidades constituintes da celulose	24
Figura 5. Unidades presentes na composição da lignina sendo (1) p-hidroxifenila (2) guaicila (3) siringila.	26
Figura 6. Reações de degradação da lignina, (a) clivagem da ligação éter arílico, (b) clivagem do grupo CH_2O	29
Figura 7. Processos de produção de bioetanol.....	31
Figura 8. Mecanismo proposto para hidrólise ácida da celulose.....	32
Figura 9. Representação da ação das celulasas na conversão de celulose a glicose.	35
Figura 10. Planta de curauá e Fibra de Curauá.....	36
Figura 11. Reator encamisado “A”; banho termostatizado “B”; rotor de agitação mecânica “C”; condensador “D”; sistema para retirada de alíquotas “E” (LACERDA, 2012).	45
Figura 12. Variação do teor de lignina Klason insolúvel, solúvel e total em função do tempo de mercerização.....	51
Figura 13. Variação do teor de holocelulose em função do tempo de mercerização	52
Figura 14. Variação do teor de α -celulose (erros de $\pm 0,1$, não perceptíveis) em função do tempo de mercerização.....	53

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura para fibra de partida e alíquotas retiradas durante o pré-tratamento de mercerização.	54
Figura 16. Difratoograma Fibra de curauá não tratada	56
Figura 17. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo de reação durante a mercerização.	57
Figura 18. Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura das fibras celulósicas durante tratamento de mercerização.....	58
Figura 19. Gráfico de barras para a espessura das fibras durante o processo de mercerização.	60
Figura 20. Gráfico de barras para comprimento das fibras durante o processo de mercerização.....	61
Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise ácida da fibra não tratada	64
Figura 22. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo durante reação de hidrólise ácida.	66
Figura 23. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise ácida da fibra não tratada.....	67
Figura 24. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra não tratada.....	69
Figura 25. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra não tratada.....	70
Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise ácida da fibra mercerizada.	71

Figura 27. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo durante reação de hidrólise ácida com a polpa mercerizada.....	73
Figura 28. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise ácida realizada com a polpa mercerizada.	74
Figura 29. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra tratada.	76
Figura 30. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra tratada.	77
Figura 31. Variação no teor da glicose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada.....	78
Figura 32. Variação no teor de xilose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada.....	79
Figura 33. Variação no teor da arabinose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada.....	80
Figura 34. Variação no teor da ácido acético formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada.....	80
Figura 35. Reação de desidratação em meio ácido da xilose	81
Figura 36. Variação no teor de furfural em função do tempo de reação da fibra não mercerizada.....	81
Figura 37. Variação no teor de glicose em função do tempo de reação.....	83
Figura 38. Comparação entre os teores de glicose obtidos para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizadas.	83
Figura 39. Teores de xilose formada em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.	84

Figura 40. Comparação entre os teores de xilose obtidos para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizada.	85
Figura 41. Distribuição dos teores de Arabinose formada a partir da hidrólise da fibra mercerizada....	86
Figura 42. Comparação entre os teores obtidos de arabinose para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizada.	86
Figura 43. Variação no teor de furfural em função do tempo de reação.	87
Figura 44. Comparação entre os teores de furfural obtidos com a hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada e mercerizada.	88
Figura 45. Reação de desidratação da glicose em meio ácido	88
Figura 46. Teores de Hidroximetilfurfural formado em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.	89
Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada.	94
Figura 48. Variação dos índices de cristalinidade durante a hidrólise enzimática por tempo.....	96
Figura 49. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise enzimática realizada com a polpa não mercerizada.	97
Figura 50. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra não tratada.	99
Figura 51. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra não tratada.	100
Figura 52. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra mercerizada.	101

Figura 53. Variação dos índices de cristalinidade durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra não tratada em função de tempo (a), comparação dos índices de cristalinidade obtidos com a fibra não tratada e tratada (b).	103
Figura 54. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise enzimática realizada com a polpa mercerizada.	105
Figura 55. Gráficos de barras para a espessura e comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra tratada.	107
Figura 56. Gráfico de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra tratada.	108
Figura 57. Distribuição dos teores de Glicose formada a partir da hidrólise da fibra não mercerizada.	109
Figura 58. Distribuição dos teores de Xilose formada a partir da hidrólise da fibra não mercerizada.	110
Figura 59. Teores de glicose formada em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.	111
Figura 60. Comparação dos teores de glicose para as reações de hidrólise enzimática com as fibras não mercerizada e mercerizada.	112
Figura 61. Distribuição dos teores de Xilose formada a partir da hidrólise da fibra mercerizada.	113
Figura 62. Comparação entre os teores de xilose obtidos para as reações de hidrólise enzimática com as fibras não mercerizada e mercerizada.	113

Lista de tabelas

Tabela 1. Propriedades da fibra de curauá _____ 49

Tabela 2. Valores de glicose máxima, glicose detectada no licor e porcentagens de celulose hidrolisada e conversão de celulose a glicose para as fibras não mercerizada e mercerizada. _____ 92

Tabela 3. Valores de glicose máxima, glicose detectada no licor e porcentagens de celulose hidrolisada para as fibras não mercerizada e mercerizada. _____ 114

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Cenário mundial referente à geração e consumo de combustíveis	16
1.2	Biomassa lignocelulósica	21
1.2.1	Celulose	23
1.2.2	Hemiceluloses	24
1.2.3	Lignina	25
1.3	Pré- tratamento	26
1.4	Mercerização	28
1.5	Produção de bioetanol	30
1.6	Hidrólise ácida	31
1.7	Hidrólise enzimática	33
1.7.1	Ação das celulasas	34
1.8	Curauá	36
2	Objetivos	38
2.1	Objetivo geral	38
2.2	Objetivos específicos	38
3	Materiais e Métodos	39
3.1	Preparo de amostra	39
3.2	Pré-tratamento com solução alcalina - Mercerização	39
3.3	Teor de umidade	39
3.4	Teor de cinzas	40
3.5	Teor de Lignina Klason (insolúvel)	40
3.6	Teor de Lignina Klason (Solúvel)	41
3.7	Teor de holocelulose	42

3.8	Teor de α -celulose	42
3.9	Microscopia eletrônica de varredura	43
3.10	Índice de cristalinidade	43
3.11	Comprimento e espessura médio das fibras (MorFi)	44
3.12	Hidrólise ácida	44
3.13	Hidrólise enzimática	45
3.14	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	47
4	Resultados e Discussão	49
4.1	Caracterização da fibra de partida	49
4.2	Caracterização das alíquotas retiradas durante o tratamento de mercerização	50
4.2.1	Teor de lignina	50
4.2.2	Teor de Holocelulose	52
4.2.3	Teor de α -celulose	53
4.3	Microscopia eletrônica de varredura- Mercerização	54
4.4	Índice de cristalinidade	56
4.5	Comprimento e espessura médio (MorFi)	58
4.6	Rendimento da mercerização	62
4.7	Hidrólise ácida com a fibra não tratada	63
4.7.1	Microscopia eletrônica de varredura – Hidrólise ácida da fibra não tratada	63
4.7.2	Índice de cristalinidade	66
4.7.3	Comprimento e espessura médio (MorFi)	67
4.8	Hidrólise ácida com a fibra tratada	70
4.8.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	71
4.8.2	Índice de cristalinidade	73
4.8.3	Comprimento e espessura médio (MorFi)	74
4.9	Análise de licores provenientes das reações de hidrólise ácida	77

4.9.1	Reação de hidrólise ácida realizada com a fibra não tratada	78
4.9.2	Reação de hidrólise ácida realizada com a fibra tratada	82
4.10	Rendimentos das hidrólises ácidas com a fibra não mercerizada e mercerizada	89
4.11	Hidrólise enzimática	93
4.11.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) – fibra não tratada	93
4.11.2	Índices de cristalinidade – fibra não tratada	96
4.11.3	Comprimento e espessura das fibras – fibra não tratada	97
4.11.4	MEV – Hidrólise enzimática realizada com a fibra tratada	100
4.11.5	Índice de cristalinidade – hidrólise enzimática com a fibra tratada	103
4.11.6	Comprimento e espessura das fibras - fibra tratada	104
4.11.7	Análise de licores - fibra não mercerizada	108
4.11.8	Análise de licores - fibra mercerizada	110
4.11.9	Rendimento para hidrólises enzimáticas realizadas com a fibra não tratada e tratada.	114
5	Conclusões	116
6	Referências Bibliográficas	117

1 Introdução

1.1 Cenário mundial referente à geração e consumo de combustíveis

Segundo informações disponíveis no Balanço energético nacional de 2016, que teve como 2015 ano base, foi registrado recuo de 9,7% na produção de gasolina e respectiva redução de 9,5% em seu consumo, queda essa compensada pelo aumento na produção e consumo de etanol que apresentou crescimento de 5,8% e 18,6%, respectivamente, se comparadas aos dados obtidos em 2014. Um dos motivos para esse cenário foi o recuo na venda de automóveis e consequente queda na demanda de combustíveis.

O acréscimo na produção e consumo de etanol fez com que a fração de renováveis, constituintes da matriz energética de consumo do setor de transportes, saltasse de 18% para 21%. A **Figura 1** ilustra o aumento da contribuição da fração renovável para a matriz energética nacional (BEN, 2016).¹

¹ Balanço energético nacional de 2016, disponível em: <https://ben.epe.gov.br/BENRelatorioSintese.aspx>

Figura 1. Panorama nacional e mundial da participação de fontes renováveis na produção de energia e balanço de produção e consumo de gasolina e etanol.

*OCDE: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

O etanol é o biocombustível mais abundante no mundo atualmente, sua tecnologia já é bem estabelecida há algumas décadas, e esse fator contribui para produção elevada e em crescimento, como ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2. Produção global de etanol por ano.

Fonte: Adaptado de <http://www.afdc.energy.gov/data/10331>)

Os Estados Unidos da América em 2015 foram o maior produtor de etanol do mundo, responsável por 58% de toda produção, e o Brasil se mantém a muitos anos na segunda posição, e foi responsável pela produção de 28% de todo etanol disponível no mundo.²

O uso de biocombustíveis como o etanol age equilibrando o balanço de massa para a emissão de gases poluentes, principalmente de CO₂. Cabe ressaltar que da totalidade de emissões antrópicas associadas à matriz energética brasileira, 462,3 MtCO₂-eq (milhões de toneladas de equivalente de CO₂) o setor de transportes contribuiu com 194,0 MtCO₂-eq, que corresponde a cerca de 42% do montante final. Embora esses dados soem alarmantes o país está na vanguarda da diminuição de emissões antrópicas, já que cada brasileiro produzindo e consumindo energia emite em média 7 vezes menos que um americano e 3 vezes menos que um chinês ou europeu. Cada brasileiro emitiu 2,3 em toneladas de CO₂ (t CO₂/hab) no ano de 2013, enquanto que esses valores são muito superiores para os americanos e chineses e europeus, da ordem de 16,2 e 6,6 respectivamente. (BEN, 2016)

O início do século XXI foi marcado por discussões da possível concorrência de investimentos e áreas destinadas a produção de alimentos e combustíveis. Relatórios datados de 2008 concluíram que os preços dos alimentos estavam sendo impactados pelo consumo de matéria-prima para produção de biocombustíveis. Posteriormente (MOHR E RAMAM 2013) focaram seus estudos na sustentabilidade da produção de etanol de primeira geração (1G), influenciada pelo cenário global de políticas que foram implementadas a fim de promover a produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas que não fossem utilizadas para consumo humano. Tem-se então

²<http://ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454098996479-8715d404-e546>

mais uma motivação para o fortalecimento no foco de produção de biocombustíveis de segunda geração (2G), o qual já vinha sendo pesquisado pelo menos duas décadas atrás. (VALDÍVIA, 2016)

As pesquisas nessa área têm visado a viabilidade e concorrência de maneira competitiva com biocombustíveis de primeira geração. Alguns fatores impulsionam essa linha de pesquisa, como: a insegurança no fornecimento de energia, a busca pela redução da dependência do petróleo e claro a diminuição de emissões de gases nocivos. Os materiais lignocelulósicos constituem principal insumo para esse tipo de produção, de etanol de segunda geração (2G) muito devido às suas características intrínsecas. (VALDÍVIA, 2016)

A produção de etanol de segunda geração, a partir de biomassa lignocelulósica apresenta sérias dificuldades se comparada a conversão de carboidratos simples que ocorre na obtenção de etanol de primeira geração, que é obtido em sua maioria utilizando como matéria-prima a cana-de-açúcar ou milho. Sua composição complexa e recalcitrante, termo que descreve a resistência a transformações e decomposições dos materiais lignocelulósicos, exige um processo de múltiplos passos, que inclui pré-tratamentos, hidrólise enzimática e fermentação. Essas características serão abordadas na sequência deste texto (LOSORDO, 2016)

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção de etanol lignocelulósico ocorreu de maneira mais lenta que o esperado, devido à percepção de alto risco tecnológico, demanda significativa de capital, altos custos com relação ao preço do petróleo que resultam em um aspecto econômico desfavorável para as biorrefinarias (STEPHEN, 2012). Porém há previsão de um período de intenso crescimento, sendo esperado que a capacidade de produção deverá atingir 2220

milhões de litros até 2020, comparada com a produção de 750 milhões de litros em 2014 (Nações Unidas, 2016; VALDÍVIA, 2016)

O Brasil teve participação relevante na COP 22, Conferência da organização das Nações Unidas sobre mudanças climáticas, propondo metas ambiciosas em se tratando da queda de emissões de gases que provocam o efeito estufa e preservação da biodiversidade, como redução de até 37% das emissões de carbono até 2025, o que seria alcançado através de ações como: recuperação de 15 milhões de hectares de pastagens, ampliação de 5 milhões de hectares para sistemas integrados de produção e o fornecimento de matéria-prima para produção de biocombustíveis como etanol e biodiesel, tendo como perspectiva que tais combustíveis devem corresponder a cerca de 18% do consumo energético até 2030.³

A COP 22 também foi cenário para o lançamento da Plataforma Biofuturo, que entre outros aspectos visa atrair a atenção do mundo para o papel dos biocombustíveis de segunda geração na mitigação de mudanças climáticas, assim como para a importância das biorrefinarias, cuja planta industrial integra processos de obtenção de biocombustíveis, produtos químicos, energia elétrica e calor.⁴

O aqui intitulado bioetanol também frequentemente chamado de etanol de segunda geração, etanol obtido utilizando como matéria-prima biomassa vegetal, por exemplo fibras lignocelulósicas, é o mais comum, e um dos biocombustíveis líquidos mais importantes no cenário atual. Acredita-se que o uso desse tipo de combustível possa reduzir em até 85% as emissões de gases estufa, além de poder ser produzido

³<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2016/11/brasil-apresenta-producao-agricola-com-preservacao-ambiental-na-cop-22>

⁴<http://www.unica.com.br/noticia/20030441920316336797/londres-por-cento3A-unica-participa-de-debates-sobre-o-mercado-mundial-de-acucar/>

a partir de uma variedade de substratos de baixo custo, como a biomassa lignocelulósica. (SAINI, 2015).

O presente estudo se insere na área de biorrefinarias que usam a biomassa lignocelulósica como matéria prima.

1.2 Biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica pode ser considerada o material biológico mais abundantemente disponível na Terra, e consiste em recurso renovável que contém fonte de carbono que pode ser convertida em produtos no estado sólido, líquido e na forma de gás (LOOW, 2015). É de particular interesse fornecer precursores e açúcares para conversão em combustíveis. Geralmente é constituída por 40-50% de celulose, 25-30% hemiceluloses e 15-20% lignina, além de outros componentes, representados na **Figura 3** (CHENG, 2015).

Figura 3. Representação esquemática de fibra lignocelulósica e principais componentes.

FONTE: Adaptado de MENG,2014.

1.2.1 Celulose

Principal constituinte de tecidos vegetais, a estrutura da celulose presente em todos os tecidos das plantas é basicamente a mesma, constituída por longas cadeias poliméricas tendo a celobiose como unidade repetitiva, como ilustrado na **Figura 4**.

A celulose é constituída por uma cadeia homopolissacarídica composta por unidades de anidroglicose ligadas por ligações do tipo β -1,4-glicosídicas que formam uma estrutura cristalina devido a extensas ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, que facilitam a sua agregação em fibrilas. Uma unidade de celulose, conhecida como fibra elementar, sofre automontagem para formar microfibrilas, que são reticuladas por matrizes de hemiceluloses formando assim macrofibrilas, estrutura essa que tem como característica a resistência à degradação química e enzimática. O grau de polimerização refere-se ao número de unidades de glicose no polímero, e este parâmetro pode influenciar o efeito da hidrólise enzimática. (BEZERRA, 2016)

A estrutura específica da celulose ajuda na ordenação das cadeias do polímero numa estrutura altamente cristalina e fortemente empacotada, que é insolúvel em água. (SINGH, 2014)

As diferenças nas propriedades de celulose são devidas, principalmente, aos diferentes graus de polimerização e de cristalinidade (FENGEL E WEGENER, 1989; PATURAU, 1989).

Figura 4. Representação das unidades constituintes da celulose

Fonte: Adaptado de KLEMM, 1998.

As microfibrilas de celulose são constituídas por regiões cristalinas e não cristalinas, e a cristalinidade é calculada por meio das quantidades relativas destas duas regiões. A maior parte da celulose disponível (cerca de 2/3 da celulose total) encontra-se na forma cristalina. (TAHERZADEH, 2008)

1.2.2 Hemiceluloses

Hemiceluloses (ou polioses) correspondem cadeias constituídas por unidades de diversos açúcares, não cristalina e com massa molar média relativamente baixa, comparativamente à celulose (JIANG *et al.*, 2014).

As hemiceluloses são formadas por vários carboidratos tais como xilose, arabinose, glucose, manose e galactose, que se ligam não covalentemente a uma ou mais fibrilas de celulose, e são mais fáceis de serem hidrolisados em comparação com a celulose (LOOW, 2016)

Na biomassa lignocelulósica, as hemiceluloses localizam-se nos contornos das microfibrilas da celulose e conferem assim um isolamento das microfibrilas aos ataques biológicos ou químicos. (PENG e SHE, 2014). Em contraste com a celulose, que apresenta alta cristalinidade o que confere rigidez a sua estrutura, as hemiceluloses têm uma estrutura aleatória, não cristalina e ramificada com pouca resistência à hidrólise, e são mais facilmente hidrolisadas (TAHERZADEH, M. J. e KARIMI, K., 2008), conforme já mencionado.

1.2.3 Lignina

Ligninas abrangem uma família de macromoléculas de alta complexidade e ramificação, constituída por segmentos alifáticos e anéis aromáticos. As ligninas são naturalmente sintetizadas por reações combinadas de acoplamento fenólico, induzidas por radicais livres gerados enzimaticamente, através das quais três monômeros reagem com o radical em crescimento (LACERDA, 2012).

A biossíntese de lignina pode ser considerada como uma polimerização de três tipos de unidades de fenilpropano como os monolignóis: álcool p-cumárico, sinapil e coniferil que permite a forma rígida. Estes monolignols podem então dar origem às unidades as estruturas de p-hidroxifenila (H),iringila (S) e guaiacila (G) **(Figura 5)** (BEZERRA, 2016)

Figura 5. Unidades presentes na composição da lignina sendo (1) p-hidroxifenila (2) guaicila (3) siringila.

Qualidades como o alto teor de celulose, bom rendimento por área plantada entre outros, colocam os materiais lignocelulósicos como promissora fonte para produção de combustíveis. A natureza recalcitrante, termo que descreve a resistência à transformações e decomposições dos materiais lignocelulósicos, se coloca como entrave diante de processos como hidrólise e fermentação, caracterizando assim em um desafio ainda não completamente superado para o uso eficaz de componentes dessa biomassa. Sendo assim, um pré-tratamento é muitas vezes necessário para acessar a complexa estrutura da biomassa. Geralmente, os pré-tratamentos podem ser categorizados em três áreas: mecânico, químico e biológico. (Cheng, 2015).

A biomassa lignocelulósica usada no presente estudo foi a fibra de curauá, conforme descrito posteriormente neste texto.

1.3 Pré- tratamento

O primeiro passo para o sucesso da utilização de materiais celulósicos para a produção de biocombustíveis é a eficiência dos métodos de pré-tratamento. O maior desafio consiste na eliminação da lignina, que forma uma parede protetora, tornando

a celulose e as hemiceluloses inacessíveis para outros usos, como produção bem-sucedida de açúcares. Sendo assim, há uma busca constante por condições de pré-tratamento ótimas para a recuperação máxima de açúcares hemicelulósicos solúveis em água para dar prosseguimento a outros passos de bio-conversão, como hidrólise enzimática e fermentação (KHOO, 2015)

O pré-tratamento escolhido para ser realizado nesse trabalho foi o tratamento com solução aquosa alcalina (NaOH), também chamado de mercerização, um dos tratamentos químicos mais utilizados para remoção de lignina (BELTRAMI, 2014).

Embora o mecanismo de cada pré-tratamento seja diferente, o objetivo final é sempre o mesmo - aumento da acessibilidade à celulose. O tratamento alcalino apresenta algumas vantagens tais como: eliminação significativa de lignina, intumescimento das fibras celulose, levando a um aumento da área de superfície interna (MENG, 2014)

A hidrólise alcalina tem por base a saponificação de ligações do tipo ésteres intermoleculares que são responsáveis pela reticulação entre hemiceluloses, xilanas e lignina. Embora muito estudado ao longo dos anos o mecanismo que envolve a degradação da lignina ainda não é totalmente compreendido, e continua sendo um entrave, em partes devido a sua localização interna a parede celular, porém sabe-se que a deslignificação completa não é necessária para que ocorra digestão da biomassa. (SANCHÉZ,2011)

Em contraste com outros pré-tratamentos, o tratamento alcalino em particular é eficiente a baixas pressões, temperaturas e concentração, o que pode culminar na redução de inibidores de fermentação (na etapa posterior à de geração de glicose, de produção de etanol) e apresenta baixo custo, sendo muito utilizado para fins comerciais. Encontrar o método apropriado de pré-tratamento, seguido por hidrólise

ácida ou enzimática e fermentação, é importante para rendimentos elevados na conversão de açúcares em etanol (BEZERRA, 2016).

As melhores condições a serem aplicadas dependem do tipo de biomassa lignocelulósica (TAHERZADEH, 2008).

1.4 Mercerização

O tratamento alcalino é realizado em solução aquosa, de hidróxido de sódio (NaOH). Neste tratamento pode ocorrer o rompimento de ligações hidrogênio envolvendo grupos hidroxila (OH) presentes em cadeias da superfície da estrutura das fibras, o que pode aumentar a rugosidade superficial da mesma. (SGHAIER, 2012). Adicionalmente, ocorre extração de certa quantidade de lignina, além de ceras e óleos que recobrem a superfície externa da parede celular da fibra. Ainda, extrai grande parte de hemiceluloses das fibras, podendo também despolimerizar em alguma extensão a celulose presente nas regiões não cristalinas. (BELTRAMI, 2014).

O mecanismo de ação do tratamento alcalino age na quebra de dois tipos de ligações de éter arílico ($C_{\text{alifático}} - O - C_{\text{aromático}}$) e ($C_{\text{aromático}} - O - C_{\text{aromático}}$) ordenada da menos para mais estável, que correspondem a ligações do tipo α e β de éter arílico. A **Figura 6** mostra alguns exemplos do que pode ocorrer, em consequência da ação do ânion OH^- . (SANCHÉZ, 2011). Este tratamento pode levar a um aumento na área superficial e redução do grau de polimerização dos componentes macromoleculares da biomassa. (LOW, 2016)

Um ponto negativo da deslignificação por meio do tratamento alcalino é seu modo de ação, não completamente seletivo, uma parte dos carboidratos são oxidados

e há produção de ácidos orgânicos tendo como produto uma complexa mistura de subprodutos (SANCHÉZ, 2011)

Figura 6. Reações de degradação da lignina, (a) clivagem da ligação éter arílico, (b) clivagem do grupo CH_2O .

Fonte: Sánchez, 2011.

Este tipo de tratamento também é conhecido por causar intumescimento, que interfere nas ligações hidrogênio intermoleculares. O intumescimento, que corresponde à interação física entre os grupos hidroxila da celulose e agentes químicos, pode ser classificado como intercristalino e intracristalino (LACERDA, 2012). Essas reações que envolvem o ânion hidroxila, podem levar ao rompimento de ligações entre hemiceluloses e outros componentes. Como consequência destes e outros efeitos, pode ocorrer aumento da porosidade de biomassa. (Mood, 2013)

A necessidade de realizar a mercerização como pré-tratamento pode ser explicada por algumas mudanças percebidas no nível estrutural, em decorrência do tratamento alcalino, tais como o melhor acesso a grupos funcionais presentes na estrutura da celulose, como já citado. Este é viabilizado por meio do intumescimento das fibras, que interfere diretamente nas ligações hidrogênio. Dependendo de parâmetros como concentração da solução alcalina, razão massa fibra/volume de solução alcalina, temperatura, tempo de tratamento, pode-se observar aumento da cristalinidade (devido eliminação de frações não cristalinas, iniciando por hemiceluloses e lignina, progredindo para celulose), ou diminuição da cristalinidade (penetração do álcali nas regiões cristalinas da celulose). Fatores como temperatura, tempo de reação e concentração da base utilizada afetam diretamente na extensão das mudanças observadas na estrutura das fibras (LACERDA, 2012)

A fibra lignocelulósica selecionada para o presente estudo foi o curauá, conforme já mencionado.

1.5 Produção de bioetanol

O etanol pode ser obtido via hidratação do etileno, que por sua vez é obtido a partir do petróleo. Esta rota envolve, portanto, matéria prima isolada de fonte não renovável. (PAULA, 2012; LACERDA, 2012).

A conversão de biomassa em bioetanol consiste em várias etapas, incluindo o pré-tratamento da biomassa, hidrólise (enzimática ou ácida), fermentação e recuperação do produto. A combinação adequada de cada etapa é de suma

importância para alcançar maior produtividade de bioetanol de uma forma rentável e sustentável (SAINI, 2015).

Para obtenção de bioetanol, ou *etanol celulósico*, a partir de biomassa celulósica é necessário se obter açúcares fermentescíveis a partir dos polissacarídeos presentes (celulose e hemiceluloses), o que, por sua vez, exige a separação destes da lignina, a qual corresponderá então a um subproduto do processo. A separação da lignina dos polissacarídeos consiste assim em uma das etapas importantes do processo. (PAULA, 2012; LACERDA, 2012). A **Figura 7** ilustra de forma resumida os processos necessários para obtenção de bioetanol.

Figura 7. Processos de produção de bioetanol.

Fonte: Adaptado de (Paulová, 2014)

1.6 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida da celulose envolve a clivagem da ligação 1-4 β -glicosídica, e pode ser descrita conforme esquema mostrado na **Figura 8**.

A **Figura 8** mostra o mecanismo proposto para hidrólise ácida de celulose (FENGEL, 1989).

Figura 8. Mecanismo proposto para hidrólise ácida da celulose

Fonte: FENGEL, 1989.

A hidrólise ácida pode ser dividida em duas categorias, as que utilizam ácido concentrado e as que utilizam ácido diluído. Cabe analisar as vantagens e desvantagens de cada uma a fim de selecionar a mais adequada a cada estudo. O método com soluções diluídas (até 5% v/v) é realizado em altas temperaturas (de 180 a 250°) e apresenta como vantagens o menor custo e tempo de reação e desvantagens como, menor rendimento fruto da maior formação de produtos de decomposição, e alto custo energético.

A hidrólise ácida realizada com soluções concentradas (30% a 70% v/v) e temperatura de no máximo 120°C, apresentando como vantagens o menor custo relacionado a reatores e também a menor formação de produtos de decomposição, porém o pH pode influenciar na fermentação. (DE PAULA, 2009)

1.7 Hidrólise enzimática

A hidrólise das moléculas de celulose também podem ocorrer via catálise enzimática e para que isso ocorra é necessário o contato entre celulose e celulasas. Assim, a área de superfície da biomassa celulósica é um fator crítico para o rendimento e taxa de hidrólise enzimática. A área de superfície do substrato pode ser dividida em área de superfície interna, que é essencialmente representada pela porosidade da biomassa, e área de superfície externa.

Tem sido proposto que a acessibilidade das celulasas à celulose ocorre principalmente através dos poros, na parede celular, em vez de através da superfície externa do substrato, e mais especificamente, aproximadamente 90% da digestibilidade enzimática do substrato corresponderia a contribuições das superfícies de poros acessíveis. (MENG, 2014)

Sendo assim, se a hidrólise de celulose ocorre preferencialmente em sua superfície, a área superficial disponível é fator determinante no rendimento máximo da hidrólise, lembrando que a forte compactação da celulose faz com que o acesso a regiões internas seja dificultado o que aumenta a resistência à degradação desse tipo de material. (ARANTES, 2010)

Sabe-se que durante o processo de hidrólise a porção não cristalina é mais acessível ao ataque enzimático, enquanto a enzima não é tão eficaz na degradação da porção cristalina, menos acessível, devido ao eficiente empacotamento das cadeias. Portanto, espera-se que a celulose altamente cristalina seja mais resistente à hidrólise enzimática e que exista uma relação inversa entre a cristalinidade e a eficácia da hidrólise, sendo a celulose mais cristalina a que apresentaria menor eficiência de conversão á açúcares, outros fatores como a massa molar média

também podem influenciar na conversão de celulose a glicose. (TAHERZADEH, 2008).

1.7.1 Ação das celulasas

As celulasas referem-se a um grupo de enzimas responsáveis pela degradação da celulose, formando assim glicose. A natureza do sistema enzimático utilizado determina o modo de ação das celulasas, fatores como atividade de cada componente enzimático, a ação sinérgica entre os componentes enzimáticos e o efeito inibitório sobre a ação muitas vezes representados pela presença de lignina e/ou produtos de decomposição da glicose, influenciam na eficiência de conversão. (GAN, 2003)

As celulasas são compostas por três classes de enzimas: endoglicanases, exoglicanases e β -glicosidases, que atuam simultaneamente na conversão de celulose em glicose. As endoglicanases, são responsáveis pela diminuição do grau de polimerização da celulose, atuam de maneira aleatória ao longo da cadeia de celulose, são responsáveis pelo início da reação de hidrólise, agindo em estruturas internas e não cristalinas da celulose, produzindo oligossacarídeos e, como consequência, há formação de novos terminais redutores e não redutores nas cadeias.

As exoglicanases são subdivididas em celobiohidrolases e glicohidrolases, e são responsáveis pela hidrólise nas extremidades das cadeias, o que culmina na formação de dímeros de glicose (celobiose). As exoglicanases tornam as regiões cristalinas mais expostas a futuros ataques. As β -glicosidases agem catalisando a hidrólise da celulose a glicose. (NIDETZKY, 1993)

Para que esse complexo sistema enzimático mantenha sua atividade elevada é preciso mantê-lo estável. Durante o processo de hidrólise o acúmulo de moléculas de glicose inibe a ação das β -glicosidases, culminando no aumento das moléculas de celobiose no meio reacional, que por sua vez podem inibir a ação das exoglicanases, diminuindo assim o rendimento da conversão de celobiose a glicose (ZHANG, 2004).

A **Figura 9** mostra reação de conversão de celulose a glicose.

Figura 9. Representação da ação das celulases na conversão de celulose a glicose.

Fonte: adaptado de JUTURU, 2014

No presente estudo, as celulases foram usadas nas reações de hidrólise enzimática das fibras de curauá, mercerizada e não mercerizada

1.8 Curauá

O curauá é da família do abacaxi e seu nome é *Ananas Erectifolius*, sendo encontrado em larga escala na Amazônia. Possui um fruto semelhante ao abacaxi, porém, sua maior aplicação vem de suas folhas eretas (chegam a mais de um metro de altura) e planas (quatro centímetros de largura) (MONTEIRO, 2006), conforme mostrado na **Figura 10**.

Figura 10. Planta de curauá e Fibra de Curauá

Fonte: MONTEIRO, 2006.

Alguns outros estudos e aplicações já são ou foram realizados utilizando o curauá, por exemplo, como agentes de reforço para os plásticos, em compósitos (CASTRO, 2012). Como destaque, pode-se citar a utilização como reforço de biocompósitos a partir de polietileno de alta densidade. Neste, fibras sintéticas comumente usadas, de maior valor agregado, são substituídas por fibras de curauá, de menor valor agregado, promovendo maior rigidez e resistência ao impacto, por exemplo (CASTRO, 2012).

Um hectare de plantação de curauá comporta cerca de dez mil plantas e cada planta produz de cinquenta a sessenta folhas por ano (SATYANARAYAMA, 2007). É

encontrada em regiões de grande pluviosidade (mínimo de 2000 mm/ano), condição essencial para o cultivo da planta (TRINDADE, 2005).

Com quantidades de celulose em torno de 70%, o curauá pode ser destacado como matéria-prima alternativa para futura produção de bioetanol, podendo fornecer alto teor de glicose via sacarificação, como consequência de seu alto teor de celulose, cuja hidrólise fornece glicose. (CASTRO, 2010)

Até onde se tenha conhecimento, a abordagem realizada neste estudo é inédita.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de sacarificação, via hidrólises ácidas e enzimática da fibra de curauá, biomassa produzida no país.

2.2 Objetivos específicos

- Aprofundar estudos de pré-tratamento via mercerização da fibra lignocelulósica de curauá com o intuito de aumentar a acessibilidade às cadeias de celulose, visando maiores rendimentos nos processos de hidrólise.
- Investigar hidrólises sob catálise ácida e enzimática com a fibra pré-tratada e não tratada.
- Caracterizar os licores gerados durante as reações, visando quantificação dos açúcares formados a partir da hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica.
- Caracterizar frações sólidas, não reagidas, geradas durante as hidrólises ácida e enzimática.

3 Materiais e Métodos

As fibras de curauá utilizadas nesse projeto foram gentilmente cedidas por Pematec Triangel do Brasil Ltda (São Paulo-SP)

3.1 Preparo de amostra

As fibras de curauá foram moídas em moinho de facas, (Marconi, MA048) e secas em estufa de circulação de ar a 105°C, até obter massa constante.

3.2 Pré-tratamento com solução alcalina - Mercerização

Para o processo de pré-tratamento via mercerização, utilizou-se a proporção de 20g de amostra, já previamente moídas e secas, por litro de solução de hidróxido de sódio a 20%, a temperatura ambiente. As fibras foram mantidas sob agitação mecânica por um período de 5h. Estas condições foram selecionadas baseando-se em trabalhos anteriores (LACERDA, 2012). Durante o processo foram retiradas alíquotas, respeitando os seguintes intervalos de tempo: durante a primeira hora foram retiradas alíquotas de 15 em 15 min, e durante o restante do tempo a cada 30 min.

O material celulósico obtido foi filtrado e lavado até pH igual ao da água de partida utilizada para as lavagens, e então seco em estufa de circulação de ar a 105°C por 4h. Pesou-se então a massa final de material celulósico resultante do processo de mercerização.

Todas as caracterizações a seguir foram realizadas em triplicata.

3.3 Teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade, foi utilizada a norma ABNT (NBR9656).

Pesou-se 1g de amostra previamente moída e seca, a qual permaneceu por 15 dias armazenada em placa de petri, a fim de absorver a umidade do ambiente. Posteriormente, 1g dessa amostra foi colocada em estufa de circulação de ar a 105°C por 4h, sendo então a amostra novamente pesada. O teor de umidade foi calculado por diferença de massa.

3.4 Teor de cinzas

Para determinação do teor de cinzas, o procedimento foi realizado de acordo com a norma TAPPI 413 om-02 (adaptada) (ASH, 2002)

Pesou-se 1g de amostra, previamente seca e moída, as quais foram levadas a mufla, respeitando a seguinte rampa de aquecimento: temperatura de 105°C por 10 min, 325°C e posteriormente a 525°C, ambas por 60 min, e finalmente 900°C, mantida por um período de 4h. As amostras foram retiradas a uma temperatura de 120°C e resfriadas em dessecador até que atingissem massa constante. As amostras foram pesadas, calculando-se então a porcentagem de cinzas.

3.5 Teor de Lignina Klason (insolúvel)

A determinação de lignina Klason insolúvel foi realizada segundo a norma TAPPI T222 om-22 (2002c). Utilizou-se 1g de amostra moída e seca, a qual foi colocada em um erlenmeyer de 250mL, adicionou-se 15mL de ácido sulfúrico 72% (v/v), mantendo sob agitação constante por 2h. Depois, transferiu-se todo o conteúdo para um balão de 1000mL, adicionou-se 560mL de água (nesta etapa o ácido sulfúrico passa a ter concentração igual a 3%). A amostra foi então aquecida em manta de aquecimento, a qual permaneceu em refluxo e aquecimento por 4h contadas a partir do início da fervura. Ao término, deixou-se que a temperatura da mistura se igualasse a

temperatura ambiente. Finalmente realizou-se a filtração a vácuo, utilizando funil sinterizado, coletando-se uma alíquota da fração líquida para a determinação da lignina solúvel. O funil contendo a amostra de lignina insolúvel foi seco em estufa de circulação de ar a 105°C até massa constante o qual foi posteriormente pesado de onde obteve-se a massa de lignina insolúvel presente na amostra.

3.6 Teor de Lignina Klason (Solúvel)

A porção de lignina solubilizada em meio ácido foi quantificada por meio da espectroscopia na região ultravioleta-visível (UV-Vis) seguindo o método de Goldschimid (1971). Preparou-se uma solução de H₂SO₄ a 3 % (v/v) a qual foi utilizada como referência, (reproduzindo o meio no qual a alíquota referente ao ensaio de lignina insolúvel foi retirada) e também para realizar as diluições do filtrado. Utilizou-se a proporção de 1:6 de filtrado para solução ácida. Realizou-se medidas de absorbância do filtrado nos comprimentos de onde de 215 e 280nm e em seguida calculou-se a concentração de lignina em g.L⁻¹ usando a Equação 1: (Goldschimid, 1971).

$$C \text{ (g.L}^{-1}\text{)} = [(4,53 (A_{215} - A_{280}))]/300 \quad \text{Equação 1}$$

Sendo C = concentração de lignina klason solúvel;

A_{215} = Absorbância em 215nm

A_{280} = Absorbância em 280nm

Como a amostra inicial tinha um volume de 575mL, provenientes do procedimento de análise da lignina Klason insolúvel (560mL+ 15mL), multiplicou-se a concentração de lignina solúvel obtida por 0,575 L, e pelo fator de diluição. Utilizou-se 1 parte de

amostra para 6 partes da solução de ácido sulfúrico a 3%, que resulta em um fator de diluição de 7, e obteve-se então a massa de lignina solúvel na amostra seca e sem extrativos.

3.7 Teor de holocelulose

O teor de holocelulose (hemiceluloses + celulose) foi obtido como descrito na norma TAPPI T19-54 (adaptada para fibras lignocelulósicas). A reação é caracterizada pela eliminação de lignina pela adição de clorito de sódio em meio ácido (usando ácido acético glacial). Este procedimento foi realizado em 3 adições (2,5g hipoclorito de sódio e 1mL de ácido acético) em intervalos de 1h, mantendo-se a reação a temperatura constante de 70°C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas a 10°C filtradas e lavadas em funil de vidro sinterizado, até que o pH fosse igual ao da água de partida utilizada para lavagem. Em seguida, lavou-se as amostras com 3 porções de metanol (15mL), e finalmente as amostras foram secas a 105 °C em estufa de circulação de ar até massa constante.

3.8 Teor de α -celulose

O teor de α -celulose foi determinado seguindo a norma TAPPI T19-m-54 usando as amostras de holocelulose obtidas (hemicelulose + α -celulose), previamente secas em estufa a 105°C. Colocou-se 1 g de holocelulose em um almofariz, adicionou-se 10mL de uma solução de hidróxido de sódio 17,5%, deixou-se em repouso por 2 min e triturou-se por 8 min. Adicionou-se mais 10mL de hidróxido de sódio a 17,5% e deixou-se em repouso por mais 20 min. Após esse procedimento, adicionou-se 40mL

de água destilada e filtrou-se a mistura à vácuo, utilizando funil sinterizado, sendo o material retido no funil lavado com 200mL de ácido acético diluído (20%), e depois com 200mL de água destilada. A amostra foi seca até massa constante em estufa a 105°C, e o resultado buscado correspondeu à diferença entre a massa de celulose e holocelulose da fibra.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura

MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) permite avaliação da morfologia da superfície e do interior da fibra. As amostras não apresentam propriedades condutoras, sendo necessário fazer o recobrimento com fina camada de ouro e carbono para que fosse possível obter imagens via MEV. Para esta análise foi utilizado o equipamento LEO-440, com filamento de tungstênio responsável pela geração de elétrons.

3.10 Índice de cristalinidade

Para a determinação do índice de cristalinidade foi utilizado um Difratorômetro Universal de raios X modelo URD-6, CARL ZEISS JENA, a potência 40 kV/20 mA e $\lambda(\text{CuK}\alpha) = 1,5406\text{\AA}$. O Índice de Cristalinidade (I_c) foi avaliado por difração de raios X. Pelo Difratoograma de raios X da fibra é possível observar a presença de picos característicos da celulose, que confere cristalinidade à fibra, referente aos planos cristalográficos, ângulos de Bragg (2θ). O índice de cristalinidade é calculado utilizando-se a equação descrita por BUSCHLE-DILLER e ZERONIAN (1992):

$$I_c = 1 - \left(\frac{I_1}{I_2} \right) \quad \text{Equação 2}$$

Sendo: I_c = índice de cristalinidade;

I_1 = intensidade do mínimo de difração (2θ em torno de 18°);

I_2 = intensidade do máximo de difração (2θ em torno de 22°).

3.11 Comprimento e espessura médio das fibras (MorFi)

A variação do comprimento e espessura das fibras de partida e alíquotas extraídas durante os processos de mercerização e hidrólise, foram acompanhadas utilizando o equipamento MorFi Compact da marca Techpap, que realiza a medição das dimensões das fibras em ambiente fechado e não necessita de pré-preparo de amostra, já que as mesmas são analisadas suspensas em água. Os mapas de densidade gerados a partir dos dados obtidos são formados por 3 eixos, sendo os eixos x, y e z compostos respectivamente por comprimento médio, espessura média e densidade de ocorrência das fibras.

3.12 Hidrólise ácida

Inicialmente, foram usadas condições que levaram a melhores rendimentos de glicose para polpa de sisal em trabalhos prévios, como concentrações de ácido sulfúrico de $4,6 \text{ mol.L}^{-1}$, em 1L de solução, e quantidade de fibra lignocelulósica da ordem de 30g, obtendo-se uma proporção de 1:30 (g.L^{-1}) (LACERDA, 2012), utilizando temperatura 80°C (estudos anteriores demonstraram que acima dessa faixa observa-se decomposição da glicose). Realizou-se o processo de hidrólise utilizando 6h como tempo reacional (DE PAULA, 2009), visando comparar o comportamento da polpa de curauá com a de sisal.

No presente trabalho, para fins comparativos foram usadas condições que levaram a melhores rendimentos de glicose para polpa de sisal, ou seja,

concentrações de ácido sulfúrico da ordem 24% (v/v), 80°C (pois acima desta ocorreu favorecimento da decomposição de glicose) (LACERDA, 2012), 6 horas como tempo reacional. Para realizar a hidrólise ácida utilizou-se um reator com algumas características específicas como mostrado na **Figura 11**.

Figura 11. Reator encamisado “A”; banho termostatizado “B”; rotor de agitação mecânica “C”; condensador “D”; sistema para retirada de alíquotas “E” (LACERDA, 2012).

O reator é de aço inoxidável e foi especialmente fabricado para este fim, com revestimentos interno anticorrosivo, com algumas partes totalmente feitas de politetrafluoretileno (teflon). O reator apresenta três litros de capacidade, é encamisado e acoplado a um banho termostatizado.

3.13 Hidrólise enzimática

Os parâmetros utilizados na hidrólise enzimática tomaram como base estudos anteriores realizados por LACERDA, 2012 e KASCHUK, 2014. A hidrólise foi realizada com as fibras não tratadas e tratadas, que foram secas a estufa de circulação de ar a 105°C até massa constante. Para cumprir seu propósito de produção de açúcares fermentescíveis utilizou-se o complexo enzimático Accellerase 1500 de *Trichoderma*

reesi (Genencor), que de acordo com o fabricante possui em sua composição exoglucanases, endoglucanases, β -glicosidases e hemicelulases, tendo como melhor estabilidade operacional a faixa de 50° e 65° C, com pH variando entre 4,0 e 5,0.

As reações de hidrólise enzimática foram realizadas em frascos de 250 mL (Shott), utilizando a proporção de 1g de polpa celulósica para 50 mL de tampão de citrato 0,01 mol. L⁻¹, concentração esta que proporciona um pH 5, seguindo esta proporção a reação foi realizada com 150mL em cada frasco.

A suspensão (fibra lignocelulósica e tampão) foi previamente esterilizada em autoclave (Marconi) (121°C, 20 min) (LACERDA, 2012) e mantida a 50°C em uma câmara incubadora com agitação orbital (Marconi MA410) por 12h. Depois de estabilizada a temperatura, foi adicionada ao sistema as enzimas, o qual foi utilizado 0,5 ml do complexo enzimático para cada 1g de fibra.

As reações, foram monitoradas por 48h, em que foram retiradas alíquotas de 10mL com o auxílio de pipeta sorológica estéril, 10min em 10min nos primeiros 30min de reação, e depois de 30min em 30min até que a reação completasse um total de 6h. Nas 3h seguintes foram retiradas alíquotas de 1h em 1h, depois de 2h em 2h nas próximas 6h e, por fim, de 8h em 8h até completar o tempo de 48h de reação. As reações foram realizadas em duplicata e repetidas por duas vezes.

Todas as alíquotas foram filtradas, separando o licor da polpa celulósica não reagida. A polpa não reagida foi lavada com água destilada, seca a 105°C e caracterizada em relação a Microscopia eletrônica de varredura, comprimento e espessura médio das fibras, índice de cristalinidade e análises de licores via cromatografia líquida de alta eficiência.

3.14 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os licores extraídos do meio durante a reação de hidrólise foram caracterizados quanto aos teores de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e produtos de decomposição dos açúcares, como Furfural e Hidroximetilfurfural (hidrólise ácida) via CLAE em cromatógrafo na marca SHIMADZU, conforme parâmetros a seguir

Para análises de açúcares, as alíquotas retiradas durante a reação de hidrólise ácida foram diluídas 20x e submetidas a filtragem utilizando filtros SEP PAK C₁₈ (Waters), a fim de reter as partículas em suspensão, os quais foram ativados com etanol PA e lavados 2x com água Mili-Q. Posteriormente foram filtradas 2x utilizando filtros CHROMAFIL PVDF – 45/14 de 0,45 µm da marca MACHEREY-NAGEL.

O detector utilizado foi o índice de refração (RID-20^a SHIMADZU), coluna Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm BIO RAD), bomba (LC 20A) com pressão variando entre 75 e 90 kgfcm². Utilizou-se como eluente a solução de H₂SO₄ a 0,005 mol.L⁻¹ sob o fluxo de 0,6 mL.L⁻¹, manteve-se a temperatura do forno(CTO-10A SHIMADZU) a 45°C

Para as análises de Furfural e Hidroximetilfurfural as alíquotas retiradas durante a reação de hidrólise ácida foram diluídas 10x e submetidas a filtragem utilizando mesmo filtro utilizado para análise de açúcares.

Utilizou-se o detector de UV-VIS (SPD -10AV – SHIMADZU) com comprimento de onda fixo em 274nm, coluna µBondapakTM C₁₈ (Waters), bomba (LC 20A) com pressão variando entre 80 e 90 kgfcm². Utilizou-se como eluente solução de acetonitrila/água Mili-Q na proporção de 1:8 (v/v) contendo 1% (v/v) de ácido acético glacial sob o fluxo de 0,8 mL.L⁻¹, a temperatura do forno foi mantida a 30°C.

A composição dos hidrolisados (glicose, xilose, arabinose, furfural e hidroximetilfurfural) foi identificada por meio de comparações com injeções dos

respectivos padrões de grau de pureza cromatográficos e quantificados calculando-se a área dos picos do cromatograma.

Os reagentes utilizados na análise dos hidrolisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: ácido sulfúrico (H_2SO_4 , Merck Chemicals), acetonitrila (Tedia) e ácido acético glacial (Merck Chemicals). Os padrões utilizados foram celobiose, D-glicose (Sigma-Aldrich), 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. (GURGEL, 2010)

4 Resultados e Discussão

4.1 Caracterização da fibra de partida

A fibra de curauá, como todo material lignocelulósico, é composta majoritariamente por celulose, hemiceluloses e lignina, entre outros componentes que se encontram em menores quantidades (CASTRO, 2012). A fibra de partida foi caracterizada quanto ao seu teor de umidade, cinzas, holocelulose (hemiceluloses + celulose), α -celulose (celulose pura), hemiceluloses e lignina. A Tabela 1 relaciona os valores médios desses componentes.

Tabela 1. Propriedades da fibra de curauá

Composição (%)	
Teor de umidade	8,5 $\pm$ 0,2
Cinzas	2,0 $\pm$ 0,1
Hemiceluloses	15,5 $\pm$ 0,2
Holocelulose	85,9 $\pm$ 0,7
α celulose	70,4 $\pm$ 0,2
Lignina Insolúvel	7,3 $\pm$ 0,2
Lignina solúvel	2,1 $\pm$ 0,1
Lignina total	9,4 $\pm$ 0,3

O teor de umidade obtido foi de 8,5% $\pm$ 0,2 e o de cinzas obtido foi de 2,0% $\pm$ 0,1, que se aproximam daqueles reportados em trabalhos anteriores (8,0% $\pm$ 0,2 para umidade e 0,5% $\pm$ 0,1 para cinzas para fibra de curauá) (CASTRO, 2012), ressaltando que fibras de mesma origem, mas diferentes lotes, podem apresentar diferenças em sua composição conforme condições de cultivo a que as plantas foram submetidas (CASTRO, 2012).

O teor de holocelulose obtido para a fibra de curauá foi de $85,9 \pm 0,7\%$. O teor obtido para α -celulose foi de $70,4 \pm 0,2\%$ e o teor de hemiceluloses para a fibra não tratada foi de $15,5 \pm 0,2\%$. Comparado a trabalhos anteriores os resultados obtidos estão bem próximos diferindo apenas no teor de hemiceluloses obtido, maior que no trabalho anterior ($9,9\% \pm 1,2$) (TRINDADE, 2008).

O teor de lignina insolúvel obtido para fibra de partida foi de $7,3 \pm 0,2\%$ e o de lignina solúvel foi de $2,1 \pm 0,1\%$ somando um total de $9,4 \pm 0,3\%$ de lignina. Os teores de lignina apresentaram discrepância se comparadas a análises anteriores reportadas ($4,7\% \pm 0,1$ para lignina insolúvel, $0,05\% \pm 0,02$ para lignina solúvel totalizando $5,2\% \pm 0,1$ de lignina total). Cabe ressaltar que os resultados obtidos podem diferir de trabalhos anteriores pelo uso de lotes diferentes de curauá, submetidos à diferentes a diferentes condições de cultivo (CASTRO, 2012).

4.2 Caracterização das alíquotas retiradas durante o tratamento de mercerização

Durante o pré-tratamento com solução aquosa alcalina, alíquotas foram retiradas e caracterizadas, conforme descrito a seguir.

4.2.1 Teor de lignina

O teor de lignina insolúvel obtido para fibra de partida foi de $7,3 \pm 0,2\%$. (Tabela 1). A **Figura 12** mostra a variação dos valores obtidos para teores de lignina Klason insolúvel, solúvel e total, durante a mercerização.

Figura 12. Variação do teor de lignina Klason insolúvel, solúvel e total em função do tempo de mercerização.

Os teores de lignina insolúvel apresentaram queda acentuada em relação a fibra de partida já na primeira alíquota extraída durante mercerização, que corresponde a 15 min, totalizando mais de 45% de diminuição do teor de lignina. O teor de lignina ainda varia após 15 min, mas de forma mais suave, chegando a cerca de 65% de variação no teor de lignina a 150 min, e 270 min (**Figura 12**). Analisando os valores, e considerando a margem de erro, embora os teores de lignina indiquem que houve extração da mesma durante a mercerização, não houve eficácia total no processo extrativo. O teor de lignina solúvel para a fibra de partida foi de 2,1%. As alíquotas retiradas durante o tratamento alcalino apresentaram mais acentuada queda após 15 min de reação o ($0,7 \pm 0,0\%$), e no decorrer do pré-tratamento os teores não apresentaram grande variação, permanecendo em torno de $0,4 \pm 0,1\%$. (**Figura 12**)

4.2.2 Teor de Holocelulose

A **Figura 13** mostra a variação no teor de holocelulose das fibras durante o tratamento alcalino.

Figura 13. Variação do teor de holocelulose em função do tempo de mercerização

A fibra de partida apresentou teor de holocelulose de $85,9\% \pm 0,7$ (Tabela 1), e as alíquotas retiradas durante a mercerização apresentaram teores superiores a $92,0\% \pm 0,7$ de holocelulose. O aumento no teor de holocelulose (celulose + hemiceluloses), **Figura 13**, foi decorrente da extração de lignina.

Observa-se que já no início (15 min) a extração de lignina foi significativa, não variando muito até o final (5h) (Figura 12) Os erros aproximam muitos valores relacionados ao intervalo 15min - 5h. Somente a título de comparação, considerando o valor obtido após 5h de mercerização ($94,5 \pm 0,7\%$), **Figura 13**, se tem um acréscimo de 8,6% no teor de holoceluloses, comparativamente ao teor da fibra de partida ($85,9 \pm 0,7\%$) Levando em conta os erros, assim como que o teor de lignina da fibra de partida

foi determinado como sendo $9,4 \pm 0,3\%$. O acréscimo detectado no teor de holocelulose (celulose + hemicelulose) indicaria que a lignina foi extraída em maior proporção que o detectado, o que pode ser atribuído a extração de outros componentes minoritários (como ceras).

4.2.3 Teor de α -celulose

O teor de α celulose obtido para a fibra de partida foi de $70,4 \pm 0,2\%$. Nota-se que no decorrer da reação há um aumento de até 16% no teor de α -celulose, chegando a um máximo de $86,4 \pm 0,2\%$ aos 270 min. de pré-tratamento. As variações dos teores de celulose obtidos ao longo da mercerização são mostradas na **Figura 14**.

Figura 14. Variação do teor de α -celulose (erros de $\pm 0,1$, não perceptíveis) em função do tempo de mercerização

O teor de α -celulose apresentou acréscimo após retirada a primeira alíquota durante o pré-tratamento (**Figura 14**), mas na sequência não ocorreram alterações significativas. O aumento no teor de α -celulose é devido a eliminação parcial de lignina, e também de hemiceluloses, que ocorreram devido ao pré-tratamento alcalino.

Cabe ressaltar que os erros relativos a estas análises são muito baixos ($\pm 0,1$) e, não são mostrados no gráfico por não serem perceptíveis.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura- Mercerização

As fibras não reagidas isoladas durante o tratamento alcalino, mercerização, foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (**Figura 15**).

Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura para fibra de partida e alíquotas retiradas durante o pré-tratamento de mercerização.

Nota-se que com o aumento do tempo de tratamento as superfícies apresentaram certa rugosidade e maior quantidade de fragmentos aderidos, visto mais nitidamente na microscopia correspondente a alíquota retirada após 180 min. de tratamento alcalino. Estas imagens mostram que, mesmo não ocorrendo variação significativa no teor de lignina, quando se compara tempos iniciais, como 15 min, com tempos finais da mercerização, o álcali continua interagindo com a fibra, afastando os feixes que constituem as mesmas, o que pode influenciar a etapa seguinte à mercerização, ou seja, de hidrólise.

4.4 Índice de cristalinidade

É possível observar na **Figura 16** um difratograma da fibra de curauá que é semelhante aos de outros materiais lignocelulósicos. Destaca-se que a celulose é o componente da fibra lignocelulósica que confere cristalinidade à mesma. Nota-se a presença de picos característicos referentes aos planos cristalográficos dos retículos cristalinos presentes nesse tipo de material. A região entre 18 e 19° correspondente ao I_1 refere-se a parte não cristalina da celulose, já a região entre 22 e 23° correspondente ao I_2 refere-se a parte cristalina da celulose. (KASCHUK, 2014)

Figura 16. Difratograma Fibra de curauá não tratada

O índice de cristalinidade foi calculado utilizando-se a **equação 1** (Experimental)

A análise de difração de raios-x forneceu valores de índices de cristalinidade da fibra de partida e também das alíquotas retiradas durante mercerização. A **Figura 17** mostra a variação desses índices para a fibra de partida e alíquotas retiradas durante

a mercerização. Devido ao alto número de análises, e às características inerentes à Difração de raios X, as análises não foram realizadas em duplicatas. Assim, não é possível diferenciar com precisão os valores obtidos, mas sim avaliar tendências.

Figura 17. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo de reação durante a mercerização.

O índice de cristalinidade encontrado para fibra de partida foi de 69%. Durante a mercerização, já desde as primeiras alíquotas retiradas do meio, variou de aproximadamente 75% a 79%, indicando que desde os estágios iniciais do tratamento já se observa um significativo aumento na cristalinidade da fibra.

A extração de lignina, não cristalina, leva a um aumento no teor de regiões cristalinas presentes no material como um todo. Ainda, o álcali pode reagir com as hemiceluloses presentes na região não cristalina, ocorrendo a hidrólise parcial dessas moléculas que tem como produto açúcares que se dissolvem no meio. Isto faz com que a cristalinidade aumente, pois, regiões não cristalinas são eliminadas. Em etapas avançadas, o álcali pode iniciar a penetração nas regiões cristalinas, perturbando a

ordem existente, o que pode justificar a tendência observada frente à diminuição de cristalinidade a partir de 200 min, quando a região cristalina é atingida, o que explicaria a tendência frente a diminuição do índice de cristalinidade ao término da reação. É importante ressaltar que o comportamento do índice de cristalinidade no decorrer da reação sobre aumentos e diminuições que também podem ser explicados pela eliminação de fração da lignina nos primeiros minutos seguidas pelas eliminações de hemiceluloses e celulosas, esta última em especial que ocasiona a diminuição mais acentuada da cristalinidade a partir de 240min.

4.5 Comprimento e espessura médio (MorFi)

Os mapas presentes na **Figura 18** mostram a variação do comprimento e espessura das fibras durante o processo de mercerização.

Figura 18. Mapas de densidade referente ao comprimento e espessura das fibras celulósicas durante tratamento de mercerização.

Os mapas de densidade obtidos por meio das análises de MorFi dão uma estimativa do tamanho e espessura das fibras contidas nas amostras. Ao longo do pré-tratamento, nota-se que a concentração de fibra com menor comprimento e espessura apresenta leve aumento, após 15 min a maioria das fibras apresenta comprimento entre [129-215] μm e espessura entre [11-14] e [18-23] μm , porém a porção de fibras que ainda possuem comprimento e espessura semelhantes ao da

fibra não mercerizada ainda é evidente. Tal fato se deve a heterogeneidade da distribuição do tamanho das fibras, pois mesmo após decorridas 5h de reação a amostra ainda apresentava fibras de diversos tamanhos.

Nota-se ainda que o comprimento das fibras sofre pequena diminuição atingindo a faixa de [46-77] μm após 30 min, e apresenta leve aumento até os 180 min de reação, em que o comprimento não mais apresenta mudanças significativas. A espessura das fibras apresenta comportamento análogo sofrendo alteração até atingir os 150 min de reação, onde alcança espessura na faixa de [11-14] μm , a maior obtida pelas análises. Os resultados obtidos foram usados para construir um gráfico de barras, em que outros detalhes podem ser observados.

Figura 19. Gráfico de barras para a espessura das fibras durante o processo de mercerização.

Observou-se por meio da construção de gráficos de barras para a espessura das fibras durante a mercerização (**Figura 19**) que após 15 min de reação nota-se grande variação apresentando maior acumulo de fibras com espessuras na faixa de [14-18] μm e considerável diminuição de fibras com espessura maiores que o intervalo [39-50] μm e maiores que 50 μm . Decorrida uma hora de reação a espessura das fibras

apresenta padrão semelhante ao obtido para alíquota referente a 15 min. Decorridas 2h de reação observou-se um padrão diferente de distribuição da espessura das fibras que se concentram na faixa referentes a espessuras maiores que 30 μm , esse padrão é repetido até o final da reação, após 5h, e pode ser explicado pelo fenômeno de intumescimento das fibras em suspensão no meio aquoso, que ocorre de maneira mais abrangente a partir de 2h de reação.

Figura 20. Gráfico de barras para comprimento das fibras durante o processo de mercerização.

Diferentemente dos valores obtidos para a espessura das fibras, o comprimento mostrou uma variação mais uniforme ao longo da reação (**Figura 20**) apresentando pequena diminuição do comprimento das fibras após 2h de reação que se manteve praticamente inalterado após 5h de reação, apresentando maior acúmulo de fibras com comprimentos no intervalo de [77-129] μm .

De posse dos dados obtidos na caracterização da fibra de partida e também das alíquotas extraídas durante o processo de mercerização, selecionou-se a alíquota referente a 120 min de reação para realizar a hidrólise ácida. Após decorridos 120 min

de reação o teor de lignina é de $2,6 \pm 0,2\%$ e o teor de holocelulose de $95,2 \pm 0,7\%$ que se encontram em faixas de menor teor de lignina e maior teor de holocelulose, se comparadas a fibra de partida. Adicionalmente, após o pré-tratamento nestas condições, a fibra apresentou índice de cristalinidade menor que as demais alíquotas. Assim, o tempo de mercerização de 120 min foi selecionada para pré-tratar a fibra que posteriormente seria submetida à hidrólise.

4.6 Rendimento da mercerização

O rendimento do procedimento de pré-tratamento, (decorridas 5h) mercerização, foi de $65\% \pm 2,0$, ou seja, a massa resultante correspondeu a 65% da massa de partida utilizada para realizar o procedimento. Esta significativa variação de massa devido ao pré-tratamento pode ser decorrente do tempo de lavagem das amostras, que foi alto neste experimento, o que fez com que as amostras tivessem maior tempo de permanência no meio alcalino (pH em torno de 13). Nestas condições, pode continuar a ocorrer extração e degradação a açúcares solúveis de parte das hemiceluloses, e até mesmo de celulose, além de lignina, durante a etapa de lavagem para eliminação do álcali, o que impacta a massa obtida no final do pré-tratamento. Repetiu-se o experimento, diminuindo o tempo entre uma etapa de lavagem e outra, a fim de se obter um maior rendimento do processo e o rendimento atingiu 78%, ou seja, a diminuição na massa foi de 22%, confirmando que no primeiro experimento ocorreu degradação de hemiceluloses, e mesmo de celulose, na etapa de lavagem das fibras para eliminação do álcali

Destaca-se que os resultados apresentados para as fibras retiradas do meio durante a mercerização não seriam influenciados pelas condições da etapa de

lavagem, pois correspondem a alíquotas retiradas antes desta, ainda durante o pré-tratamento.

4.7 Hidrólise ácida com a fibra não tratada

A reação de hidrólise ácida foi realizada seguindo os parâmetros já mencionados (item 2.12). Utilizou-se solução de ácido sulfúrico com concentração de 24% na proporção de 30g de fibra moída e seca para 1 litro de solução. O tempo reacional foi de 360 min. O procedimento foi inteiramente realizado em reator apropriado às condições da reação.

Durante a reação, alíquotas foram retiradas a cada 10 min nos primeiros 30 min de reação, depois desse período, a cada 30 min. O licor foi separado da polpa não reagida, sendo esta última caracterizada quanto à, cristalinidade, distribuição, tamanho e espessura de fibras seguindo procedimentos descritos nos itens **2.10** e **2.11** a fim de acompanhar como estes parâmetros variaram durante a hidrólise.

O licor foi caracterizado quanto ao teor de glicose, usando cromatografia líquida de alta eficiência.

4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura – Hidrólise ácida da fibra não tratada

As mudanças na superfície das fibras retiradas durante a hidrólise ácida (24%, 6 horas) são apresentadas na **Figura 21**, sendo que as imagens foram obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura. As figuras estão organizadas na ordem em que foram retiradas as alíquotas durante a reação.

Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise ácida da fibra não tratada

As três primeiras alíquotas foram retiradas nos 30 primeiros min de reação e não apresentaram diferenças significativas quanto a espessura e tamanho das fibras. Já as demais alíquotas retiradas em intervalos de 30 min apresentaram, de maneira gradativa maior fragmentação das fibras, sendo considerável a diferença de tamanho dos fragmentos se comparadas às alíquotas referentes a 60 min de reação e a alíquota final que corresponde a 360 min de reação. Também é possível notar que as fibras não apresentaram padrão quanto ao tamanho. Observa-se na imagem referente a 360 min de reação que ainda há fibras de maior comprimento e espessura.

4.7.2 Índice de cristalinidade

A **Figura 22** mostra a variação dos índices de cristalinidade para as alíquotas retiradas durante processo de hidrólise ácida realizada com a fibra de partida.

Figura 22. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo durante reação de hidrólise ácida.

Observa-se no início um aumento na cristalinidade, chegando a aproximadamente 77% após 90 min de reação, o que indica que regiões não cristalinas foram hidrolisadas até este ponto da reação. A posterior queda nos índices,

atingindo o valor de aproximadamente 73% indica que a hidrólise abrangeu frações cristalinas da celulose. (LACERDA, 2012)

4.7.3 Comprimento e espessura médio (MorFi)

Os mapas (**Figura 23**) mostram a variação de comprimento e espessura das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizada com a fibra de partida.

Figura 23. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise ácida da fibra não tratada.

Logo após 10 min de reação, retirada a primeira alíquota, é possível notar que o comprimento das fibras tem diminuição considerável apresentando maior densidade de fibras entre os comprimentos de [46-77] μm e [129-215] μm e apresentam também fibras com espessura predominantemente entre [11-14] μm e [18-23] μm .

Decorridos 30 min o comprimento das fibras não apresentou alterações significativas. Já com relação à espessura se observou maior acúmulo de fibras entre [6-8] μm e [11-14] μm . A distribuição de comprimento das fibras se mantém semelhante ao longo da reação, apresentando valores entre [46-77] μm e [129-215] μm .

Ao se aproximar do final da hidrólise, após 300 min., as fibras apresentam diminuição em sua espessura demonstrada por um maior acúmulo de fibras nas faixas

de [6-8] μm , porém ainda há grande acúmulo nas faixas entre [18-23] μm e [30-39] μm . Decorridos 360 min. de hidrólise fibras com espessura maiores que [30-39] μm apresentam densidades bem baixas. Os dados foram usados para construir gráficos de barras, mostrados a seguir.

Figura 24. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra não tratada.

Na primeira hora de reação não foram observadas alterações significativas quanto a espessura das fibras (**Figura 24**), mantendo maior proporção nas regiões superiores a 23 μm . Após 2 horas as fibras apresentaram distribuição mais uniforme nos intervalos de espessura analisados. Nota-se grande diferença após 6h de reação, pois a espessura das fibras apresenta elevada diminuição se concentrando no intervalo entre [5-6] μm e [14-18] μm .

Figura 25. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra não tratada.

Ao longo da reação a distribuição dos comprimentos (**Figura 25**) das fibras se manteve semelhante apresentando predominância no intervalo de [77-129]μm com aumento ao longo do tempo da densidade de fibras nesta de comprimento.

4.8 Hidrólise ácida com a fibra tratada

A alíquota da mercerização selecionada para realização das hidrólises, foi a de 2h que apresentou as seguintes características: teor de holocelulose 95,2%, hemiceluloses 13,2% ($\pm 0,2$), α -celulose 81,6% ($\pm 0,2$), lignina total 3,2% ($\pm 0,3$) e índice de cristalinidade (Ic) 75,5%. Esta alíquota foi selecionada devido ao acréscimo de celulose em comparação com a fibra não mercerizada que apresentava 70,4% ($\pm 0,2$) de α -celulose e quantidade de lignina bem abaixo da inicial de 9,4% ($\pm 0,3$)

4.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A **Figura 26** mostra a variação morfológica das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizada com a polpa já mercerizada.

Figura 26. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise ácida da fibra mercerizada.

As micrografias mostram que nos primeiros 30 min de reação as fibras ainda preservam características semelhantes ao da fibra de partida (**Figura 15**), porém com diminuição em seu comprimento e espessura. A partir da primeira hora de hidrólise há junção de feixes de fibras culminando em uma maior fragmentação e compactação das fibras formando aglomerados que tendem a aumentar no decorrer da reação, o que pode indicar que o processo de mercerização leva a uma maior facilidade para penetração da solução ácida nas cadeias de celulose.

4.8.2 Índice de cristalinidade

A **Figura 27** mostra os índices de cristalinidade obtidos para as alíquotas retiradas durante o processo de hidrólise ácida realizado com a polpa mercerizada.

Figura 27. Variação dos índices de cristalinidade em função do tempo durante reação de hidrólise ácida com a polpa mercerizada.

O comportamento dos índices de cristalinidade durante o processo de hidrólise ácida realizada com a polpa mercerizada mostrou-se semelhante ao observado na hidrólise ácida realizada com a fibra de partida. Decorridos 90 min obteve-se o ponto

de máxima cristalinidade o qual atingiu 88,6% cerca de 10% superior ao índice obtido durante a hidrólise com a fibra não mercerizada, indicando que a fração não cristalina hidrolisada foi maior. Nota-se ainda que a posterior diminuição dos índices de cristalinidade ocorre de maneira semelhante ao ocorrido no processo de hidrólise com a fibra não mercerizada, porém em menor escala, ou seja, a hidrólise da fração cristalina também se demonstrou mais efetiva na hidrólise com a polpa mercerizada atingindo um índice mínimo de 81,5%, cerca de 10% maior que o menor índice de cristalinidade obtido durante a hidrólise com a fibra não mercerizada.

4.8.3 Comprimento e espessura médio (MorFi)

A **Figura 28** mostra os mapas de densidade construídos a partir das análises de comprimento e espessura média para as alíquotas extraídas durante processo de hidrólise ácida com a polpa já mercerizada.

Figura 28. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise ácida realizada com a polpa mercerizada.

Os mapas de densidade mostram que nos 30 primeiros min de reação as fibras apresentaram diminuição de comprimento e espessura se comparadas à fibra mercerizada de partida e, após 2h de reação, observou-se maior concentração na faixa de comprimento entre [47-77] μm e [129-215] μm e espessura na faixa entre [18-23] μm e [30-39] μm .

A partir de 90 min é possível notar que tanto o comprimento como a espessura tiveram aumento. Decorridos 120 min de reação percebe-se que a distribuição de espessura abrange todas as faixas medidas e que o comprimento se desloca no sentido de [129-215] μm . A partir de então as alíquotas mostram grande irregularidade quanto ao seu comprimento e espessura. Deve-se ressaltar que após 210 min a espessura apresenta maior acumulo de densidade na faixa maior que 50 μm . Essa

irregularidade se deve a aglomeração dos feixes de fibra que ocorre de maneira não controlada, fenômeno este que não é observado na hidrólise ácida realizada com a fibra não tratada onde os feixes de fibras não tendem a se aglomerar. Os resultados foram também usados para construir os gráficos de barras mostrados a seguir.

Figura 29. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra tratada.

Na primeira hora de hidrólise ácida nota-se uma diminuição das fibras com espessura maiores, especialmente na faixa maior que 18μm (**Figura 29**). Decorridas 2h observa-se um aumento considerável nas fibras com espessura menores se concentrando na região entre 5μm e 18μm. Após 4h as fibras apresentam distribuição mais homogênea, que pode indicar a início do fenômeno de aglomeração dos feixes de fibras, porém com diminuição da densidade de fibras com espessuras maiores que 23μm. Decorridas 6h nota-se que há um aumento das fibras com espessuras maiores que 18μm e diminuição em relação a alíquota de 2h das fibras menos espessas, na faixa entre [5-6]μm e [14-18]μm.

Figura 30. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise ácida realizado com a fibra tratada.

O comportamento do comprimento das fibras segue padrão parecido ao observado na hidrólise ácida com a fibra não tratada, (**Figura 30**) porém nota-se relevante diferença na faixa de comprimento de [77-129] μm, em que as alíquotas referentes a 4h e 6h apresentam diminuição de fibras nessa faixa de comprimento e posterior aumento em intervalos maiores tais como [129-215] μm.

4.9 Análise de licores provenientes das reações de hidrólise ácida

Os licores provenientes das reações de hidrólise ácida foram avaliados por CLAE conforme descrito no **item 2.13**. As reações e análises foram realizadas em duplicata e os dados mostrados correspondem a média dos valores obtidos para ambas as reações.

4.9.1 Reação de hidrólise ácida realizada com a fibra não tratada

Em ambas as reações, realizadas com a fibra não tratada e também com a fibra mercerizada, houve formação de glicose o que indica que ocorreu clivagem das ligações 1,4 β -glicosídicas desde os primeiros minutos de reação. As concentrações de glicose formada apresentam curva ascendente atingindo um teor máximo de 1,3 g.L⁻¹.

Figura 31. Variação no teor da glicose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada

Os teores de glicose gerados ao longo da reação apresentaram perfil ascendente (**Figura 31**) o que pode indicar que nem toda a glicose que poderia ser formada durante a reação foi medida ao final de 6h. de reação.

Houve formação de xilose, devido a presença de hemiceluloses, que aumentou significativamente no início da reação chegando a quase triplicar sua quantidade inicial formada, de aproximadamente 1,0 g.L⁻¹. Decorridos 60 min de reação o teor de xilose chega ao máximo de 2,8 g.L⁻¹. Após 30 min de reação os teores de xilose apresentaram relativa estabilidade (**Figura 32**).

Figura 32. Variação no teor de xilose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada

A arabinose também foi detectada, e em ambas as reações apresentou comportamento semelhante, porém com grande diferença nas quantidades detectadas, atingindo um máximo de aproximadamente 0,3 g.L⁻¹ para a reação com a fibra não mercerizada. Os teores de arabinose variaram dentro de uma pequena faixa de concentração, com os erros aproximando os valores **(Figura 33)**.

Figura 33. Variação no teor da arabinose formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada

Houve formação de ácido acético na hidrólise ácida realizada com a fibra não tratada, o ácido acético é proveniente da hidrólise dos grupos acetila ligados a açúcares das cadeias constituintes das hemiceluloses.

Figura 34. Variação no teor da ácido acético formada em função do tempo de reação da fibra não mercerizada

As concentrações de ácido acético obtidas se mantiverem em patamar menor que as concentrações de xilose, produto majoritário nesta reação. Apresentaram perfil ascendente principalmente nos 20 primeiros min de reação atingindo um máximo de $0,86 \text{ g.L}^{-1}$ após 6h de reação.

Observou-se também a formação de furfural que é um produto de decomposição da xilose, (**Figura 35**) que foi detectado a partir de 20 min de reação, e apresentou curva ascendente com tendência a estabilizar a partir de 330 min., esse comportamento pode indicar a formação de polifurfural no meio. (BELGACEM, 2008)

Figura 35. Reação de desidratação em meio ácido da xilose

Figura 36. Variação no teor de furfural em função do tempo de reação da fibra não mercerizada

A formação de Hidroximetilfurfural, HMF não foi detectada na hidrólise realizada com a fibra não mercerizada, o que indica que a glicose formada não sofreu decomposição, ou ainda que os produtos de decomposição apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção para o método utilizado. Consequentemente, os produtos de decomposição do HMF, como ácido fórmico e ácido levulínico também não foram detectados.

4.9.2 Reação de hidrólise ácida realizada com a fibra tratada

Os produtos provenientes da hidrólise da fibra mercerizada, detectada via CLAE, foram os mesmos detectados na reação de hidrólise realizada com a fibra não mercerizada.

As concentrações de glicose detectada foram maiores em comparação com a hidrólise com a fibra não mercerizada, teor máximo de $1,34 \text{ g.L}^{-1}$, atingindo pouco mais que o dobro do detectado após 330 min. de reação chegando a $2,71 \text{ g.L}^{-1}$. Assim como o perfil da curva de formação de glicose para a fibra não mercerizada os teores apresentam perfil ascendente o que pode indicar que a reação não atingiu seu máximo de produção mesmo após decorridos 6h de reação, embora uma tendência frente à estabilização seja observada (**Figura 37**)

Figura 37. Variação no teor de glicose em função do tempo de reação

A **Figura 38** mostra a comparação entre os teores de glicose para a fibra não mercerizada e mercerizada, nota-se que a fibra mercerizada apresentou resultados promissores, aumentando o rendimento apresentado pela fibra não mercerizada em mais de 50%. Esse fato indica que o tratamento alcalino pode ter agido facilitando o acesso as cadeias de celulose durante o processo de hidrólise ácida.

Figura 38. Comparação entre os teores de glicose obtidos para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizadas.

As concentrações de xilose detectadas foram consideravelmente menores que as detectadas na hidrólise com a fibra não mercerizada, (**Figura 39**) atingindo concentração máxima após 210 min de reação seguida de relativa estabilização, atingindo um máximo de $0,82 \text{ g.L}^{-1}$, que por sua vez representa cerca de 30% da xilose formada na reação de hidrólise com a fibra de partida. Este resultado é decorrente do fato de hemiceluloses, que geram xilose, terem sido extraídas durante a mercerização.

Figura 39. Teores de xilose formada em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.

A **Figura 40** mostra uma comparação entre os teores de xilose obtidos para a fibra não mercerizada e mercerizada, deixando claro a disparidade de valores, sendo os teores obtidos para a fibra mercerizada menores que os obtidos para a fibra não mercerizada. Este fato pode ser devido a diminuição do teor de hemiceluloses presente na fibra mercerizada.

Figura 40. Comparação entre os teores de xilose obtidos para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizada.

A arabinose também foi detectada na hidrólise com a fibra mercerizada, (**Figura 41**) porém seus teores ficaram bem abaixo do detectado na reação com a fibra não mercerizada, atingindo um máximo de 0,05 g.L⁻¹, que representa menos de 20% da quantidade detectada na reação anterior, fato este devido a diminuição da quantidade das hemiceluloses presentes na fibra tratada.

Figura 41. Distribuição dos teores de Arabinose formada a partir da hidrólise da fibra mercerizada

Figura 42. Comparação entre os teores obtidos de arabinose para a reação de hidrólise ácida com as fibras não mercerizada e mercerizada.

Cabe ressaltar que o perfil da curva para os teores de arabinose (**Figura 42**) das reações de hidrólise ácida são bem distintos, sendo que para a fibra mercerizada não há grandes variações nos teores detectados desde o início da reação até seu final após 6h.

O produto de decomposição da xilose, furfural, foi detectado somente após 60 min. de reação e apresentou comportamento semelhante a curva para a hidrólise com a fibra não mercerizada, os teores obtidos podem ser visualizados na **Figura 43**

Figura 43. Variação no teor de furfural em função do tempo de reação.

O teor máximo de furfural obtido foi em torno de 0,06 g.L⁻¹ que representa cerca de 7,5% do teor de xilose obtido, sendo o furfural um produto de degradação da xilose pode-se inferir que a degradação da xilose também ocorre em baixa escala. A **Figura 44** apresenta uma comparação entre os teores obtidos com a fibra não mercerizada e mercerizada.

Figura 44. Comparação entre os teores de furfural obtidos com a hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada e mercerizada.

Os teores obtidos para a fibra mercerizada foram consideravelmente inferiores aos obtidos para a fibra não mercerizada, representando menos de 20% do total. Diferentemente da hidrólise realizada com a fibra não mercerizada, houve detecção do Hidroximetilfurfural que é um produto de decomposição da glicose, (**Figura 45**) este foi detectado após 120 min de reação (**Figura 46**) e também apresentou perfil ascendente, porém os teores de HMF são muito baixos o que indica que a decomposição da glicose ocorreu em baixa escala. Os teores de HMF detectados representam menos de 0,05% da glicose formada durante a reação.

Figura 45. Reação de desidratação da glicose em meio ácido

Figura 46. Teores de Hidroximetilfurfural formado em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.

Os teores obtidos por meio da CLAE mostram que a mercerização da fibra possibilitou uma hidrólise ácida mais efetiva e com produção de glicose maior, assim como era esperado em comparação com a hidrólise realizada com a fibra não mercerizada indicando que a mercerização facilita o acesso à celulose.

4.10 Rendimentos das hidrólises ácidas com a fibra não mercerizada e mercerizada

Considerando o total de celulose presente na fibra (TABELA 1) é possível calcular o rendimento das reações de hidrólise ácida, para isso foi calculado o máximo de glicose que poderia ser obtido se toda a celulose fosse transformada em glicose na ausência de decomposições posteriores (glicose máxima). Calculou-se por meio da equação 2:

$$[\text{glicose}]_{\text{max}} = \frac{M_i \cdot \%_{\text{cel}} \cdot q}{V} \quad (2)$$

Sendo:

$$q = \frac{MM_{\text{glicose}}}{MM_{\text{Anidroglicose}}} = \frac{180 \text{ g.mol}^{-1}}{162 \text{ g.mol}^{-1}} = 1,1 \quad (3)$$

Sendo:

q: Fator de conversão (“q” é um fator de conversão necessário para calcular o quanto de glicose seria formada a partir da celulose inicial, já que na celulose, a glicose encontra-se na forma anidra, diferindo em massa, por uma molécula de água)

M_i: Massa inicial de fibra (30g);

V: Volume da solução (1L) e

%cel: Porcentagem de celulose na fibra.

Estes cálculos forneceram o valor de 23,2 g.L⁻¹ para fibra não mercerizada e 26,9 g.L⁻¹ para fibra mercerizada, de rendimento máximo de glicose que poderia ser detectado no licor, ou seja, a glicose que potencialmente poderia ter sido formada se toda a celulose fosse convertida a glicose.

Foram feitos cálculos baseando-se nos valores de concentração máxima de glicose obtidos para cada condição reacional. Para obter a porcentagem de celulose hidrolisada foi calculada a razão entre glicose potencial (glicose do licor somada aos

produtos de decomposição), com a concentração máxima de glicose (que seria obtida se toda celulose fosse hidrolisada, tendo como produto a glicose).

De posse destes dados, é possível então calcular o rendimento da hidrólise ácida por meio das equações 4 e 5:

$$\% \text{ de celulose hidrolisada} = \frac{[glicose]_{potencial}}{[glicose]_{max}} \cdot 100(4)$$

$$\% \text{ de celulose convertida em glicose} = \frac{[glicose]_{licor}}{[glicose]_{max}} \cdot 100(5)$$

Os teores de glicose presentes no licor obtidos para a reação de hidrólise ácida com a fibra não mercerizada e mercerizada foram respectivamente, 1,34 g. L⁻¹ e 2,71g. L⁻¹, por meio das equações (2), (3), (4) e (5), considerando os teores obtidos para os produtos de decomposição, calculou-se o rendimento para as reações de hidrólise que são descritos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Valores de glicose máxima, glicose detectada no licor e porcentagens de celulose hidrolisada e conversão de celulose a glicose para as fibras não mercerizada e mercerizada.

	Fibra não mercerizada	Fibra mercerizada
Glicose máxima (g.L⁻¹)	23,3	26,9
Tempo (h)	6,0	5,5
Glicose potencial (g.L⁻¹)	1,6	2,8
Glicose no licor (g.L⁻¹)	1,3	2,7
% celulose hidrolisada	7,0	10,2
% celulose convertida a glicose	5,7	10,0

Os rendimentos para ambas as reações atingiram níveis aquém do esperado, porém é possível notar que o pré-tratamento se deu de maneira satisfatória, uma vez que apresentou aumento das porcentagens de celulose hidrolisada e também a conversão de celulose a glicose, chegando a quase dobrar o rendimento da reação.

Trabalhos anteriores realizados com sisal, apresentaram rendimentos superiores se comparados a esse tipo de estudo realizado com o curauá. DE PAULA, em 2009, realizou trabalho semelhante (H₂SO₄ a 30%, 80°C, 6h) utilizando polpa de sisal como matéria prima e estabelecendo um paralelo entre a polpa não tratada e a polpa tratada com NaOH a 20%, por 3h e a 50°C. Este estudo apresentou 4,8 g.L⁻¹ de glicose formada a partir da polpa não mercerizada, obtendo 14,5% de rendimento. Já a polpa mercerizada foi submetida a hidrólise ácida (H₂SO₄ a 30%, 100°C, 6h) e apresentou rendimento de 42,6%. Cabe ressaltar que as polpas utilizadas apresentaram composição bastante divergente da fibra de curauá utilizada nesse trabalho. A polpa de sisal era composta por 88% de α-celulose, 12% de hemiceluloses e índice de

cristalinidade de 77% e a polpa mercerizada apresentava respectivamente 96%, 4% e 59% de α -celulose, hemiceluloses e índice de cristalinidade, respectivamente.

A menor fração constituinte de hemiceluloses pode ter contribuído de maneira benéfica durante o processo de hidrólise da celulose de sisal, e também a maior temperatura pode ter proporcionado um meio mais adequado para que a quebra das moléculas de celulose ocorresse. Cabe ressaltar que a hidrólise ácida da fibra mercerizada e não mercerizada de curauá foi realizada a 80°C no intuito de diminuir a decomposição da glicose mais evidente a temperaturas mais altas.

4.11 Hidrólise enzimática

Assim como a reação de hidrólise ácida as alíquotas de fibras retiradas durante o processo de hidrólise enzimática foram caracterizadas quanto a sua morfologia por meio da Microscopia eletrônica de varredura (MEV), quanto a índice de cristalinidade, tamanho e espessura médio das fibras (MorFi) e seus licores foram analisados via CLAE seguindo exatamente os mesmos parâmetros já utilizados para a hidrólise ácida.

4.11.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) – fibra não tratada

A **Figura 47** mostra as imagens de microscopias obtidas para as alíquotas extraídas durante o processo de hidrólise enzimática.

Figura 47. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada.

As microscopias das alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada mostram que após 30 min de reação já é possível observar a abertura dos feixes de fibras e diminuição em seu tamanho e espessura, porém esse processo ocorre de maneira heterogênea, ou seja, nota-se que apenas parte dos feixes de fibras sofreram esta diminuição. Essa característica é mantida durante todo processo de hidrólise. Decorridos 4h de reação a fragmentação das fibras é observada mais nitidamente. Após 8h de reação observa-se maior deposição de fragmentos na superfície dos feixes de fibras, e finalmente decorridos as 48h do

processo de hidrólise os feixes apresentam superfície com bastante rugosidade e sinais de ruptura aparentes.

4.11.2 Índices de cristalinidade – fibra não tratada

A **Figura 48** mostra a distribuição dos índices de cristalinidade no decorrer da hidrólise enzimática.

Figura 48. Variação dos índices de cristalinidade durante a hidrólise enzimática por tempo

Nota-se que após 1h de reação há um aumento na cristalinidade atingindo índice máximo de 73,4% que indica que a fração não cristalina da celulose foi hidrolisada, aumentando assim as regiões cristalinas e consequentemente aumentando a cristalinidade. Ao longo da reação é possível notar uma queda na cristalinidade das amostras, fenômeno oeste devido a hidrólise das frações cristalinas o que culmina na queda de cristalinidade do material. Cabe ressaltar que as regiões não cristalinas são de fácil acesso se comparadas às regiões cristalinas, portanto sofrem ataque com tempos relativamente curtos de reação.

4.11.3 Comprimento e espessura das fibras – fibra não tratada

A **Figura 49** mostra os mapas obtidos por meio da análise de comprimento e espessura médio das fibras para as alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática.

Figura 49. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise enzimática realizada com a polpa não mercerizada.

Decorridos 30 min de reação as fibras já demonstram alterações quanto ao seu comprimento e espessura se comparadas a fibra de partida utilizada, observa-se que o maior pico de densidade referente a comprimento encontra-se entre [129-215] μm e [359-599] μm , porém a alteração mais evidente se dá em sua espessura que apresenta uma distribuição heterogênea com fibras entre [6-8] μm e maiores que 50 μm .

Após 4h de hidrólise grandes alterações podem ser observadas quanto a espessura das fibras, que apresenta maior densidade de fibras entre [11-14] μm e [18-23] μm e diminuição de espessuras maiores que 23 μm . Após 6h de reação o pico de densidade de fibras referente ao comprimento concentra-se entre [46-77] μm e [129-215] μm com pequeno deslocamento em direção a [46-77] μm o qual permanece inalterado até o fim da reação.

Decorridas 15h observa-se alteração na espessura que apresenta aumento de densidade de fibras entre [6-8] μm e [11-14] μm que ao longo da reação se intensifica, porém, a maior concentração de fibras encontra-se entre [11-14] μm e [18-23] μm . Ao final da reação nota-se que há uma diminuição da ocorrência de comprimentos

superiores a $[129-215]\mu\text{m}$ e confirma-se a tendência do acúmulo de fibras com espessura de $[6-8]\mu\text{m}$.

De modo geral observou-se que alterações mais significativas ocorreram na espessura das fibras, o que indica uma possível rota de ação das enzimas, atacando preferencialmente a superfície das fibras, o que por sua vez explica as mudanças menos evidentes no comprimento das fibras no decorrer da reação.

Figura 50. Gráficos de barras para a espessura das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra não tratada.

De maneira geral observa-se que a espessura das fibras sofre diminuição ao longo do tempo reacional, sendo esse fenômeno mais visível nas 8 primeiras horas, nota-se também que as alíquotas referentes a 39h e 48h se destacam apresentando diminuição mais acentuada que pode ser observada pela maior quantidade de fibras no intervalo entre $5\mu\text{m}$ e $18\mu\text{m}$. A medida que as reações progridem nota-se que, as enzimas atacaram preferencialmente a superfície e não as extremidades das fibras, pois os valores que sofreram maior impacto são os referentes aos intervalos de espessura, apresentando diminuição acentuada.

Figura 51. Gráficos de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra não tratada.

Assim como o observado para a hidrólise ácida, durante a hidrólise enzimática da fibra não tratada o comprimento das fibras não sofre grandes variações ao longo da reação exceto pela maior acumulo de fibras na faixa de [77-129]µm de comprimento após 39h. Nos demais intervalos não se observa alterações relevantes ao longo da reação.

4.11.4 MEV – Hidrólise enzimática realizada com a fibra tratada

A **Figura 52** mostra as imagens de microscopias obtidas para as alíquotas extraídas durante o processo de hidrólise enzimática com a fibra mercerizada.

Figura 52. Microscopia eletrônica de varredura das alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra mercerizada.

As imagens superiores correspondem a aproximação de 1000x e se comparadas desde a primeira alíquota retirada até o final da reação de 48h não há grandes alterações, porém, se comparadas a fibra de partida e também às imagens obtidas a partir da reação de hidrólise com a fibra não mercerizada observa-se que houve diminuição acentuada de tamanho e espessura das fibras. Decorridos 30 min. de reação nota-se o acúmulo de fragmentos aderidos a superfície das fibras que apresentam pouca rugosidade. Após 4h observa-se vários pontos de ruptura da fibra

e superfície bastante irregular. Após 15h os pontos de ruptura se tornam ainda mais evidentes e de maneira geral o acúmulo de fragmentos na superfície das fibras tende a aumentar. Ao final da reação as fibras com menores tamanhos compõem a maioria das fibras, porém é possível notar a existência de pequenos aglomerados.

4.11.5 Índice de cristalinidade – hidrólise enzimática com a fibra tratada

O estudo da variação dos índices de cristalinidade também se faz necessária durante a hidrólise enzimática (**Figura 53**) não somente para fins de comparação com as demais reações de mercerização e hidrólise ácida, mas também para entender como as enzimas agem durante o processo de hidrólise.

Figura 53. Variação dos índices de cristalinidade durante a hidrólise enzimática realizada com a fibra não tratada em função de tempo (a), comparação dos índices de cristalinidade obtidos com a fibra não tratada e tratada (b).

Assim como o observado para os índices de cristalinidade para a fibra não mercerizada, a fibra mercerizada apresentou perfil semelhante, sofrendo aumento de cristalinidade no início da reação, atingindo um máximo de 84,9%, e posterior queda ocasionada de maneira análoga com a hidrólise da fração não cristalina da celulose, seguida da hidrólise da fração cristalina. Na **Figura 53 b** podemos observar que apesar da fibra mercerizada apresentar índices de cristalinidade mais elevados, o comportamento perante a hidrólise enzimática é bem semelhante.

4.11.6 Comprimento e espessura das fibras - fibra tratada

A **Figura 54** mostra os mapas obtidos por meio da análise de comprimento e espessura das fibras para as alíquotas retiradas durante a hidrólise enzimática com a fibra mercerizada.

Figura 54. Mapas de densidade das alíquotas retiradas durante processo de hidrólise enzimática realizada com a polpa mercerizada.

Nos primeiros 30 min. de reação o comprimento das fibras não apresentou alteração se comparado a fibra de partida, mercerizada por 120 min., já quanto a espessura das mesmas observa-se que houve pequena diminuição apresentando

maior densidade na região de [11-14] μm . Após 1h houve deslocamento do pico referente a espessura das fibras apresentando maior acumulo nas regiões entre [6-8] μm e [11-14] μm e diminuição das fibras com espessura maiores que 50 μm . O acumulo de densidade referente ao comprimento sofreu deslocamento para região de [129-215] μm .

Após 4h de reação observa-se o surgimento de pico de densidade para o comprimento na faixa entre [46-77] μm e [129-215] μm , e para a espessura na faixa entre [11-14] μm e [18-23] μm mantendo a tendência de aumento de densidade em regiões de menor espessura e diminuição acentuada das fibras com espessura maior que 50 μm .

Após 8h houve formação de 2 picos mais evidentes relativos a espessura nas regiões entre [6-8] μm e [11-14] μm e [11-14] μm e [18-23] μm . Após 15h observa-se o surgimento de 3 picos bem definidos referentes ao comprimento das fibras que se encontram nas regiões, menor que [6-8] μm , entre [6-8] μm e [11-14] μm e [11-14] μm e [18-23] μm . Decorridas 23h a tendência observada é mantida com maior acumulo de densidade das regiões mencionadas.

Figura 55. Gráficos de barras para a espessura e comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra tratada.

Durante a hidrólise enzimática a espessura das fibras apresentou comportamento diferente se comparado a hidrólise ácida, de maneira geral houve diminuição da espessura das fibras ao longo da reação, sendo que a densidade de fibras com espessura superior a faixa de [30-39]μm não sofreu grandes alterações ao longo das 48h, porém, a faixa entre 5μm e 18μm foi a que apresentou maior variação ao longo da reação com maior acumulo de fibras após 23h de reação.

Figura 56. Gráfico de barras para o comprimento das fibras durante o processo de hidrólise enzimática realizado com a fibra tratada.

De maneira análoga ao observado para a espessura das fibras o comprimento das mesmas de maneira geral também sofreu diminuição ao longo da reação, fenômeno esse observado mais claramente na faixa de comprimento entre 77μm e 129μm. No intervalo de 129μm a 359μm a diminuição da densidade de fibras no decorrer da reação também é evidente.

4.11.7 Análise de licores - fibra não mercerizada

Nas reações de hidrólise catalisadas por enzimas não há formação de produtos de decomposição ao contrário do que se observa nas reações sob catálise ácida. As enzimas utilizadas, celulasas, agem de maneira específica no processo de hidrólise da celulose produzindo predominantemente glicose. A **Figura 57** apresenta

os valores obtidos para glicose durante a reação de hidrólise enzimática utilizando a fibra não mercerizada.

Figura 57. Distribuição dos teores de Glicose formada a partir da hidrólise da fibra não mercerizada.

Observa-se que a curva apresenta acentuada ascensão nas 10 primeiras horas e tende a estabilizar após cerca de 20h de reação. Após 10 min de reação já é possível observar a formação de glicose, que apresenta 0,5 g.L⁻¹ já na primeira alíquota retirada durante a hidrólise enzimática. O teor máximo de glicose obtido foi de 12,0 g.L⁻¹ após 39h de reação.

Assim como na reação de hidrólise ácida realizada com as fibras não mercerizada e mercerizada, a hidrólise enzimática teve como produto a formação de xilose. A **Figura 58** mostra uma distribuição dos teores obtidos para a xilose.

Figura 58. Distribuição dos teores de Xilose formada a partir da hidrólise da fibra não mercerizada.

A formação de xilose que também pode ser observada a partir do primeiro ponto de coleta, após 10 min. de reação apresentando 0,28 g.L⁻¹ inicialmente. A curva apresenta características ascendentes nas primeiras 10 h de reação e posterior estabilização, o teor máximo obtido para a xilose foi de 2,30 g.L⁻¹ que representa cerca de 19% do teor máximo obtido para a glicose.

4.11.8 Análise de licores - fibra mercerizada

Os produtos formados foram os mesmos já detectados na hidrólise enzimática realizada com a fibra não mercerizada. A **Figura 59** mostra uma distribuição dos teores de glicose obtidos.

Figura 59. Teores de glicose formada em função do tempo a partir da hidrólise da fibra mercerizada.

Assim como o observado para a reação com a fibra não mercerizada o perfil da curva dos valores obtidos para a glicose apresentou padrão ascendente com posterior estabilização. O teor máximo obtido foi de 17,53 g.L⁻¹ que representa um aumento de cerca de 45% se comparado a reação utilizando a fibra não mercerizada que apresentou teor máximo de glicose de 12 g.L⁻¹. A **Figura 60** mostra uma comparação entre os teores de glicose obtidos por meio das reações com a fibra não mercerizada e mercerizada.

Figura 60. Comparação dos teores de glicose para as reações de hidrólise enzimática com as fibras não mercerizada e mercerizada.

Esse aumento na produção de glicose era esperado, uma vez que o tratamento alcalino proporciona maior possibilidade de acesso às cadeias de celulose, facilitando assim o ataque enzimático e posterior quebra das cadeias de celulose em glicose.

Cabe ainda ressaltar que a estabilização no teor de glicose obtido não significa necessariamente que a reação atingiu seu máximo rendimento possível, e sim que inibidores como por exemplo a própria glicose já produzida e que continua presente no meio pode atuar como inibidor das enzimas presentes e assim dificultar o acesso às moléculas de celulose ainda presentes no meio reacional.

A formação de xilose também já era prevista assim como ocorrido na hidrólise enzimática realizada com fibra mercerizada. Uma distribuição dos teores de xilose obtidos pode ser observada na **Figura 61**.

Figura 61. Distribuição dos teores de Xilose formada a partir da hidrólise da fibra mercerizada.

Os teores obtidos para xilose apresentaram perfil ascendente assim como apresentado para a reação com a fibra não mercerizada seguida de posterior estabilização que se deu após 15h de reação. O teor máximo obtido foi de 1,36 g.L⁻¹, cerca de 56% menor que o obtido para a reação utilizando a fibra não mercerizada, também já era esperado, a **Figura 62** mostra uma comparação entre esses valores.

Figura 62. Comparação entre os teores de xilose obtidos para as reações de hidrólise enzimática com as fibras não mercerizada e mercerizada.

A diminuição do teor de xilose se deve a remoção de parte das hemiceluloses durante o tratamento alcalino, as hemiceluloses são formadas em sua maioria por xilanas que são convertidas a xilose no processo de hidrólise, sendo assim a diminuição do teor de hemiceluloses da fibra não mercerizada de 15,5% para 13,2% para a fibra mercerizada pode ter causado a diminuição nos teores de xilose.

4.11.9 Rendimento para hidrólises enzimáticas realizadas com a fibra não tratada e tratada.

Da mesma forma que foram calculados os rendimentos para as reações de hidrólise ácida mostrados no item 4.14.1, obteve-se a porcentagem de celulose hidrolisada para as reações de hidrólise enzimática com a fibra não mercerizada e mercerizada. Utilizou-se para isso a equação 6 os valores obtidos são mostrados na tabela 3.

$$\% \text{ celulose hidrolisada} = \frac{[glicose]_{detectada}}{[glicose]_{m\acute{a}x}} \quad (6)$$

Tabela 3. Valores de glicose máxima, glicose detectada no licor e porcentagens de celulose hidrolisada para as fibras não mercerizada e mercerizada.

	Fibra não mercerizada	Fibra mercerizada
Glicose máxima (g.L ⁻¹)	23,3	26,9
Tempo (h)	39,0	47,0
Glicose no licor (g.L ⁻¹)	12,0	17,5
% celulose hidrolisada	51,5	65,1

A porcentagem de celulose hidrolisada para a fibra mercerizada apresentou aumento considerável, superior a 13,5% se comparada a valores obtidos para a fibra não mercerizada, este aumento se deve ao tratamento alcalino realizado que proporciona acesso facilitado das enzimas as cadeias de celulose, produzindo de maneira mais efetiva a hidrólise e gerando em maior quantidade o produto desejado, no caso, glicose.

Observou-se que os valores obtidos de glicose presente no licor e consequentemente a porcentagem de celulose hidrolisada para as reações com a fibras não mercerizada e mercerizada são consideravelmente maiores que os obtidos por meio da hidrólise ácida. Para a fibra não mercerizada o aumento de rendimento da porcentagem de celulose hidrolisada foi superior a 44%, já para a fibra mercerizada o aumento foi ainda maior atingindo cerca de 55%.

Estudos anteriores realizados com a polpa de sisal, mostraram rendimentos superiores ao atingido com a fibra de curauá. KASCHUK em 2014 utilizou polpa de sisal para realização de pré tratamento alcalino (NaOH a 20% em massa, 50°C e 3h), que obteve como resultado uma polpa constituída de $97,4 \pm 2$ de α -celulose e com índice de cristalinidade de 68% a qual foi utilizada para realização de hidrólise enzimática (0,5 ml.g⁻¹, 50°C, 48h, enzimas comerciais Accellerase). Tal estudo obteve rendimento em relação a porcentagem de celulose hidrolisada de 88%, apresentando rendimento cerca de 23% maior que o estudo semelhante realizado com a fibra de curauá. Isto pode ser devido a maior quantidade de α -celulose presente na polpa ou a menor porção de possíveis interferentes, como hemiceluloses e lignina. (KASCHUK, 2014)

5 Conclusões

O tratamento alcalino agiu de maneira eficaz diminuindo a porcentagem de lignina em cerca de 4,5% e hemiceluloses em cerca de 2%, e aumentando o teor de celulose presente na fibra em cerca de 11%, características essas que se mostraram imprescindíveis para o aumento de rendimentos das reações de hidrólise efetuadas, tanto as sob catálise ácida como sob catálise enzimática.

Comparando as reações de hidrólise ácida e enzimática, o teor obtido para glicose com a hidrólise enzimática da fibra não mercerizada foi de 12 g.L^{-1} já o teor obtido para a hidrólise ácida com a fibra não mercerizada foi de $1,3 \text{ g.L}^{-1}$, que representa apenas 10,8% do obtido para a hidrólise enzimática. Já hidrólise enzimática da fibra mercerizada apresentou teor de glicose de $17,5 \text{ g.L}^{-1}$ e a hidrólise ácida realizada com a fibra mercerizada apresentou teor de glicose de $2,7 \text{ g.L}^{-1}$, que representa 15,4% do obtido para a hidrólise enzimática.

Comparando o comportamento apenas dos teores obtidos como produtos da hidrólise enzimática, observou-se que houve aumento de mais de 45% no teor de glicose obtidos (de $12,0 \text{ g.L}^{-1}$ para a fibra não mercerizada para $17,5 \text{ g.L}^{-1}$ para a fibra mercerizada) e cerca de 13% para a porcentagem de celulose hidrolisada (de 51,5% para a fibra não mercerizada para 65,1% para a fibra mercerizada)

Desta maneira a hidrólise enzimática se mostrou mais eficaz perante a proposta de sacarificação da fibra de curauá, que apresentou resultados interessantes, porém que ainda necessitam passar por estudos mais aprofundados para que se torne uma rota viável de produção de bioetanol ou etanol de segunda geração. Se faz necessário também um estudo com relação a custos para implementação em escala industrial.

6 Referências Bibliográficas

ARANTES, V.; SADDLER, J. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4, 2010

BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. Monomers, polymers and composites from renewable resources. London: Elsevier, 2008, 560 p.

BEZERRA, T. L.; & RAGAUSKAS, A. J. A review of sugarcane bagasse for second-generation bioethanol and biopower production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.10, n. 5, p.634–647, 2016

CASTRO, D. O.; RUVOLO FILHO, A. C., F.; FROLLINI, E. Materials prepared from biopolyethylene and curaua fibers: Composites from biomass. **Polymer Testing**, v. 31, p. 880-888, 2012.

CHENG, G.; ZHANG, X.; SIMMONS, B.; SINGH, S. Theory, practice and prospects of X-ray and neutron scattering for lignocellulosic biomass characterization: towards understanding biomass pretreatment. **Energy & Environmental Science**, v. 8, n. 2, p. 436-455, 2015.

DE PAULA, M. P. **Hidrólise ácida de polpa de sisal: características do processo heterogêneo e estudo das reações correlatas**. 2009. 143f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood**: chemistry, ultrastructure, reactions. New York: Walter de Gruyter, 1989. p. 613

GAN, Q.; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. **Process Biochemistry**, v.38, n.7, p.1003-1018, 2003.

GOLDSCHMID, O. Ultraviolet spectra. In: Ludwig, C. H.; SARKANEN, K. V. (Ed.). **Lignins**: Occurrence, Formation, Structures, and Reactions. New York: John Wiley, 1971. P. 241 – 266.

GURGEL, L.V.A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético da sacarificação de celulose para produção de bioetanol**. 2010. 315 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

JIANG, H.; CHEN, Q.; GE, J.; ZHANG, Y. Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1005-1012, 2014.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 188-203, 2014.

KASCHUK, J. J. **Hidrólise enzimática da polpa celulósica de sisal**. 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

KHOO, H. H. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.46, p. 100-119, 2015.

KLEMM, D.; PHILIPP, B.; HEINZE, T.; HEINZE, U.; WANGENKNECHT, W. **Comprehensive cellulose chemistry: fundamentals and analytical methods**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998, p. 263.

LACERDA, T. M. **Hidrólise de polpa de sisal como via de produção de etanol e materiais**. 2012. 252f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

LACERDA, T. M.; DE PAULA, M. P.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. 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.

LOOW, Y. L.; WU, T. Y.; JAHIM, J. M.; MOHAMMAD, A. W.; TEOH, W. H. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. **Cellulose**, v.23, n.3, p. 1491-1520, 2016.

LOSORDO, Z.; MCBRIDE, J.; ROOYEN, J. V.; WENGER, K.; WILLIES, D.; FROEHLICH, A.; LYND, L. Cost competitive second-generation ethanol production from hemicellulose in a Brazilian sugarcane biorefinery. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.10 n.5, p. 589-602, 2016

MENG, X.; RAGAUŠKAS, A. J. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, 150-158, 2014.

MOHR, A.; RAMAN, S. Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels. **Energy policy**, v.63, p.114-122, 2013.

MONTEIRO, S.N.; AQUINO, R.C.M.P.; LOPES, F.P.D.; CARVALHO, E.A.D.; ALMEIDA, J.R.M. Comportamento mecânico e características estruturais de compósitos poliméricos reforçados com fibras contínuas e alinhadas de curauá. **Revista Matéria**, v.11, n.3, p. 197 – 203, 2006.

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

NIDETZKY, B.; HAYN, M.; MACARRON, R.; STEINER, W. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. **Biotechnology letters**, v. 15, n.1, p. 71-76, 1993.

PAULA, M. P.; LACERDA, T.M ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E. Adding value to the Brazilian sisal: acid hydrolysis of its pulp seeking production of sugars and materials. **Cellulose**, v. 19, p. 975-992, 2012.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRANSKÁ, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. **Biotechnology Advances**. V. 33, p.1091–1107, 2015.

SAINI, J. K.; SAINI R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4 p. 1-17, 2014.

SÁNCHEZ, O.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; SIERRA, R. Delignification process of Agro-Industrial wastes an alternative to obtain fermentable carbohydrates for producing fuel. In: MANZANERA, M. (Ed.). **INTECH**. 2011. P. 111-154.

DOI: 10.5772/22381. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/alternative-fuel/delignification-process-of-agro-industrial-wastes-an-alternative-to-obtain-fermentable-carbohydrates>. Acesso em: 04 de janeiro de 2017.

SATYANARAYAMA, 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, p. 1694 – 1709, 2007.

SGHAIER, A. E. O. B., CHAABOUNI, Y., MSAHLI, S., & SAKLI, F. Morphological and crystalline characterization of NaOH and NaOCl treated *Agave americana* L. fiber. **Industrial Crops and Products**, v. 36, n. 1, p. 257-266, 2012.

SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.32, p. 713-728, 2014.

STEPHEN, J. D., MABEE, W. E., & SADDLER, J. N. Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.6, n. 2, p. 159-176, 2012. DOI: 10.1002/bbb.331

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International journal of molecular sciences**, v.9 n.9, p.1621-1651, 2008.

TRINDADE, W. G.; HOREAU, W.; J. D. MEGIATTO, J. D.; RAZERA, A. T.; CASTELLAN, A.; FROLLINI, E. Thermoset phenolic matrices reinforced with unmodified and surface-grafted furfuryl alcohol sugar cane bagasse and curaua fibers: properties of fibers and composites. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 2485 – 2496, 2005.

VALDIVIA, M.; GALAN, J. L.; LAFFARGA, J.; RAMOS, J. L. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. **Microbial Biotechnology**, v.9, n.5, p. 585-594, 2016.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.