AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**“PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO O PROCESSO DE
OXIDAÇÃO AVANÇADA POR FEIXE DE ELÉTRONS PARA HIDRÓLISE
ENZIMÁTICA DA CELULOSE”**

MÁRCIA ALMEIDA RIBEIRO

**Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientadora

Profa. Dra. CELINA LOPES DUARTE

São Paulo

2013

Dedico este trabalho ao Amor e aos meus Amigos.

O amor que veio do **Pai**, por sua sabedoria,
seus ensinamentos mostrados com o olhar... com o sorriso
e a força visceral motriz que me faz seguir.

Da **Mãe**, que como as energias primitivas da criação, da Terra, do trabalho incansável,
desapegado, foi o meu pilar,
meu regresso e apoio irrestrito.

Da **Filha**, que é minha obra e inspiração, meu abraço mais caloroso,
meu prozac, meu combustível e que
muito pacientemente me esperava.

Os **amigos**! Presentes maravilhosos que a vida me deu. São eles quem me sorri, me
encorajam, me abraçam, chamam a atenção, afagam, animam e mesmo quando por vezes
me senti esgotada foram eles que me disseram:

- *Vamos! Que eu estou contigo!*

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos para realização deste projeto de pesquisa.

À Dra. Celina Lopes Duarte, por ter confiado com este projeto de pesquisa. Agradeço sua valiosa orientação, seus ensinamentos e sua sabedoria.

Ao IPEN por receber-me de volta depois de uma temporada fora colocando em prática os conhecimentos adquiridos durante o mestrado, nas pessoas de Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo e a Dra. Margarida Hamada.

À Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) pelo financiamento do projeto de pesquisa (Research Contract No. 14709) e a FAPESP pelo financiamento do projeto temático BIOEN 2008/56066-1.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira - CTC e Fazenda Iracema pelo fornecimento das amostras de bagaço. Engº Jaime Finguerut, Engº Oswaldo Godoy, Dra. Célia Maria Galvão, pela valiosa parceria de trabalho e aos profissionais Liliane Andrade e Juliana pelo suporte técnico nos ensaios de hidrólise enzimática e fermentação.

À Dra. Beatriz Vahan Kilikian da Escola Politécnica da USP pela parceria de trabalho e nos ensaios de hidrólise e aos alunos Msc. Larissa Afonso e Bruno Oishi.

À Novozymes pelo fornecimento do kit de enzimas para os ensaios de hidrólise enzimática.

Aos Engºs Elisabeth R. S. Somessari e Carlos Gaia e Hélio Antonio Paes pela irradiação das amostras no acelerador de elétrons

Ao MSc. Manoel Nunes Mori, pelo excelente trabalho e suporte nos ensaios de pré-tratamento e caracterização das amostras.

À MSc. Célia Marina Napolitano e ao Sr. Salomão Alves de Medeiros, pelos ensaios de dosimetria do sistema de irradiação.

À Dra. Luci Diva Brocardo Machado, Dr. Leonardo Goldin de Andrade e Silva, Dra. Maria Helena Sampa, Dra Sueli Ivone Borrely, Dra. Anna Lucia C. H. Villavicencio pela amizade e carinho.

À família constituída aqui no Instituto: Érica Gauglitz (feliz reencontro), Amanda Ramos Koike, Amanda Santillo, Helbert Costa, Flávio Tihara, Mara Munhoz, Marcelo Bardi e Fernando Codello.

Aos sempre solícitos secretários do CTR: Cláudia Regina Nolla e Marcos Cardoso. Ao Gilberto Albano pelo suporte de informática que me salvou inúmeras vezes.

Aos colegas de sala do CTR: Gustavo B. Fanaro, Renato C. Duarte, Patrícia Yoko, Luana Andrade.

Aos demais colegas e técnicos do CTR que muito amigavelmente sempre foram prestativos e solidários nas questões diárias e no empréstimo de materiais de laboratório.

Namastê!

PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA UTILIZANDO O PROCESSO DE OXIDAÇÃO AVANÇADA POR FEIXE DE ELÉTRONS PARA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE”

MÁRCIA ALMEIDA RIBEIRO

RESUMO

O bagaço de cana de açúcar é uma fonte de energia renovável e matéria prima promissora na produção de biocombustível, pois representa cerca de 30% de glicose contida na planta com potencial de ser hidrolisado e convertido em etanol. Os principais constituintes do bagaço de cana são a celulose, formada por cadeia linear de glicose, a hemicelulose, um polímero amorfo constituído de xilose, arabinose, galactose e manose e a lignina, um polímero complexo formado por unidades de fenilpropanos que atuam como revestimento impermeabilizante nas fibras, difícil de ser removido por sua característica recalcitrante. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da irradiação com feixe de elétrons como pré-tratamento do bagaço de cana para hidrólise enzimática da celulose. O pré-tratamento do bagaço de cana é uma das etapas mais importante para torná-lo economicamente viável e competitivo na produção de energia. Como pré-tratamento o processamento por feixe de elétrons pode fragilizar a estrutura da hemicelulose e lignina, pela ação de radicais altamente reativos que quebram as ligações químicas, reduzindo o grau de polimerização das fibras. Foram avaliados os efeitos da radiação na estrutura e composição do bagaço, assim como a combinação do processamento por feixe de elétrons com o pré-tratamento de explosão à vapor. Para hidrólise enzimática utilizou-se enzimas comerciais fornecidas pela Novozymes. O processamento por feixe de elétrons levou a alterações na estrutura e composição do bagaço de cana aumentando a solubilidade pela degradação de celulose alfa e hemicelulose e aumentando também o rendimento da hidrólise enzimática. No caso do bagaço explodido, não houve alteração no rendimento da hidrólise enzimática, mas o processamento por feixe de elétrons promoveu uma redução de 67% no furfural, que é formado no processo de explosão a vapor.

"PRETREATMENT OF SUGARCANE BAGASSE USING THE ADVANCED OXIDATION PROCESS BY ELECTRON BEAM FOR ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CELLULOSE"

MÁRCIA ALMEIDA RIBEIRO

ABSTRACT

The sugar cane bagasse is a renewable energy source and a raw material promise in the biofuel production, once represents about 30% of glucose contained in the plant with the potential to be hydrolyzed and then converted to ethanol. The bagasse is composed of cellulose, straight chain of glucose, of hemicellulose, an amorphous polymer consisting of xylose, arabinose, galactose, and mannose, and of lignin, a complex polymer consisting of phenylpropane units that acts as waterproof coating on the fibers, which is hard to remove due its recalcitrant nature. The aim of this work was to study the electron beam processing as a pretreatment of sugarcane bagasse to enzymatic hydrolysis of cellulose. The pretreatment of sugarcane bagasse is one of the most important steps to make this material economically viable and competitive on the energy production. As a pretreatment the electron beam processing can weak the hemicellulose and lignin structures by the action highly reactive radicals that breaks the links, reducing the degree of polymerization fibers. It was evaluated the chemical and structural modifications on fibers caused by the irradiation, the enzymatic hydrolysis of electron beam as the only pretreatment and combined to steam explosion. For enzymatic hydrolysis it was used the commercial enzymes from Novozymes. The radiation processing promotes changes in structure and composition of sugarcane bagasse, increasing the solubility, that is related to hemicellulose and cellulose cleavage, and also increasing the enzymatic conversion yield. In the case of exploded bagasse there is no changes in the enzymatic hydrolysis yield, however the electron beam processing promoted a 67% reduction of furfural, that is formed in the steam explosion process.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Bagaço de Cana-de-Açúcar	13
1.1.1. Celulose	13
1.1.2. Hemicelulose	16
1.1.3. Lignina	18
1.2. Obtenção de Etanol a partir do Bagaço de Cana	20
1.2.1. Pré-Tratamento do Bagaço de Cana	20
1.2.2. Craqueamento a vapor ou explosão a vapor	21
1.2.3. Pré-tratamento químico	22
1.2.4 Subprodutos do pré-tratamento	23
1.2.5 Hidrólise de Material Lignocelulósico	24
1.2.5.1 Hidrólise Química	25
1.2.5.2 Hidrólise Enzimática	27
1.3. Aplicações Ambientais da Radiação Ionizante	32
1.3.1 Aplicação da Radiação Ionizante no Pré-Tratamento de Lignocelulósicos	33
1.3.2. Mecanismo de Ação da Radiação Ionizante	35
1.3.3. Fontes de Radiação Ionizante	38
1.4. Técnicas Analíticas para Análise e Caracterização de Lignocelulósicos	41
1.5. Objetivo	43
1.6. Originalidade	44
 2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1 Materiais	46
2.2 Metodologia	46
2.3. Preparação das Amostras	47
2.4. Processamento por Feixe de Elétrons	47
2.4.1. Dosimetria do sistema de irradiação	48
2.5. Pré-tratamento das amostras por Explosão a Vapor	50
2.6. Análises Químicas	51
2.6.1. Caracterização do Bagaço	52
2.6.2. Determinação de açúcares	53
2.6.3. Espectroscopia do infravermelho - FTIR	54
2.6.4. Determinação de produtos de degradação e inibidores	55

2.7. Hidrólise Enzimática	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Caracterização do bagaço de cana “in natura” e irradiado	60
3.2. Avaliação dos açúcares liberados	63
3.3. Espectroscopia do Infravermelho do Bagaço de Cana	71
3.4 Efeitos do processamento por feixe de elétrons na hidrólise enzimática	76
3.5. Efeito do pré-tratamento combinado por explosão a vapor e irradiação na hidrólise enzimática	78
3.6. Avaliação da mistura de enzimas	81
4. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85
PUBLICAÇÕES	99

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da celulose indicando a disposição da celulose, hemicelulose e lignina	14
FIGURA 2. Estrutura estereoquímica da celulose	15
FIGURA 3. Representação das ligações de hidrogênio na molécula de celulose	16
FIGURA 4. Estrutura das pentoses, hexoses e ácidos urônicos da hemicelulose	17
FIGURA 5. Estrutura estereoquímica da hemicelulose	18
FIGURA 6. Principais constituintes da lignina	19
FIGURA 7. Segmento estrutural de Lignina	20
FIGURA 8. Decomposição de celulose, hemicelulose e lignina e formação dos principais compostos inibidores	24
FIGURA 9. Mecanismo de quebra da celulose na hidrólise enzimática sob ação dos CBHs, EGs e BG de <i>Trichoderma reesei</i>	30
FIGURA 10. Esquema de um acelerador de feixe de elétrons do tipo Dynamitron e seus principais constituintes	40
FIGURA 11. Sistema de irradiação das amostras de bagaço de cana no acelerador de elétrons IPEN-CTR	48
FIGURA 12. Distribuição dos dosímetros na bandeja para irradiação	50
FIGURA 13. Amostras de bagaço de cana “in natura” (A) e explodido a vapor (B)	51
FIGURA 14. Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR Infra-red spectrophotometer, Perkin Elmer, modelo Spectrum 100, instalado no laboratório do CTR- IPEN	55
FIGURA 15. Fração composicional do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado com doses absorvidas até 100 kGy	61
FIGURA 16. Fração composicional do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado com elevadas doses absorvidas até 500 kGy	62
FIGURA 17. Visualização da parte solúvel (extração aquosa) de amostra de bagaço de cana após irradiação com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas.....	63
FIGURA 18. Espectro de padrão de açúcares (200 mg.L ⁻¹) obtido no CLAE detector ELSD	64

FIGURA 19. Espectro de açúcares liberados após a irradiação do bagaço de cana com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas comparado ao padrão de açúcares	65
FIGURA 20. Comportamento dos compostos referentes aos picos A, B, C e D em relação às doses aplicadas comparados aos açúcares conhecidos	66
FIGURA 21. Espectro de açúcares liberados após a irradiação do bagaço de cana com feixe de elétrons com 50kGy (verde) e após a hidrólise ácida em diferentes tempos (azul, rosa e marrom)	67
FIGURA 22. Variação da concentração dos açúcares livres no bagaço de cana após a irradiação com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas	68
FIGURA 23. Conversão de celulose a glicose e de hemicelulose a arabinose no bagaço de cana irradiado com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas	69
FIGURA 24. Concentração de ácido acético liberado no bagaço de cana irradiado com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas	70
FIGURA 25. Espectros de FTIR do bagaço de cana “in natura” e das frações celulose alfa e beta, lignina e hemicelulose com identificação das bandas com funções mais importantes	72
FIGURA 26. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 650 a 1200 cm^{-1}	73
FIGURA 27. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 1100 a 1800 cm^{-1}	74
FIGURA 28. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 2800 a 3700 cm^{-1}	75
FIGURA 29. Conversão de celulose à glicose após 24 h e 48 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana irradiado na faixa de dose absorvida até 100 kGy (A) e até 500 kGy (B)	77
FIGURA 30. Variação da composição relativa do bagaço de cana “in natura”, explodido e irradiado em diferentes doses absorvidas	78
FIGURA 31. Concentração de Furfural antes e após hidrólise enzimática nas amostras pré-tratadas com explosão a vapor seguida de irradiação com feixe de elétrons	79
FIGURA 32. Variação da concentração de açúcares solúveis no bagaço de cana explodido em função da dose absorvida	80

FIGURA 33. Conversão de celulose a glicose pelos processos combinados de explosão a vapor e irradiação em diferentes doses absorvidas em 17h, 24h e 48 h de hidrólise enzimática	81
FIGURA 34. Conversão de celulose em glicose em 24h e 48h para as diferentes misturas de enzimas e bagaço pré-tratado por irradiação	82
FIGURA 35. Conversão de celulose em glicose em 24h e 48h para as diferentes misturas de enzimas e bagaço pré-tratado por explosão a vapor e irradiação	83

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Complexos enzimáticos comerciais fornecidos pela Novozymes 57

TABELA 2. Composição das misturas enzimáticas e dosagens utilizadas..... 58

TABELA 3. Resultados das doses absorvidas e desvio padrão obtidas com os dosímetros CTA e Gafchromic após irradiação com feixe de elétrons 60

TABELA 4. Alterações relativas considerando as doses absorvidas após irradiação do bagaço com feixe de elétrons76

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental causada pela atividade industrial e pelo uso de veículos automotores, assim como o esgotamento das fontes de energia fóssil tem levado a sociedade, as organizações sociais e as instituições de pesquisas à procura por fontes de energia renováveis e mais limpas.

Ao longo de sua história, o Brasil tem se destacado como pioneiro nas pesquisas por fontes renováveis de energia e um marco nessa história foi o uso do etanol produzido a partir da cana-de-açúcar como combustível para automóveis a partir da década de 70.

Na produção de etanol de cana-de-açúcar cerca de um terço da cana esmagada é representado pelo bagaço que pode ser usado como fonte de energia térmica quando queimado em caldeiras na própria usina ou também como matéria-prima na produção de etanol celulósico. Motivados pela disponibilidade dessa matéria-prima, diversas instituições têm realizado pesquisas e estudos para o aproveitamento do bagaço de cana na produção de etanol. Essas investigações envolvem estudos sobre as tecnologias de pré-tratamento, hidrólise de materiais lignocelulósicos, enzimas hidrolíticas de celulose e processo de fermentação dos açúcares.

Entre os processos de pré-tratamento o ataque com radical hidroxila (OH.) mostra-se como uma alternativa eficiente para a oxidação de compostos orgânicos em moléculas mais simples para potencialização do processo enzimático de material lignocelulósico, dessa forma este trabalho insere-se nos projetos intitulado “Studies of cellulose hydrolysis from sugarcane bagasse to production of ethanol bio-fuel and new polyssaccharides polymers applying ionizing radiation”, financiado pela Agência Internacional de Energia Atômica, AIEA (Research Contract No. 14709), e “Estudo da Hidrólise da Celulose do Bagaço-de-Cana utilizando o Processo de Oxidação Avançada por Radiação Ionizante para Obtenção de Etanol”, financiado pela

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP. Ambos foram desenvolvidos em convênio com o Centro de Tecnologia Canavieira, CTC, situado em Piracicaba, SP, que atua há mais de 30 anos no desenvolvimento de tecnologias inovadoras para o setor canavieiro.

1.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar

O bagaço de cana é produzido nas usinas numa proporção de 280 kg/ton de cana esmagada. Trata-se um material altamente energético utilizado principalmente como fonte de energia nas usinas. Sua composição química o torna um material de elevado potencial tecnológico, principalmente para a produção de etanol (Ereno, 2007).

O bagaço apresenta uma composição média de 50% de umidade, 2% sólidos solúveis em água (Brix), 46% de fibras (32 – 50% de celulose, 19 – 25% de hemicelulose e 23 - 32% de lignina) e 2% de cinzas. A celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (Pandey *et al.*, 2000; Mosier, 2005).

Nas fibras do bagaço da cana-de-açúcar são encontradas as frações de polissacarídeos recobertas de lignina, possuindo uma camada intermediária de hemicelulose e uma camada interna de celulose (FIG.1) (Pandey *et al.*, 2000, Hassuani, 2005).

1.1.1. Celulose

A celulose é um polissacarídeo amplamente encontrado na natureza em plantas superiores e em organismos primitivos como algas e bactérias e é o principal componente da parede celular vegetal (Fengel & Wegener, 1989).

FIGURA 1. Estrutura da celulose indicando a disposição da celulose, hemicelulose e lignina (Santos et al., 2012)

A massa molar média da celulose varia amplamente dependendo da sua origem ($5,7 \times 10^4$ a $1,5 \times 10^6$ g/mol). O tamanho da cadeia é normalmente determinado pelo grau de polimerização (DP), que corresponde ao número médio de unidades de glicose presentes em uma molécula de celulose que é da ordem de 500 a 10.000. (Almeida, 2007; Fan et al., 1987).

A estrutura específica da celulose é formada pela união de moléculas de β -glicose, através de ligações β -1-4-glicosídicas. Nessa estrutura duas unidades de glicose são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxílicos, dando origem à molécula de celobiose. As pontes de hidrogênio das microfibras da celulose formam uma rede que é a espinha dorsal da estrutura da parede celular (FIG.2) (Glasser & Kelly, 1987).

FIGURA 2. Estrutura estereoquímica da celulose (Glasser & Kelly, 1987).

Esse arranjo favorece a organização de uma cadeia de polímeros firmemente empacotada, altamente cristalina, insolúvel em água e resistente a despolimerização. As cadeias de celulose possuem organização fibrilar, com ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares, apresentando regiões cristalinas e amorfas que ocorrem em intervalos irregulares, mostrado na FIG. 3 (Browning, 1967; Fengel & Wegener, 1989; Mosier, et al., 2005).

Nas regiões amorfas, as ligações de hidrogênio ocorrem em menor grau. As regiões cristalinas são organizadas na forma de microfibrilas e são menos acessíveis à agentes químicos e enzimáticos. Estima-se que a porção de região cristalina seja de 50% a 90% da celulose (Fan et al., 1980).

FIGURA 3. Representação das ligações de hidrogênio na molécula de celulose (Santos, et al., 2012)

1.1.2. Hemicelulose

A hemicelulose é uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses, ácidos urônicos e grupos de acetila, que podem ser lineares ou ramificados, são amorfos e possuem peso molecular relativamente baixo, apresentando baixo grau de polimerização (50 a 300) (Holtzapple, 1993b).

As hemiceluloses são divididas em pentosanas e hexosanas. A hidrólise das pentosanas produz pentoses (xilose e arabinose), que são monossacarídeos que apresentam em sua estrutura cinco átomos de carbono. A hidrólise das hexosanas produz hexoses (glicose, manose e galactose), que são monossacarídeos que apresentam em sua estrutura seis átomos de carbono. As estruturas químicas das pentoses, hexoses e ácidos urônicos são apresentados na FIG.4 (Fengel & Wegener, 1989; Holtzapple, 1993b).

FIGURA 4. Estrutura das pentoses, hexoses e ácidos urônicos da hemicelulose (Sjöstron, 1991)

As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose proporcionando elasticidade e impedindo que as microfibrilas se toquem. São mais solúveis que a celulose podendo ser isoladas por extração alcalina. No bagaço da cana, a hemicelulose está presente numa proporção de 19% a 25% e é composta principalmente por xilose que se une por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4, como apresentado na FIG.5 (Holtzaple, 1993b; Ramos, 2003).

FIGURA 5. Estrutura estereoquímica da hemicelulose . Ac: grupo acetila; α -Araf: α -Arabinofuranose; α -4-o-Me-GlcA: α -4-o-ácido metilglucorônico (Glasser & Kelly, 1987).

1.1.3. Lignina

A lignina é um heteropolímero amorfo, uma rede polimérica tridimensional constituído de três unidades diferentes de fenilpropanos como o álcool p-cumarílico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, cujas estruturas são apresentadas na FIG. 6, interligadas via sete tipos de ligações C-C ou C-O-C, grupos metoxila se ligam nas posições 1 e 2 (Browning, 1967; Glasser & Kelly, 1987).

A função da lignina é dar apoio estrutural à planta, isto é, rigidez, resistência mecânica, microbiológica e impermeabilidade à água (Fengel & Wegener, 1989; Mosier et al., 2005).

FIGURA 6. Principais constituintes da lignina (Fengel & Wegener, 1989).

A classificação das ligninas é definida de acordo com a abundância de seus precursores: a lignina guaiacil, ocorre em todas as madeiras moles, é produzida pela polimerização do álcool coniferílico; a lignina guaiacil-siringil, típica de madeiras duras é um copolímero dos álcoois sinapílico e coniferílico; a lignina siringil-guaiacil-p-cumaril, formada a partir dos álcoois sinapílico, coniferílico e p-hidroxi-cumarílico, são comumente encontradas em gramíneas como a cana-de-açúcar. Pode-se observar na FIG. 7 a complexidade da estrutura da lignina (Fengel & Wegener, 1989).

FIGURA 7. Segmento estrutural de Lignina (Brunow, 2001)

1.2 Obtenção de Etanol a partir do Bagaço de Cana

Para produção de etanol a partir do bagaço de cana são necessárias três etapas principais, que são o pré-tratamento, a hidrólise e a fermentação.

1.2.1. Pré-tratamento do Bagaço de Cana

As tecnologias de hidrólise requerem um pré-tratamento físico, químico, biológico ou físico-químico para eliminação de impurezas e preparo do material lignocelulósico, de tal forma que favoreça as reações de conversão dos carboidratos

em açúcares redutores. Dependendo do tipo de pré-tratamento utilizado pode ocorrer a desorganização da estrutura da biomassa, a separação das frações de celulose da de hemicelulose, ou ainda a remoção da lignina Lynd et al., 1996; Laser et al., 2002).

Um pré-tratamento adequado deve evitar a necessidade de reduzir o tamanho da partícula, deve preservar as pentoses (hemicelulose), deve limitar a liberação de produtos de degradação, que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos e ainda é interessante que minimize a demanda de energia e assim os custos envolvidos em todo o processo. O resultado do pré-tratamento deve ser balanceado contra seu impacto no custo das etapas dos processos posteriores, custo operacional, custo de capital e custo da biomassa (Mosier et al., 2005; Hassuani, 2005; Thompson et al., 2007, Lee & Shah, 2012).

Os processos de pré-tratamento mais comuns são o craqueamento a vapor, o químico e o ácido (Brenner et al., 1979; Soares et al., 2004; Khan et al., 2006; Yang & Wyman, 2008; Ogeda & Petri, 2010).

1.2.2. Craqueamento a vapor ou explosão a vapor

A explosão a vapor é um dos principais processos utilizados para a hidrólise de material lignocelulósico. Neste processo, a biomassa triturada é submetida à pressurização ($12 - 25 \text{ kgf/cm}^2$) e temperatura elevada (180° a 240°C), por tempos de permanência curtos (10 segundos a 5 a 10 minutos). Em seguida, efetua-se uma descompressão instantânea do sistema, com a finalidade de causar a ruptura nas ligações do material. O produto final apresenta a hidrólise total da hemicelulose, a fusão da lignina e a diminuição do grau de polimerização da celulose (Sun & Cheng, 2002; Lee & Shah, 2012).

O processo por explosão a vapor não requer necessariamente adição de produtos químicos, sendo preferível frente aos tratamentos com adição de ácidos. Sabe-se, entretanto, que o desempenho do processo pode ser melhorado quando o

material recebe uma impregnação prévia com ácido sulfúrico diluído, o que potencializa a quebra da hemicelulose (Mosier et al., 2005; Khan et al., 2006).

1.2.3. Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico emprega ácidos e reagentes para solubilização da hemicelulose e lignina, dentre eles tem-se o processo *Organosolv*, que utiliza uma mistura de solventes orgânicos e ácidos orgânicos capazes de remover a lignina e a hemicelulose. O processo baseia-se no cozimento da biomassa lignocelulósica com o solvente formado por ácidos orgânicos (H_2SO_4 e HCl concentrados), metanol, acetona e etanol, em temperatura e pressão elevadas. O solvente orgânico é removido e recuperado por evaporação e destilação, essa remoção é necessária, pois os solventes são inibidores dos microrganismos da hidrólise enzimática e da fermentação (Sun, & Cheng, 2002; Soares et al., 2004).

No pré-tratamento com ácido diluído o material é misturado a uma solução de ácido diluído numa relação de 1% a 3% da biomassa seca e submetido à temperaturas de até 200 °C por tempo curto, da ordem de segundos. A conversão da hemicelulose é eficiente (cerca de 90%) e conduz a uma alta recuperação dos carboidratos monoméricos. A biomassa tratada apresenta melhor digestibilidade ácida ou enzimática. A desvantagem deste tratamento está associada à necessidade de um pós-tratamento de neutralização da acidez com calcário, gerando como resíduo o gesso. Na recuperação do gesso, utiliza-se ácido sulfúrico. O processo é complexo e seu descarte representa um problema ambiental sem solução adequada até os dias de hoje. Outra desvantagem é a formação de produtos de degradação dos açúcares como o furfural (Palmqvist et al., 2000; Soares et al., 2004).

Outro tipo de pré-tratamento químico é o que utiliza soluções alcalinas diluídas em condições operacionais moderadas de temperatura e pressão. A reação com álcalis provoca um inchamento da biomassa levando ao aumento da porosidade, assim como à diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização com a quebra das ligações lignina-carboidrato. Em alguns casos, esse pré-

tratamento pode ser conduzido à temperatura ambiente, porém demandam tempos reacionais elevados, da ordem de horas, dias ou semanas (Sun & Cheng, 2002; Sun et al., 2004).

A desvantagem do pré-tratamento alcalino em relação ao ácido é que algumas bases podem ser convertidas em sais irrecuperáveis ou incorporadas como sais na biomassa e a vantagem do tratamento alcalino é a menor degradação de açúcares (Chang & Holtzaple, 2000).

1.2.4 Subprodutos do pré-tratamento

O material lignocelulósico pré-tratado com processos térmicos, ácidos ou alcalinos leva a formação de produtos de degradação que são inibidores da hidrólise enzimática e do crescimento microbiano durante a etapa de fermentação.

Os pré-tratamentos que combinam reagentes ácidos e temperatura elevadas podem levar a degradação dos açúcares e da lignina gerando ácidos orgânicos. Na FIG. 8 é apresentado um esquema de degradação da celulose, da hemicelulose e da lignina com os principais compostos formados. O ácido acético é liberado a partir do grupo acetila na fração de hemicelulose. Na degradação da xilose forma-se o furfural e na degradação das hexoses (glicose, manose e galactose), o inibidor produzido é o 5-hidroximetil furfural, HMF, os quais são produtos inibitórios da etapa da fermentação. A degradação de furfural e HMF leva à formação de ácido fórmico que também é inibidor da fermentação. Compostos fenólicos como o ácido 4 hidroxibenzóico, vanilina, catecol e siringaldeído, podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina (Mussato & Roberto, 2004, Palmqvist et al., 2000).

Uma variedade de métodos biológicos, físicos e químicos podem ser aplicados com a finalidade de reduzir a concentração de inibidores antes da etapa de hidrólise enzimática e fermentação. A lavagem deste material com água pode ser usada para a remoção desses subprodutos. Entretanto, essa lavagem poderá diminuir o rendimento da sacarificação e da fermentação, em virtude da remoção dos açúcares solúveis, gerados na hidrólise (McLaren, 1978; Soares et al, 2011).

FIGURA 8. Decomposição de celulose, hemicelulose e lignina e formação dos principais compostos inibidores (Palmqvist, 2000)

1.2.5. Hidrólise de Material Lignocelulósico

Após o pré-tratamento, o material lignocelulósico deve ser submetido ao processo de hidrólise onde ocorre a quebra das ligações das cadeias de celulose e hemicelulose liberando os seus respectivos açúcares. O processo de hidrólise pode ser realizado por duas rotas que são a química ou enzimática.

1.2.5.1. Hidrólise Química

A hidrólise química pode se dar pelo uso de ácidos concentrados ou diluídos. Os processos por ácido concentrado empregam ácido sulfúrico como agente de pré-tratamento, seguido pelo estágio de hidrólise com ácido diluído. O ácido concentrado desfaz a estrutura cristalina da celulose. Assim que a estrutura da celulose passa ao estado amorfo, torna-se possível a sua transformação completa e rápida em açúcares redutores, empregando condições menos severas de reação. O rendimento obtido é alto, porém o processo exige um investimento elevado em equipamentos. A recuperação do ácido sulfúrico exige consumo energético elevado. A operação em presença de um ácido forte provoca corrosão intensa e, conseqüentemente, problemas nos equipamentos, os quais requerem ligas especiais. A etapa de hidrólise gera subprodutos de reação indesejáveis, tais como: ácidos orgânicos de baixo peso molecular e compostos furânicos e fenólicos, que inibem a fermentação alcoólica (Hassuani, 2005).

Os processos que empregam ácidos diluídos, em geral, utilizam como catalisador o ácido sulfúrico diluído a 0,1 - 0,7% ou o ácido clorídrico. A hidrólise acontece em dois estágios para maximizar os rendimentos em açúcares redutores provenientes da hemicelulose e da celulose. O primeiro estágio é realizado em condições intermediárias para hidrolisar a hemicelulose, enquanto que o segundo, operando em condições mais severas, converte a celulose (Hassuani, 2005).

As pesquisas na área de produção de álcool de celulose por via ácida tiveram início em 1977, na Fundação de Tecnologia Industrial (FTI) - Lorena, e as atividades realizadas compreenderam estudos em laboratório, estudos em bancadas e escala-piloto. Os trabalhos foram continuados pela Faenquil, atualmente USP - Campus de Lorena, sendo este, o mais antigo grupo atuante no Brasil (Hassuani, 2005).

Outra pesquisa em hidrólise foi desenvolvida no Brasil em 1979, pela CODETEC - Companhia de Desenvolvimento Tecnológico, em conjunto com a companhia Aços Villares e com a Fundação Universidade Estadual de Campinas,

quando realizaram pesquisas visando o desenvolvimento do processo de hidrólise ácida (H_2SO_4), contínua do bagaço da cana-de-açúcar e de palha de arroz (Projeto HIDROCON).

Esses trabalhos foram descontinuados mesmo com o fato de os testes piloto apresentarem resultados promissores. Atingindo a escala piloto, com uma unidade tendo operado desde outubro de 1981 até o final de 1983, foram atingidos rendimentos de sacarificação na faixa de 57% a 60% (Hassuani, 2005).

Várias plantas de hidrólise ácida foram instaladas durante a Segunda Guerra Mundial; processos catalisados por ácido diluído são ainda hoje usados na antiga União Soviética para produzir etanol e proteína unicelular, assim como o furfural. No entanto, as baixas taxas de conversão da celulose e da hemicelulose (50 - 60% do teórico) tornam economicamente inviável o uso destas plantas. Os processos catalisados por ácidos concentrados têm uma taxa de conversão com valores adequados, mas nestes processos, o custo de recuperação dos ácidos é muito alto. Todos estes processos operam em batelada (Hassuani, 2005).

O processo *Scholler-Madison* Soviético, também foi implantado em escala industrial no Brasil a partir de 1980, através da Coque e Álcool de Madeira S/A, COALBRA. Com a importação da tecnologia soviética, construiu-se uma fábrica com capacidade de produção de 30.000 L/dia de etanol. Esta planta não chegou a atingir a sua plena capacidade operacional, por fatores econômicos desfavoráveis, tendo suas atividades encerradas em meados de 1987, quando se dedicava à produção de furfural.

A rota de hidrólise ácida também foi o caminho escolhido pelo grupo industrial Dedini, de Piracicaba, no projeto desenvolvido em parceria com o CTC e financiado pela FAPESP. Batizado de Dedini Hidrólise Rápida, DHR, o processo está em funcionamento, em fase de testes, em uma planta piloto de demonstração, com capacidade para 2 mil quilos de bagaço por hora e está instalada na cidade de Pirassununga, SP, (Ereno, 2007; Rev. Quim. Der., 2007).

1.2.5.2. Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea catalisada pelas celulasas, sendo distinguida por um substrato insolúvel (celulose) e um catalisador solúvel (enzimas). A completa hidrólise da celulose requer a ação combinada de múltiplas enzimas (celulasas) com diferentes especificidades ao substrato (Lynd, et. al., 1996; Laser, et.al, 2002).

Os processos enzimáticos requerem condições brandas, temperaturas próximas a 50 °C, pH na faixa 4,5 - 6,0 e operação na pressão atmosférica, permitindo ainda, conversões superiores às obtidas pela hidrólise química, menor destruição de açúcares e menor acúmulo de inibidores de fermentação. Alguns fatores como porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose e conteúdo de lignina e hemicelulose do material de estudo devem ser levados em consideração, pois influenciam a cinética da reação (Lehninger, 1985; Sewalt et al., 1997).

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea e requer o contato físico direto entre enzima e substrato. As enzimas difundem-se em solução aquosa na superfície das partículas, através das barreiras físicas, como a lignina, adsorvendo-se na superfície do substrato e, em seguida, catalisam a hidrólise. Estas reações são complexas e podem ser afetados pelas propriedades físico-químicas do substrato, como a cristalinidade, o grau de polimerização, área superficial de contato e o teor de lignina e hemicelulose (Dekker, 1985b; Henrissat et al., 1998).

De maneira a maximizar o rendimento da hidrólise, deve-se utilizar uma combinação de enzimas otimizadas. Uma combinação de enzimas depende diretamente da composição das várias frações (celulose, hemicelulose e lignina) do substrato. As condições do pré-tratamento devem ser ajustadas para obter a máxima conversão dos polissacarídeos em açúcares fermentescíveis e a menor carga de enzimas necessária para sua conversão (Hassuani, 2005).

Um substrato que foi pré-tratado, por exemplo, com ácido diluído apresenta em seu hidrolisado uma boa porção de hemicelulose. As enzimas *Celulase* devem ser usadas de forma combinada para hidrolisar a celulose. Num pré-tratamento utilizando pH neutro a alcalino pode-se adicionar a *Xilanase* para hidrolisar tanto as frações de hemicelulose quanto a celulose. (Fang et al., 1999; Sun & Cheng, 2002).

Processos catalisados por enzimas são objeto da maior parte dos estudos efetuados atualmente no mundo; em princípio, por oferecerem maior conversão e um grande potencial de redução de custos a médio/longo prazo. Há várias opções de processos em estudo hoje, mas nenhum em fase comercial.

Celulases

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma ampla variedade de bactérias e fungos, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos. Os complexos de celulase mais utilizados são produzidos pelos fungos da espécie *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*. As celulases atuam na hidrólise da celulose, gerando celo-oligômeros e celobiose, que são quebrados em monômeros de glicose (Henrissat et al., 1998).

O complexo enzimático é formado basicamente, por três enzimas principais: endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase e β -glicosidase ou celobiase. As enzimas atuam de modo sinérgico para que ocorra a degradação da celulose.

As celulases podem ser classificadas de acordo com sua especificidade ou semelhanças estruturais na enzima. Com base na especificidade do substrato encontram-se as celobiohidrolases (CBHs), também chamadas exo-1,4- β -D-glucanases e endo-1,4- β -D-glucanases (EGs). A terceira classe de enzimas que atua em conjunto é as β -glicosidases (BG) (Mansfield et al. 1963; Lu et al., 2002; Sun & Cheng, 2002).

Endo-1,4- β -glucanases, são enzimas que catalisam a hidrólise interna de ligações β -1,4-D-glicosídicas da celulose. Podem hidrolisar também ligações β -1,4 em D-glicanas que contém ligações β -1,3. As endoglucanases são também conhecidas como carboximetilcelulases ou endocelulase. Seu substrato natural é a celulose e xiloglucana, apresentando especificidade variável sobre carboximetilcelulose (CMC), avicel (celulose cristalina), β -glicana e xilana. Têm como principal objetivo hidrolisar o meio da cadeia de celulose, em regiões amorfas ou nas superfícies das microfibras, formando cadeias terminais de menor peso molecular, celodextrinas e celobiose (Bhat & Bhat, 1997; Lu et al., 2002).

Celobiohidrolases ou exo-1,4- β -glucanases, são conhecidas também como avicelases ou exocelulase. Catalisam a hidrólise de ligações β -1,4-D-glicosídicas na celulose e celotetraose, nas regiões cristalinas da celulose, liberando celobiose das extremidades redutoras e não redutoras da cadeia (Bhat & Bhat, 1997; Mani et al., 2002).

1,4- β -glicosidases, são conhecidas como celobiasas. Catalisam a hidrólise de resíduos β -D-glicose nos terminais não redutores, liberando β -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -galactosídeos, α -L-arabinosídeos e β -D-xilanosídeos.

A ação enzimática na celulose inicia-se pela ação das endo-1,4- β -glucanases que quebram aleatoriamente as ligações β -1,4-glicosídicas das regiões amorfas da cadeia da celulose, gerando fragmentos menores, chamados de oligômeros (FIG.9).

FIGURA 9. Mecanismo de quebra da celulose na hidrólise enzimática sob ação dos CBHs, EGs e BG de *Trichoderma reesei*. C: região cristalina; R: grupos terminais redutores (círculos preenchidos); NR: grupos terminais não redutores, CBH I e II: exoglucanases, EG: endoglucanases (Teeri, 1997).

Enzimas acessórias das Celulases

A celobiose é um dos principais produtos da ação combinada das endo-e exo-1,4- β -glucanases sobre a celulose e verificou-se que sua presença inibe fortemente a ação destas enzimas. O grau de inibição depende da afinidade do inibidor e do substrato pelos sítios ativos das enzimas e pela proporção das concentrações do inibidor e do substrato (Mandels & Reese, 1963).

Dois grupos de enzimas foram isolados do complexo de celulase para auxiliar na hidrólise enzimática da celulose pela remoção de celobiose do meio. O primeiro grupo corresponde a enzima hidrolítica β -glicosidase ou celobiase, que é produzida por diversos fungos e está presente nos complexos de celulase, que

hidrolizam a celobiose e também celodextrinas (triose e tetraose) à glicose (Eriksson, 1990).

Hemicelulases

A composição da hemicelulose nos materiais celulósicos pode ser formada principalmente por heteroxilana ou heteromanana dependendo do material. No bagaço de cana a hemicelulose é formada principalmente por heteroxilana. Nas madeiras macias a hemicelulose é formada principalmente por hetero-manana (Dekker, 1985a).

As enzimas envolvidas na hidrólise da hemicelulose são hidrolases específicas que clivam determinados tipos de ligações existentes no polímero. As enzimas que hidrolisam a cadeia principal são a endo- β -1,4-xilanase, a β -xilosidase, a endo- β -1,4-manase e a β -manosidase e as enzimas que hidrolisam as cadeias laterais são a β -glucuronidase, a acetil-xilana-esterase, a β -L-arabinofuranosidase e a β -galactosidases.

Na hidrólise enzimática da xilana, as endo- β -1,4-xilanases hidrolisam ligações β -1,4-xilosídicas ao acaso entre unidades monoméricas de xilose, gerando fragmentos de menor massa molecular, chamados de xilo-oligômeros. As β -xilosidases hidrolisam os dímeros e trímeros de xilose (gerados pela ação das endo- β -1,4-xilanases) em xilose (Kirk & Cullen, 1998; Jeffries, 1994).

A combinação de xilanases e celulases visando a completa conversão de material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis tem sido amplamente estudado e demonstra melhora no rendimento de açúcares e consequentemente no rendimento de produção de etanol (Dekker, 1985; Kuhad et al., 1997).

Enzimas acessórias da hemicelulases

Entre as enzimas coadjuvantes que auxiliam a hidrólise da hemicelulose tem-se a acetil-xilana-esterase que age em cooperação com as endo- β -1,4-xilanases, hidrolisando as cadeias laterais da xilana, com liberação de grupos acetil.

A remoção do grupo acetil da cadeia, chamada de deacetilação, diminui a solubilidade da xilana em água, o que leva a precipitação da xilana. Mesmo que o substrato esteja menos solúvel, a deacetilação geralmente aumenta a susceptibilidade do substrato ao ataque enzimático. A acetil-xilana-esterase é produzida por diferentes espécies de fungos como: *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* e *Schizophyllum commune*. Outra enzima é a β -L-arabinofuranosidase que hidrolisa facilmente a ligação β -1,3 do terminal não redutor do grupo substituinte de arabinofuranosil nas cadeias das xilanas (Jeffries, 1994).

A presença do grupo de ácido urônico na extremidade da cadeia de xilana estabiliza as ligações xilosídicas mais próximas, sendo necessária a sua remoção para a continuação da hidrólise enzimática da xilana nesta região. As ligações de ácidos urônicos resistem a ação das xilanases sendo necessária a ação específica das β -glucuronidasas. A β -glucuronidase produzida pelo fungo *Agaricus bisporus* foi parcialmente caracterizada, apresentando máxima atividade à 52 °C e pH igual a 3,3. Em virtude de seu tamanho, ela não consegue penetrar nas estruturas microporosas do material lignocelulósico. As β -glucuronidasas agem em sinergismo com as endoxilanases e β -xilosidasas na hidrólise de glucuronoxilana. Os rendimentos de xilose aumentam significativamente na presença desta enzima (Jeffries, 1994).

O ácido ferúlico esterase e o ácido cumárico esterase são produzidos por *S. commune*. O ácido ferúlico esterase auxilia na hidrólise enzimática através da remoção dos resíduos de ácido ferúlico da parede vegetal e o ácido cumárico esterase através da remoção de resíduos de ácido cumárico presentes na parede vegetal. Na FIG. 10 estão representados os tipos de ligações na xilana e as enzimas que as hidrolisam (Biely, 1985; Jeffries, 1994)

1.3. Aplicações ambientais da Radiação Ionizante

Os processos de oxidação avançada com ozônio, UV e H₂O₂ são muito utilizados na indústria de papel e celulose, principalmente em função do poder branqueador e da sua natureza não poluente. A ação da radiação ionizante engloba

efeitos desses três compostos simultaneamente, pois é mais penetrante que a radiação UV e na radiólise da água, além do radical hidroxila que é altamente oxidante, forma H_2O_2 pela recombinação de radicais e íons superóxido pela reação do OH com o oxigênio dissolvido. (Dziedziela, 1984; Reyes, 1998; Woods, 1998).

Nos últimos anos a modificação de polímeros naturais pela radiação ionizante para aplicações específicas tem alcançado um sucesso considerável. O processamento de polímeros naturais pela radiação ionizante tem se mostrado simples, eficaz e comercialmente atrativos nas áreas da saúde, agricultura e ambiental. Exemplos destas aplicações é o uso de polissacarídeos de baixo peso molecular, processados por irradiação, como promotores de crescimento e proteção de plantas, assim como a produção de uma variedade de hidrogéis baseados em polímeros naturais ou compósitos de polímeros sintéticos. Novas áreas de uso de polímeros naturais têm sido exploradas como a farmacêutica, nanotecnologia, biomateriais, biocombustíveis e bioquímicos (Duarte et al., 2006).

A tecnologia nuclear tem sido usada na proteção e conservação do meio ambiente. Seu emprego na destruição de compostos orgânicos tóxicos presentes em amostras ambientais, água potável, remediação de solos e efluentes industriais têm sido objeto de estudo de vários autores no Brasil e no mundo (Getoff & Solar, 1988; Duarte et al., 2006; Haji-Saeid, et al., 2007). Para isso podem ser utilizados como fontes de radiação tanto os radionuclídeos emissores gama como o ^{60}Co e os aceleradores de elétrons. A tecnologia nuclear tem sido utilizada também no estudo do comportamento dos pesticidas através de seu rastreamento por moléculas radiomarcadas com carbono-14, em todos os seguimentos do meio ambiente, como na translocação e biotransformação em solo, plantas e animais, fornecendo informações importantes sobre o produto na cadeia alimentar (Bachman & Gieszczyńska, 1982; Getoff et al., 1988; Haji-Saeid et al., 2006)

1.3.1 Aplicação da radiação ionizante no pré-tratamento de lignocelulósicos

Na literatura encontram-se vários estudos de sobre a utilização da radiação ionizante em material lignocelulósico com objetivos distintos, ou para melhorar a digestibilidade da biomassa e ser usada como ração animal, ou para

melhorar as características do produto final, no caso da indústria textil (algodão). O efeito da radiação ionizante em celulose purificada, tal como de algodão e de madeira, tem sido extensivamente estudado. Muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de hidrolisar a celulose para obter açúcares e outros compostos químicos (McLaren, 1978; Kumakura & Kaetsu, 1983, 1984; Gabrielli et al, 2000; Takács et al, 2000; Foldvary et al, 2003; Dubey et al, 2004; Khan et al, 2006).

Quando comparada a outros polímeros naturais, a celulose mostra uma grande suscetibilidade à degradação por radiação. Em estudos realizados por Takács et al., 1999, o grau de polimerização da celulose pura foi reduzido de 1600 para 300 após 10 kGy de dose e o número de clivagens para cada 1000 monômeros foi de 6 e 16, respectivamente, com doses de 3 kGy e 10 kGy.

Em estudos realizados por Vitti et al (1998), as amostras de bagaço da cana-de-açúcar e resíduos de cultura de arroz e algodão foram irradiadas com feixes de elétrons para verificar os efeitos da irradiação na digestibilidade da matéria seca e na sua composição química e estrutural, para uso em ração animal. Os tratamentos consistiram na aplicação de 200 kGy, 400 kGy, 600 kGy, 800 kGy e 1000 kGy com ou sem aplicação de amônia gasosa para o bagaço da cana-de-açúcar e 200 kGy com e sem amônia para os resíduos de cultura de arroz e algodão. A irradiação resultou na redução nos conteúdos de fibra bruta e fibra detergente neutro ($P < 0,01$). O teor de compostos fenólicos aumentou com a dose aplicada, sugerindo quebras na estrutura do complexo lignocelulósico. Verificou-se também, aumento na digestibilidade com o incremento da dose absorvida. Para o bagaço da cana-de-açúcar, as doses mais elevadas produziram um incremento de 24 unidades em digestibilidade em relação ao material não tratado; para os restos de cultura os aumentos foram menores.

Esse aumento na digestibilidade também foi comprovado em bagaço de cana e palhas de cereais quando submetidos à irradiação por Han et al. (1983), que utilizou radiação gama no tratamento de bagaço de cana e palhas de cereais com doses a partir de 500 kGy com o objetivo de aumentar a sua digestibilidade e obteve

O aumento na digestibilidade também foi comprovado em bagaço de cana ou palhas de cereais quando submetidos à irradiação com doses de 50 kGy são degradados e solubilizados em água, mas a produção direta de glicose a partir da biomassa por irradiação gama não foi obtido por causa da decomposição de glicose adicional. A Hidrólise de celooligômeros solubilizados ou ligeiramente (por exemplo, menos de 100 kGy bagaço irradiado pela celulase ou ácido seria mais aceitável para a produção de açúcares fermentáveis. A utilização de biomassa irradiada para a alimentação animal mostram-se promissoras. Como um método de pré-tratamento, a irradiação gama é equivalente em termos de digestibilidade ao tratamento de NaOH.

Como um método de hidrólise, no entanto, a irradiação tem algumas vantagens e desvantagens em relação à hidrólise ácida e enzimática convencional. A simplicidade do processo e a eficácia da clivagem da cadeia são as vantagens, entretanto pode ocorrer a perda da glucose devido à destruição do produto. No entanto, a comparação direta dos efeitos da irradiação com outros métodos é difícil, devido à natureza diferente dos agentes causadores e o resultado diferente que produz. (Han et al., 1983).

O principal desafio do uso feixe de elétrons como pré-tratamento é para a obtenção dos efeitos desejáveis aplicando-se doses tão baixo quanto for necessário para obter a quebra nos polissacarídeos, e, ao mesmo tempo, para evitar a perda dos açúcares devido à degradação controlada da celulose e hemicelulose. O controle da dose absorvida na irradiação do bagaço da cana é muito importante para evitar a degradação da glucose, xilose, galactose e arabinose apenas após a libertação, porque o açúcar é mais sensível à degradação do que na mistura. Açúcares simples apresentam quase 100% de degradação com doses absorvidas de 15 kGy. Quando a mistura de diferentes açúcares é irradiada como uma única amostra, a porcentagem de degradação é muito inferior.

1.3.2. Mecanismo de ação da radiação ionizante

Todas as formas de radiação ionizante interagem com a matéria transferindo sua energia para os átomos e moléculas presentes. No primeiro

momento da interação, ocorre a ionização e excitação dos átomos, resultante da troca de energia entre a radiação e a matéria. Este efeito se processa num intervalo de tempo muito curto, da ordem de 10^{-13} s a 10^{-12} s. Na segunda fase de interação, ocorre a ruptura das ligações das moléculas e formação de radicais livres. Esta ação química processa-se num intervalo de tempo estimado em 10^{-9} s (Getoff, 1996; Swinwood, 1994).

A interação da radiação com a matéria pode ocorrer por dois mecanismos: direto, onde a radiação interage diretamente com as moléculas em questão e o indireto, onde a radiação interage com as moléculas de água gerando espécies químicas muito reativas e difusíveis que interagem com a matéria (Getoff, 1996).

A dose de irradiação absorvida é definida como a quantidade de energia transferida da radiação ionizante para a matéria num determinado volume, dividida pela massa contida neste volume. Essa grandeza abrange todos os tipos de radiação ionizante e é válida para qualquer tipo de material absorvedor. A unidade de dose absorvida utilizada é o joule por quilograma (J/kg) ou Gray (Gy), que substituiu o rad após 1979 e corresponde às seguintes relações (Woods, 1988; Getoff, 1996):

$$(1\text{rad} = 100 \text{ ergs/s; } 1 \text{ Gy} = 100 \text{ rad})$$

O rendimento de íons produzidos pela radiação é expresso como a razão da quantidade de produtos produzidos pela dose absorvida. Na química da radiação esse rendimento é denominado G cuja unidade é mol.J^{-1} e significa o número de radicais, moléculas ou íons que são formados (ou destruídos) em uma solução pela absorção de 100 eV de energia incidente (Schmelling, et al., 1998; Duarte, 1999).

A radiólise dos compostos orgânicos pode se dar pela interação direta da radiação ionizante na molécula ou pela interação indireta com os produtos da radiólise da água. A ação direta da radiação é insignificante mesmo em casos de concentrações altas dos compostos. Na radiólise indireta a molécula do composto

reage com os radicais e^-_{aq} , $H^\cdot$, $OH^\cdot$ e o produto molecular H_2O_2 que são formados na seguinte proporção (Getoff, 1986; Woods, 1998).

Dos produtos formados, as espécies mais reativas são o radical hidroxila oxidante ($OH^\cdot$), o elétron aquoso redutor (e^-_{aq}) e o átomo de hidrogênio ($H^\cdot$). Assim, os processos químicos básicos vão se dar pela reação com estas três espécies:

Elétron aquoso

A reação do elétron aquoso com compostos orgânicos e inorgânicos específicos tem sido estudada extensivamente; é um potente redutor e atua na transferência de um elétron, sendo importante sua reação com compostos halogenados. Uma reação generalizada é mostrada abaixo:

Átomo de hidrogênio

O processo de feixe de elétrons é o único que forma este radical. O $H^\cdot$ reage com os compostos orgânicos por dois processos gerais, a adição e a subtração de hidrogênio. Um exemplo de adição é a reação com a molécula de benzeno:

A segunda reação geral envolvendo o $H^\cdot$ é a subtração:

Radical hidroxila

O $OH^\cdot$ pode reagir de várias formas em solução aquosa, os tipos mais comuns de reação são: adição, abstração de hidrogênio, transferência de elétrons e

recombinação radical-radical. Reações de adição ocorrem prontamente com compostos aromáticos e alifáticos insaturados:

Reações de abstração ocorrem com moléculas saturadas e insaturadas, como aldeídos e cetonas:

Reações de transferência de elétrons são também comuns e ocorrem quando soluções aquosas são irradiadas com elétrons de alta energia. Por exemplo, reações envolvendo íons halogênios (X^-) podem ocorrer:

O $\text{X}_2^{\cdot-}$ Pode reagir com moléculas orgânicas formando compostos orgânicos halogenados. Os halogênios de maior interesse são o Cl^- e Br^- .

Peróxido de hidrogênio

A principal reação resultante na formação de H_2O_2 é a recombinação radical-radical envolvendo $\cdot\text{OH}$:

Pode ocorrer também a dissociação do peróxido de hidrogênio:

1.3.3. Fontes de Radiação Ionizante

No processo de oxidação avançada utilizando radiação ionizante empregam-se, basicamente, dois tipos de irradiadores: aqueles que utilizam radioisótopos artificiais emissores gama como Cobalto-60 e Césio-137 e os aceleradores de

elétrons. As fontes gama requerem blindagens especiais de concreto com paredes espessas e são usadas principalmente na esterilização de produtos médicos e irradiação de alimentos, onde a maior penetração da radiação é uma vantagem. Os aceleradores de elétrons são geralmente preferidos como fonte de radiação para aplicações ambientais.

A dinâmica do feixe de elétrons apresenta uma dependência entre o movimento das partículas e parâmetros do campo na estrutura de aceleração, criando forças de interação com o feixe em movimento. O produto da intensidade do feixe ou corrente elétrica formada por partículas carregadas em movimento no acelerador de elétrons (expressa em mA e eV) corresponde à potência do feixe de elétrons. A potência média do feixe de elétrons está diretamente relacionada ao rendimento da taxa de dose de irradiação (Woods, 1988; Getoff, 1999).

Os aceleradores podem ser classificados como Aceleradores de Ação Direta, Aceleradores Ressonantes R.F., Aceleradores Lineares Ressonantes e Aceleradores de Indução (American Society of Civil Engineers-1992).

Dentre os aceleradores de ação direta encontram-se aqueles cujo campo de aceleração é do tipo eletrostático de corrente contínua ou alternada excitado por um gerador de alta voltagem. Os aceleradores do tipo Dynamitron utilizam um tubo de vácuo com uma série de eletrodos, formando um campo eletrostático moldado para produzir uma boa transmissão do feixe (Getoff, 1996; Gehringer & Matschiner, 1998).

Os aceleradores de elétrons disponíveis comercialmente apresentam diferentes capacidades de operação, o que permite a escolha para finalidades específicas. Os principais aceleradores de elétrons são:

- Acelerador Van der Graaf: apresenta baixa potência, opera entre 0,4 MeV e 4,0 MeV com corrente de 1,0 mA;
- Aceleradores com transformador de núcleo isolado: tem baixa potência, operando com até 0,5 mEV com corrente alta, da ordem de centenas de mA;

- Aceleradores lineares por micro ondas (LINACS): possuem tensão e potência elevadas operando entre 10 kW e 100 kW;
- Aceleradores tipo Dynamitron: operam com potência (1,0 a 4,5 MeV) e corrente elevada (1,0 a 4,5 MeV e 50 a 100 mA), são apropriados para aplicações industriais e oferecem um custo em kW relativamente baixo. Neste tipo de acelerador a alta tensão é gerada por um sistema multi estágio de retificação em cascata, convertendo uma potência alternada de alta frequência (RF) em uma potência DC de alta voltagem.

Na FIG. 10 são apresentados os principais componentes de um acelerador de elétrons, que são: a fonte de alta tensão, o tubo acelerador com sistema de vácuo, o canhão de elétrons, o sistema de rádio frequência, a câmara de irradiação, painel de controle e o sistema de blindagem da radiação.

FIGURA 10. Esquema de um acelerador de feixe de elétrons do tipo Dynamitron e seus principais constituintes (IAx-Tecnologies, 1996).

1.4. Técnicas analíticas para análise e caracterização de lignocelulósicos

Para avaliar os efeitos do processamento do bagaço de cana-de-açúcar com radiação ionizante é necessário conhecer e entender as alterações físico-químicas, composicionais e estruturais que ocorrem e a relação dessas alterações com a severidade do tratamento.

Há diversos métodos laboratoriais de separação e identificação dos lignocelulósicos, principalmente em materiais lenhosos (eucaliptos) com objetivos voltados à produção de papel e celulose, para tanto existem normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT (ABNT - NBR14032, 1998) e “American Society for Testing and Materials” (ASTM D1110, ASTM D1109, 1995). No presente trabalho os métodos foram adaptados ao bagaço da cana-de-açúcar. A determinação do teor de lignina, celulose e hemicelulose são importantes na avaliação da degradação destes compostos pela ação da radiação ionizante.

Após participação em curso de treinamento no National Renewable Energy Laboratory, NREL, em setembro/2010, e também no laboratório do CTC, optou-se por adotar as técnicas analíticas padronizadas por aquele Instituto, que se baseiam na hidrólise ácida da biomassa, seguida de análise dos monossacarídeos por HPLC e a partir destes, o teor de celulose e hemicelulose são calculados. A diferença principal é que no caso do NREL, a partir de uma amostra de bagaço todas as frações são determinadas sequencialmente, enquanto que nas técnicas utilizadas anteriormente, era necessário uma amostra diferente para determinação de cada fração.

Para avaliação composicional do bagaço de cana, a primeira etapa é a separação da lignina. A combinação de ácidos e solventes orgânicos facilita o isolamento da lignina e há diversos métodos na literatura para esse fim, um deles é o espectrofotométrico, que se baseia no fato da lignina ser solúvel em solução de brometo de acetila a 25% em ácido acético glacial, sendo, em seguida, lida a absorbância da mesma no comprimento de onda a 280nm.

A lignina, quando em solução neutra, não é quimiluminescente, mas apresenta importante emissão quando em meio básico. As espécies responsáveis pela quimiluminescência parecem ser oxigênio singlete e carbonilas excitadas, espécies que têm sido detectadas em espectros de emissão de compostos modelo (ex: vanilina, ácido vanílico, etc.). O método mais utilizado na literatura é o método de Klason que se baseia na extração de polissacarídeos com ácidos fortes, permanecendo um resíduo que, após lavagem, é determinado gravimetricamente como lignina (Elliott, 1969; Koenig, 1999; Glasser and Kelly, 1987; Reyes et al, 1997).

Os métodos químicos de separação da hemicelulose do bagaço da cana-de-açúcar baseiam-se na sua solubilidade em solução de NaOH a quente ($\sim 100^{\circ}\text{C}$). No caso da celulose, o método descrito por Crampton e Maynard, propõe o isolamento da celulose do bagaço da cana-de-açúcar utilizando-se uma mistura de ácido acético a 80% com ácido nítrico a 70% na proporção de 10:1, v/v. A amostra é digerida por 20 min. Em banho de óleo à temperatura de 110 a 120°C e o precipitado é separado e determinado gravimetricamente como celulose total. Além da celulose total podem ser determinadas as celuloses alfa, beta e gama, que darão informações sobre a fração degradada pela radiação ionizante (ABNT-NBR14032, 1998; Fengel and Wegener, 1989).

Os métodos mais comuns de caracterização da estrutura da celulose cristalina são baseados em Raios-X, absorção no infravermelho e ressonância magnética nuclear (Browning, 1967; Thomsom et al, 2007).

A Espectroscopia do Infra-Vermelho com Transformada de Fourier, FTIR, fornece informações úteis relacionadas a trocas nas ligações de pontes de hidrogênio durante transformações na estrutura cristalina da celulose. FTIR tem sido extensivamente utilizado em pesquisas de lignocelulósicos, pois representa um método relativamente fácil para obter informações diretas de alterações que ocorrem durante os vários tratamentos químicos de separação e caracterização de açúcares. Por exemplo, a caracterização FTIR da degradação de celulose pelo conteúdo de ligação C=O vibração em 1740cm^{-1}) (Browning, 1967; Elliott, 1969).

A análise termogravimétrica (TGA) é usada para monitorar as alterações estruturais dos polímeros lignocelulósicos através da degradação térmica. A análise térmica da madeira apresenta dois picos exotérmicos, em virtude da soma das decomposições dos diversos componentes, tais como a celulose, hemicelulose, lignina, polissacarídeos, etc. A pirólise da lignina é muito mais lenta que a da celulose. Amostras de madeira da aroeira tratadas a 230 °C, 310 °C e 450 °C, apresentaram dois picos na curva DSC. O primeiro corresponde à queima de celulose e o segundo, à queima de lignina. Para pirólise a 950 °C surge apenas um pico em torno de 450 °C, correspondente à oxidação do produto da pirólise completa da lignina e da celulose (Tsujiyama, 2000).

As análises cromatográficas líquida e gasosa são ferramentas importantes para controlar o grau de clivagem da lignina, hemicelulose e celulose. O controle da clivagem da lignina pode ser avaliado pela análise cromatográfica dos compostos fenólicos, através das análises destes compostos, após extração com solventes orgânicos. Utilizando-se a Cromatografia Líquida de Alta resolução, CLAE, pode-se avaliar os açúcares liberados pela clivagem da hemicelulose (xilose, arabinose, galactose, glucose e manose) e pela clivagem da celulose (glicose). A extração é realizada diretamente no bagaço da cana com água quente.

1.5. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho é a avaliação da eficiência da radiação com feixe de elétrons como pré-tratamento para hidrólise enzimática da celulose. O objetivo amplo deste projeto é estudar os efeitos da radiação ionizante na alteração da estrutura do bagaço de cana, como a clivagem da lignina e da celulose, para facilitar a hidrólise e consequente produção de etanol após fermentação de todos os açúcares disponíveis.

1.6. Originalidade

A celulose é o polímero natural mais abundante na natureza e portanto, mostra-se como uma fonte de energia sustentável muito atrativa. Os principais processos de hidrólise que empregam reagentes químicos são muito agressivos e formadores de produtos de degradação tóxicos que interferem no processo de fermentação. No processo enzimático utilizam-se condições mais suaves, porém o custo elevado e o tempo gasto ainda são fatores impeditivos, sendo necessário introduzir pré-tratamentos adequados no material fibroso, para minimizar a carga de enzimas e acelerar o processo, viabilizando-o do ponto de vista econômico.

Este processo não é simples e vários países têm investido em pesquisas para viabilizar o uso de matéria prima lignocelulósica para obtenção de energia. As tecnologias disponíveis ainda não alcançaram a viabilidade econômica necessária para implantação e os principais motivos são:

- Os principais processos, como o químico, são muito agressivos e os produtos de degradação tóxicos formados interferem no processo de fermentação;
- O sucesso comercial depende do melhoramento no processo de pré-tratamento para as reações de hidrólise ácida ou enzimática;
- É necessário o desenvolvimento de complexos enzimáticos com eficiência maior e custo menor.
- Embora esse assunto tenha sido estudado anteriormente, em todos eles o bagaço de cana era secado antes do processamento por irradiação. No presente estudo utiliza-se o bagaço “in natura” obtido diretamente da usina, com cerca de 50% de umidade e a irradiação, mesmo em doses elevadas não altera esse parâmetro, o que é uma vantagem que facilita a combinação com a hidrólise enzimática ou química.
- O principal desafio é a utilização de dose absorvida tão baixa quanto exequível para tornar o processo viável técnica e economicamente. Embora esse assunto tenha sido estudado anteriormente, em todos eles o bagaço de cana era

secado antes do processamento por irradiação o que levava á necessidade de aplicação de doses elevadas de radiação (acima de 200 kGy).

No presente estudo utiliza-se o bagaço “in natura” obtido diretamente da usina, com cerca de 50% de umidade. A umidade é importante na formação dos radicais hidroxilas e também no processo de hidrólise enzimática. Dessa forma a sua manutenção, mesmo em doses elevadas é uma vantagem do processo de irradiação.

Embora já tenha havido muitos estudos anteriores sobre a utilização da radiação ionizante na hidrólise da celulose, esses se concentraram na utilização da celulose pura. Mesmo no caso da utilização do bagaço de cana, muitos trabalhos de pesquisa apresentam resultados considerando a extração prévia da celulose para irradiação posterior com doses elevadas (acima de 100 kGy). Em todos os trabalhos pesquisados as amostras eram secas em estufa antes do processamento, levando à formação de aglomerados de fibras, resistentes à ação da radiação ionizante, sendo necessário doses elevadas, o que levou ao desinteresse pela tecnologia (Charlesby, 1995; Kumakura & Kaetsu, 1983, 1984; Takács et al., 1999, 2000; Foldvary et al., 2003

A principal inovação nesse projeto de pesquisa é a utilização do bagaço “in natura”, ou seja, recém-produzido na usina. Esse bagaço possui umidade de cerca de 50% em relação ao peso total do bagaço e esta umidade é o principal precursor dos efeitos indiretos da radiação, pela formação dos radicais livres. Dessa forma ocorre a potencialização dos efeitos desejados considerando uma mesma dose absorvida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

O bagaço da cana-de-açúcar utilizado no presente estudo foi proveniente da Usina Iracema em Iracemápolis-SP com o apoio do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

Em agosto/2009 foi realizada a primeira coleta de bagaço fresco recém processado, isto é, moído e coletado no dia. A segunda coleta foi realizada em maio/2010 e o bagaço recém-coletado foi pré-tratado por explosão a vapor no CTC.

As enzimas comerciais empregadas neste estudo corresponderam às preparações NS22074 *Cellulase Complex*, NS50010 *β -glicosidase* e kit enzimático lignocelulósico constituído por NS50012 *Enzyme Complex*, NS22036 *Xylanases* e NS 22002 *β -Glucanase e Xilanase* fornecidas pela Novozymes, Bagsvaerd, da Dinamarca.

Os padrões de açúcares grau analítico: D-Glicose (99.5%), D-Xilose (>99%), D-Galactose (99%), L-Arabinose (99%), D-Mannose (99.9%) e Celobiose (98%) da Sigma Aldrich Brazil. Reagentes analíticos: Ácido Sulfúrico H_2SO_4 (99%), Ácido Nítrico HNO_3 (99%), Citrato de Sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), Surfactante Tween 20® grau analítico P.A.

2.2 Metodologia

A sequência experimental será descrita em três etapas: preparação de amostras, processamento das amostras por feixe de elétrons e explosão a vapor e análises químicas para avaliação do pré-tratamento e hidrólise enzimática.

Para avaliação dos efeitos da radiação ionizante no bagaço de cana foram necessários estudos dosimétricos do sistema de irradiação e implantação de métodos analíticos para caracterização das amostras.

2.3. Preparação das amostras

As amostras de bagaço de cana “in natura” e após processamento por explosão a vapor passaram por uma etapa de caracterização. As amostras foram inicialmente peneiradas, utilizando uma peneira com malha de 3 mm de diâmetro para homogeneização do tamanho de partícula do bagaço.

Em seguida, o teor de umidade da amostra foi determinado pelo método gravimétrico, utilizando 10 g de amostra, mantido-a sob aquecimento em estufa a 60°C até obtenção de peso constante.

Na determinação da densidade média do bagaço foi utilizada uma proveta graduada de 10,0 mL previamente pesada em balança semi-análítica (especificações da balança). O bagaço de cana foi adicionado na proveta até atingir a quantidade correspondente a um volume de 10 mL e a massa foi anotada. O procedimento foi repetido 10 vezes para determinação da média de medidas.

2.4. Processamento por feixe de elétrons

As amostras de bagaço “in natura” e explodido a vapor foram irradiadas no Acelerador Industrial de Elétrons Dynamitron da Radiation Dynamics Inc., USA, com 1,5 MeV de energia e 37 kW em sistema contínuo no Centro de Tecnologia das Radiações, IPEN/CNEN-SP. Os parâmetros de irradiação usados foram de 112 cm (94,1%) de varredura e de 6,72 m/min de velocidade da esteira.

A irradiação foi realizada em sistema de batelada, em bandejas de vidro tipo “Pyrex®” (FIG.11). A espessura de penetração do feixe de elétrons foi calculada

a partir da determinação da densidade aparente do bagaço. Foram realizados três ensaios com as seguintes doses absorvidas: 5 kGy, 10 kGy, 15 kGy, 20 kGy, 30 kGy, 50 kGy, 70 kGy, 100 kGy, 150 kGy, 200 kGy, 300 kGy e 500 kGy.

FIGURA 11. Sistema de irradiação das amostras de bagaço de cana no acelerador de elétrons IPEN-CTR.

2.4.1. Dosimetria do sistema de irradiação

A avaliação dosimétrica do sistema foi realizada em conjunto com o grupo responsável pela dosimetria do CTR.

O dosímetro de triacetato de celulose (CTA) é utilizado na dosimetria de rotina em processos de irradiação em escala industrial medindo dose absorvida e perfil de dose em materiais irradiados por elétrons. Esse dosímetro é especialmente útil na medição da distribuição de dose, operando de maneira satisfatória na faixa de

dose de 10 a 300 kGy. Quando exposto a radiação o dosímetro CTA adquire coloração amarela e torna-se mais intensa com o aumento de dose (ISO/ASTM 51261, 2010).

O dosímetro Gafchromic é um filme de poliéster revestido por uma camada gelatinosa. Este dosímetro quando expostos a radiação ionizante sofre reação de polimerização caracterizada pela presença da cor azul que intensifica com o aumento de dose absorvida (ISO/ASTM E1310, 1989).

Para calibração do sistema de irradiação foram utilizados 10 dosímetros de CTA e 10 dosímetros Gafchromic® em cada Pyrex®, distribuídos em cima e embaixo do bagaço nas extremidades e no centro do Pyrex® para garantir que a dose aplicada fosse correspondente a dose absorvida pela amostra, essa disposição dos dosímetros é apresentada na FIG.12.

Neste ensaio, utilizou-se: a) amostra de bagaço “in natura” com teor de umidade de cerca de 50%; b) amostra de bagaço seco em estufa a 60 °C por 12h, 18h, 24h e 48h com teor de umidade variável; e c) amostra de bagaço submetido ao processo de explosão a vapor.

FIGURA 12 – Distribuição dos dosímetros na bandeja para irradiação.

2.5. Pré-tratamento das amostras por explosão a vapor

O tratamento por explosão a vapor do bagaço foi realizado no CTC em reator tipo autoclave. Após alimentação com o bagaço “in natura”, a pressão final do sistema foi ajustada em $15,7 \text{ kg / cm}^2$, temperatura a $200 \text{ }^\circ\text{C}$, mantida esta condição por 10 minutos. Em seguida o reator foi despressurizado, o material foi acondicionado em embalagem plástica e mantido sob refrigeração ($\pm 8 \text{ }^\circ\text{C}$) para pré-tratamento com feixe de elétrons. Na FIG. 13 são apresentadas fotografias das amostras de bagaço “in natura” e pré-tratado por explosão a vapor.

FIGURA 13. Amostras de bagaço de cana “in natura” (A) e pré-tratado por explosão a vapor (B)

2.6. Análises químicas

A avaliação dos efeitos da radiação ionizante no bagaço de cana foi realizada a partir de técnicas analíticas baseadas em normas técnicas adotadas para a indústria de papel e celulose (ABNT - NBR14032, 1998, ASTM D1110, ASTM D1109, 1995, Fengel & Wegener, 1989) que foram adaptadas para o bagaço de cana. Entre elas a determinação dos teores de celuloses alfa e beta, que fornecem informações sobre a fração degradada de celulose e hemicelulose. A celulose alfa representa o teor de celulose pura do material, isto é, a fração de massa molecular elevada, a beta inclui certa quantidade de hemicelulose e a celulose degradada.

2.6.1. Caracterização do bagaço

A celulose total foi determinada a partir do método proposto por Crampton e Maynard, 1938. Uma amostra de 5 g de bagaço foi pesada e adicionada de uma mistura de ácido acético a 80 % com ácido nítrico na proporção 10:1, v/v. A digestão da amostra ocorreu por 20 minutos em sistema refluxo a 60 °C. Após resfriamento, foram filtradas a vácuo e o precipitado foi separado e determinado gravimetricamente.

Os teores de celuloses alfa e beta foram determinados conforme a norma ABNT NBR 14032-98. Pesou-se 1,5 g de amostra já designificada, adicionados 100 mL de hidróxido de sódio 17,5 % (m/v). Após 30 minutos, foram adicionados 100 mL de água destilada e mantido em repouso por mais 30 minutos. O precipitado foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado. O filtrado foi reservado em frasco limpo e seco com tampa esmerilhada para a posterior determinação da celulose alfa e beta.

Para a determinação da celulose alfa, tomou-se 10 mL do filtrado anterior e transferido para um erlenmeyer, foram adicionados 10 mL de solução de dicromato de potássio 0,5 N (m/v) e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado e mantido em repouso por 15 minutos. Em seguida, foram adicionadas à solução, 4 gotas de solução indicadora de ferroína (m/v) e titulada com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1 N (m/v) até o aparecimento da coloração avermelhada.

Para a determinação da celulose beta, foram transferidos 50 mL do filtrado para um balão volumétrico e adicionados 50 mL de solução de ácido sulfúrico 3 N (m/v). A solução permaneceu em repouso por 12 horas a 7 °C para a coagulação da celulose beta. Ao final deste período, as amostras foram filtradas em papel de filtro a vácuo, secas em estufa a 60 °C por 24 horas e determinada gravimetricamente.

A avaliação da clivagem da lignina foi feita pela determinação da lignina total utilizando-se o método de Klason (Glasser and Kelly, 1987; Reyes et al, 1998). Pesou-se 0,3 g de bagaço, foram adicionados 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 1 hora, as amostras foram transferidas para um balão de destilação. Foram adicionados 85 mL de água destilada e mantido sob aquecimento em refluxo a 60 °C por 1 hora. Após o resfriamento, as amostras foram filtradas a vácuo, secas em estufa por 24 horas e a determinação da lignina foi realizada pelo método gravimétrico.

Após participação da equipe em curso de treinamento no National Renewable Energy Laboratory, NREL, em setembro/2010 (NREL, 2010), e também no laboratório do CTC, optou-se por adotar as técnicas analíticas padronizadas pelo NREL. A metodologia baseia-se na hidrólise ácida da biomassa, seguida de análise dos monossacarídeos por HPLC e a partir destes o teor de celulose e hemicelulose são calculados (NREL, TP-510-42623). A diferença principal é que no caso do método NREL, a partir de uma amostra de bagaço todas as frações são determinadas seqüencialmente, enquanto que nas técnicas utilizadas anteriormente, era necessário uma amostra diferente para determinação de cada fração.

2.6.2. Determinação de açúcares

A determinação de açúcares liberados na clivagem da hemicelulose (xilose, arabinose, galactose, glucose e manose) e pela clivagem da celulose (glucose), foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) utilizando-se o HPLC da Shimadzu modelo LC-10, com detetor ESLD (*Electron Scattering Light Detector*), utilizando água purificada em sistema Milli-Q como fase móvel. Para ajuste das condições ideais do detector, foram analisados padrões de açúcares como glicose, xilose, galactose, arabinose e manose, até a obtenção de um cromatograma com a separação adequada de cada um deles. Os ajustes dos parâmetros que apresentaram o melhor desempenho do sistema de HPLC foram:

- Coluna shim-pack SCR -101P Shimadzu, 10 µm de diâmetro de partícula, 7,9 mm X 30 cm;

- Pré-coluna Guard shim-pack SCR(P) Shimadzu, 5 µm de diâmetro de partícula, 4,0 mm X 5 cm;
- Temperatura da coluna: 80°C;
- Pressão da bomba: 24 kg.cm⁻³;
- Vazão da fase móvel: 0,8 mL . min .⁻¹;
- Temperatura do detector: 50°C;
- Ganho do detector: 10;
- Pressão do detector: 350 kPa.

2.6.3. Espectroscopia do infravermelho - FTIR

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica empregada na identificação de compostos orgânicos. Neste trabalho a técnica visa determinar as variações na composição da biomassa após a etapa de pré-tratamento e hidrólise enzimática. A identificação das bandas foi baseada em métodos propostos na literatura, entretanto, os comprimentos de onda podem sofrer pequenas variações dependendo do equipamento e da amostra. (Elliott, 1969; Chundawat et al., 2007; Koenig, 2009).

Para análise da composição orgânica foi utilizado o Espectrofotômetro infravermelho com transformada de Fourier, FTIR, da Perkin Elmer, modelo Spectrum 100 (FIG.14). Esse instrumento possui como acessório um sistema de reflectância total atenuada (Attenuated Total Reflectance, ATR), que permite a análise de sólidos sem necessidade de preparação ou destruição da amostra. As amostras de bagaço de cana são colocadas diretamente no porta-amostra visto no detalhe da FIG.14.

FIGURA. 14 Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier, FTIR Infra-red spectrophotometer, Perkin Elmer, modelo Spectrum 100, instalado no laboratório do CTR- IPEN

2.6.4. Determinação de produtos de degradação e inibidores

Os produtos de degradação como ácido acético e ácido fórmico foram determinados por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (GC/MS) da Shimadzu, modelo QP-5000 tipo quadrupolo. A determinação de furfural foi realizada por Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), modelo 17A da Shimadzu.

2.7. Hidrólise enzimática

Os ensaios de hidrólise enzimática foram realizados nos laboratórios do Centro de Tecnologia Canavieira e no Laboratório da Faculdade de Engenharia Química Poli-USP.

Nos ensaios de hidrólise enzimática utilizou-se a enzima comercial *Celucast* fornecida pela Novozymes, Bagsvaerd, Denmark. A 10,0 g de bagaço em base seca, adicionou-se 0,08 mL de surfactante “Tween 20®” e 11 mL de solução

tampão citrato de sódio 100 mM (pH = 4,5), levou-se o volume a 110 mL com água purificada. As amostras foram colocadas em um agitador orbital shaker e mantidos por 10 min para homogeneização do conteúdo. Uma alíquota de 5 mL foi retirada para determinação do tempo 0h de hidrólise. Em seguida foram adicionados 4,65 g de Cellulase e 0,084 g de β -glicosidase e iniciou-se a hidrólise em agitador orbital shaker a 50 °C de temperatura e agitação de 175 rpm.

A carga total foi de 100 g, teor de sólidos foi de 5%. No tempo de 24 h foi retirada uma alíquota de 5 mL de cada amostra e o ensaio foi encerrado com 48 h de hidrólise. O ensaio foi realizado em duplicata, os açúcares liberados foram determinados por HPLC. A taxa de conversão à glicose a partir da massa de bagaço foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ Conversão} = \frac{[\text{Concentração Final de Glicose}] - [\text{Concentração Inicial de Glicose}]}{FC_{\text{bagaço}} \times \left[\frac{m_{\text{bagaço}}}{V} \right] \times \left[\frac{M_{\text{glicose}}}{M_{\text{celulose}}} \right]} \times 100$$

onde: **FC_{bagaço}** é a fração de celulose no bagaço (0,479), **m_{bagaço}** é a massa de bagaço que foi pesada em base seca, **V** é o volume da reação (0,1 L). **M_{glicose}** é a massa molar de glicose (180 g·mol⁻¹) e **M_{celulose}** é a massa molar de celulose (162 g·mol⁻¹) (Rodrigues et al., 2010).

A Novozymes, Bagsvaerd da Dinamarca forneceu um conjunto de enzimas específicas para hidrólise de material lignocelulósico para realização dos ensaios. Na TAB. 1 são apresentadas as características das enzimas fornecidas. Foram utilizadas cinco misturas diferentes dessas enzimas e aplicadas nas amostras de bagaço irradiadas.

TABELA 1. Complexos enzimáticos comerciais fornecidos pela Novozymes Co.

NS22074 Cellulase Complex – Esta enzima é responsável pela quebra do material lignocelulósico em glicose e celobiose e polímeros maiores de glicose (oligômeros). A NS22074 pode ser usada para reduzir a viscosidade ou aumentar o rendimento na extração dos vários constituintes da planta. Os principais produtos da reação da hidrólise com esta enzima são a celobiose e glicose.

NS50010 β -Glicosidase – A enzima também é conhecida como celobiase, responsável pela hidrólise da celobiose a glicose. A Celobiose é um carboidrato constituído de duas moléculas de *D-Glicose* unidas por ligações β -1-4 glicosídicas. A NS50010 pode ser utilizada para suplementar a hidrólise com NS22074 para aumentar o rendimento de açúcares fermentescíveis.

NS50012 Enzyme Complex – Este complexo enzimático é constituído por uma variedade de carbohidrases, incluindo *Arabinase*, *β -glucanase*, *Cellulase*, *Hemicelulase*, *Pectinase* e *Xilanase*. NS50012 quebra a parede celular para a extração de seus componentes e também utilizado no processamento de cereais e matéria-prima de origem vegetal. Esta enzima específica é capaz de liberar e degradar grande variedade de polissacarídeos.

NS22036 Xylanases – É uma enzima produzida a partir de *endo-xilanases* purificadas com elevada especificidade a partir de pentosanas solúveis. NS22036 pode ser usada para liberar pentoses a partir da fração de hemicelulose da biomassa.

NS 22002 β -Glucanase e Xilanase – Constituída de uma mistura de *β -Glucanase* e *Xilanase* e apresenta vários outros ativos incluindo, celulase, *hemicelulase* e *pentosanases*.

Na TAB. 2 são apresentadas as combinações enzimáticas testadas na hidrólise do bagaço de cana pré-tratado com irradiação e pré-tratado com explosão a vapor seguido de irradiação com feixe de elétrons. Esses ensaios de hidrólise foram realizados no laboratório do Departamento de Engenharia Química da EPUSP.

TABELA 2 – Composição das misturas enzimáticas e dosagens utilizadas

Mistura Enzimática	Enzimas Comerciais Novozymes Co.	Concentração	Pré-tratamento do Bagaço
1	NS 22074 <i>cellulase complex</i>	15 FPU/g	Irradiação e irradiação + explosão a vapor doses: 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy
	NS 50010 <i>β-glucosidase</i>	0,50%	
2	NS 22074 <i>cellulase complex</i>	15 FPU/g	Irradiação e irradiação + explosão a vapor doses: 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy
	NS 50010 <i>β-glucosidase</i>	0,50%	
	NS 22036 <i>xylanase</i>	0,05%	
3	NS 50012 <i>enzyme complex</i>	100 FBG/g	Irradiação e irradiação + explosão a vapor doses: 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy
	NS 22002 <i>hemicellulase</i>	0,40%	
4	NS 22074 <i>cellulase complex</i>	15 FPU/g	Irradiação e irradiação + explosão a vapor doses: 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy
	NS 50010 <i>β-glucosidase</i>	0,50%	
	NS 22002 <i>hemicellulase</i>	0,40%	
5	NS 50012 <i>enzyme complex</i>	100 FBG/g	Irradiação e irradiação + explosão a vapor doses: 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy
	NS 22002 <i>hemicellulase</i>	0,40%	
	NS 50010 <i>β-glucosidase</i>	0,50%	

Onde: FPU = unidade de papel de filtro; FBG = unidade de fungo β -glucanase;

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados em dois tópicos principais que são a irradiação como único processo de pré-tratamento e os efeitos combinados de irradiação e explosão a vapor.

A caracterização preliminar do bagaço de cana pré-tratado com feixe de elétrons foi realizada para o cálculo dos parâmetros de irradiação e para o balanço de massa na hidrólise enzimática.

A densidade média do bagaço “in natura” foi de $0,083 \pm 0,009 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a espessura de penetração do feixe de elétrons foi de 4,8 cm.

A umidade média presente no bagaço foi de $49,04 \pm 0,64\%$. O bagaço pré-tratado com feixe de elétrons seguido de explosão a vapor apresentou uma densidade média de $0,154 \pm 0,015 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a espessura de penetração do feixe de elétrons de 2,58 cm e umidade de $64,23 \pm 1,4\%$.

Na TAB.3 são apresentadas as médias das doses absorvidas obtidas com 10 dosímetros CTA e 10 dosímetros Gafchromic com os respectivos desvios padrão, para as amostras de bagaço “in natura”, secos, assim como para as amostras de bagaço explodido.

No caso do bagaço explodido, o dosímetro CTA apresentou resultados com variação muito elevada, assim como o desvio padrão. Notou-se que os dosímetros ficaram muito escuros, provavelmente foram atacados por algum composto químico liberado no bagaço explodido. Suspeita-se que seja o furaldeído que estava presente em concentrações elevadas nessas amostras. Por esse motivo optou-se por utilizar o dosímetro do tipo Gafchromic, que apresentou resultados mais precisos e coerentes.

O dosímetro de CTA apresentou coeficiente de variação de 9,3% para 10 kGy e 12,5% para 100 kGy, que pode ser considerado satisfatório para o tipo de sistema de irradiação utilizado (bandeja). Não houve variação significativa nas doses medidas nas amostras secas, cuja densidade é bem menor que a da amostra úmida.

TABELA 3 - Resultados das doses absorvidas e seu desvio padrão obtidos com 10 dosímetros CTA e 10 dosímetros Gafchromic após irradiação com feixe de elétrons.

Amostra de Bagaço	Dose (kGy)	Teor de Umidade (%)	Densidade Amostra (g.cm ³)	Dosímetro CTA	Dosímetro Gafchromic
"in natura"	10	49,6	0,150	11,48 ± 1,06	10,6 ± 5,7
"in natura"	20	49,6	0,150	19,22 ± 4,66	19,98 ± 4,00
"in natura"	50	49,6	0,150	49,46 ± 2,12	50,92 ± 5,20
"in natura"	70	49,6	0,150	64,71 ± 7,50	69,22 ± 8,80
"in natura"	100	49,6	0,150	96,72 ± 15,78	98,43 ± 6,90
Seco 12h	30	23,3	0,096	27,29 ± 2,13	nd
Seco 18h	30	15,6	0,091	27,21 ± 2,38	nd
Seco 24h	30	9,5	0,081	27,97 ± 3,06	nd
Seco 36h	30	8,6	0,070	25,68 ± 2,38	nd
Seco 48h	30	5,0	0,060	29,25 ± 3,66	nd
Explodido	50	64,4	0,300	84,71 ± 18,53	50,59 ± 11,37
Explodido	100	64,4	0,300	126,61 ± 30,99	100,63 ± 20,64

3.1. Caracterização do bagaço de cana "in natura" e irradiado

Os resultados da análise composicional do bagaço de cana "in natura" e pré-tratado com feixe de elétrons com doses absorvidas de 5 kGy, 10 kGy, 20 kGy, 50 kGy, 70 kGy, 100 kGy e 150 kGy estão apresentados na FIG. 15. A composição média do bagaço bruto apresentou um teor de cerca de 42% de celulose, 29% de hemicelulose, 22% de lignina, 6% fração solúvel e 1% de cinzas.

O processamento por radiação levou a um aumento na fração solúvel que está relacionada com a hemicelulose e clivagem de celulose. A celulose alfa com elevado peso molecular apresentou redução total com 150 kGy de dose absorvida, enquanto que a celulose beta que corresponde à fração degradada aumento com o aumento de dose. Não houve alteração significativa na fração de lignina nessas doses.

FIGURA 15. Fração composicional do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado com doses absorvidas até 100 kGy

A variação na fração composicional do bagaço também foi determinada em amostras de bagaço de cana processadas com doses de irradiação variando de 30 kGy até 500 kGy, com o objetivo de avaliar os efeitos em doses elevadas, mesmo considerando que doses absorvidas acima de 100 kGy são inviáveis economicamente .

Nesta caracterização utilizou-se a metodologia padronizada pelo NREL (NREL - 2010) para determinação da fração composicional do bagaço e os resultados antes e após a irradiação são apresentados na FIG.16.

A composição do bagaço de cana submetido a elevadas doses de radiação, acima de 100 kGy, apresentou como vantagem a redução da lignina e um aumento significativo na fração solúvel em água (FIG. 17), atingindo quase 50 % com 500 kGy de dose absorvida, mas esse aumento foi resultado da decomposição dos açúcares liberados que são a glicose, a xilose e a arabinose. Este é um efeito indesejável, pois esses açúcares são importantes para a obtenção do etanol.

FIGURA 16. Fração composicional do bagaço de cana-de-açúcar não tratado e pré-tratado com elevadas doses absorvidas até 500 kGy

FIGURA 17. Visualização da fração solúvel (extração aquosa) de amostra de bagaço de cana após irradiação com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas.

3.2. Avaliação dos açúcares liberados

As curvas de calibração dos açúcares foram obtidas usando-se padrões grau analítico de D-Glicose (99,5%), D-Xilose (>99%), D-Galactose (99%), L-Arabinose (99%), D-Mannose (99,9%) and Celobiose (98%) da Sigma Aldrich Brazil Ltda, cujo cromatograma é apresentado na FIG.18. Os coeficientes de regressão das curvas foram de 0,999 e a variabilidade experimental ($n = 10$) expressa como desvio padrão foi cerca de 10% para todos os açúcares.

FIGURA 18. Espectro de padrão de açúcares (200 mg.L^{-1}) obtido no CLAE com detector ELSD

Na FIG.19 são apresentados os espectros obtidos após a extração a quente dos açúcares das amostras não irradiadas e irradiadas nas diferentes doses absorvidas, assim como, para efeito de comparação, é apresentado o espectro de um padrão de açúcares de 100 mg.L^{-1} . Pode-se observar que os principais açúcares liberados após a irradiação foram a glicose e arabinose, seguidos por uma liberação menor de xilose.

FIGURA 19. Espectro de açúcares liberados após a irradiação do bagaço de cana com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas comparado ao padrão de açúcares.

Os picos marcados como A, B, C e D indicam compostos que foram formados durante o processamento por feixe de elétrons. Estes compostos apresentaram uma elevação mais significativa com a dose absorvida em relação aos demais, como mostrado no gráfico da FIG.20, atingindo o máximo com uma dose de 50 kGy e uma degradação rápida até 100 kGy.

Considerando-se que a celulose alfa reduziu progressivamente com o aumento de dose absorvida até 150 kGy, verifica-se que não houve degradação total da celulose a glicose e sim a formação destes compostos intermediários A, B, C e D, apresentados no cromatograma da (FIG.19) e cuja formação e degradação pode ser acompanhado pelo gráfico da (FIG.20).

FIGURA 20. Comportamento dos compostos referentes aos picos A, B, C e D em relação às doses aplicadas comparados aos açúcares conhecidos.

Para confirmação da origem desses picos, a fração solúvel da amostra irradiada com 50 kGy foi submetida à hidrólise ácida por 10, 20 e 30 minutos. Os resultados obtidos podem ser visualizados na FIG. 21, onde são apresentados, para comparação, os cromatogramas obtidos após a extração a quente da amostra irradiada com 50 kGy, os cromatogramas obtidos após hidrólise ácida dessa amostra e um padrão de açúcares de 200 mg/L.

Pode-se observar que os principais açúcares liberados após a irradiação foram a glicose e a arabinose, seguidos por uma liberação menor de xilose. Após a hidrólise ácida, ocorre a degradação dos oligômeros com aumento de glicose e xilose. Esses oligômeros atingem o máximo com uma dose de 50 kGy, e em seguida ocorre uma degradação rápida até 100 kGy.

FIGURA 21. Espectro de açúcares liberados após a irradiação do bagaço de cana com feixe de elétrons com 50kGy (verde) e após a hidrólise ácida em diferentes tempos (azul, rosa e marrom)

A glicose, a arabinose, a xilose e a celobiose (dímero de glicose) foram quantificados e os resultados estão apresentados no gráfico da FIG. 22, onde se verifica a variação da concentração do açúcar livre por grama de bagaço seco com a dose absorvida.

A liberação máxima de glicose ocorreu com 20 kGy de dose absorvida e a partir desta dose verificou-se uma queda na concentração, até a redução quase que total com 150 kGy. Essa redução pode ser em virtude de sua degradação pela radiação ionizante. Dessa concentração pode-se calcular que cerca de 1% da glicose contida na celulose do bagaço foi liberada pela radiação.

A arabinose apresentou um comportamento diferente da glicose em relação à dose aplicada, com a máxima concentração entre 80 kGy e 100 kGy e em seguida degradou totalmente em 150 kGy. A arabinose é um açúcar de cinco carbonos originado da degradação de hemicelulose, que também pode ser fermentada para produção de etanol.

FIGURA 22. Variação da concentração dos açúcares livres no bagaço de cana após a irradiação com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas

Considerando-se as relações de cálculo de celulose ($0,90 \times \text{glicose} + 3,09 \times \text{ácido fórmico}$) e de hemicelulose ($0,88 \times \text{xilose} + 0,88 \times \text{arabinose} + 0,72 \times \text{ácido acético} + 1,37 \times \text{furfural}$) (Golveia, 2009; Rodrigues, 2010; Canilha, 2011), as conversões de hemicelulose em arabinose e de celulose em glicose foram calculadas e os resultados são apresentados na FIG.23.

O processamento por radiação converteu de 0,50% de celulose com 20 kGy e 2,00% de hemicelulose com 100 kGy. As amostras de bagaço secas por 12h, 18h, 24h, 36h e 48h com teor de umidade variável (TAB.5) apresentaram conversões de celulose a glicose de 0,13%, 0,13%, 0,12%, 0,12% e 0,10%, respectivamente. Esses dados confirmam a importância da umidade na produção dos radicais livres que potencializam a ação da radiação ionizante no bagaço.

FIGURA 23. Conversão de celulose a glicose e de hemicelulose a arabinose no bagaço de cana irradiado com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas.

O principal subproduto encontrado após a irradiação foi o ácido acético, resultado da desacetilação da hemicelulose. A concentração desse ácido aumentou proporcionalmente à dose absorvida de radiação, como mostra o gráfico da FIG. 24. Tem sido reportado na literatura que a remoção dos grupos acetila melhora a digestão enzimática pelo aumento da acessibilidade da enzima à celulose (Kumar, 2009).

FIGURA 24. Concentração de ácido acético liberado no bagaço de cana irradiado com feixe de elétrons em diferentes doses absorvidas.

O mecanismo de degradação de lignina por estes agentes não está totalmente esclarecido. Sabe-se, entretanto, que ocorrem reações de hidroxilação, quebra oxidativa de grupos metoxila e abertura de anel. Entre os vários grupos funcionais característicos da lignina (grupos fenólicos, duplas ligações e grupos carbonila), as carbonilas conjugadas ao anel aromático parecem ser os cromóforos mais efetivos para dar início ao processo de degradação. O pré-tratamento que utiliza peróxido de hidrogênio em meio básico deve seu poder oxidante ao radical hidroxila, gerado na reação do peróxido de hidrogênio com o ânion hidroperóxido (Reyes et al, 1998).

3.3. Espectroscopia do infravermelho do bagaço de cana

As análises de FTIR foram realizadas para avaliar e quantificar alterações químicas no bagaço pré-tratado por radiação. As amostras do bagaço moído foram pressionadas uniformemente contra uma superfície de diamante, o espectro obtido foi uma média de 16 varreduras de 4000 a 650 cm^{-1} . A linha base foi corrigida utilizando-se o programa “Spectrum One” fornecido com o equipamento.

O sistema de ATR com cristal de diamante permite que a biomassa seja pressionada contra o cristal formando uma superfície uniforme, levando a um elevado grau de reprodutibilidade espectral.

Foram realizadas análises nas amostras de bagaço de cana irradiadas em todas as doses estudadas, assim como em suas frações. Na FIG.25 é apresentado o espectro de FTIR obtido para o bagaço de cana “in natura”, com as principais bandas características e suas funções. Nessa mesma Figura são apresentados os espectros da celulose alfa (celulose de alto peso molecular) e da celulose beta (porção degradada da celulose), hemicelulose e lignina, para facilitar a visualização com a identidade das bandas.

Os grupos funcionais mais importantes na unidade de celulose são a ponte de hidrogênio, a metila, o metileno e a ligação C-O-C. No espectro da celulose alfa as bandas relacionadas à celulose que são 3350, 2900, 1033 e 900 cm^{-1} apresentam-se maiores que os demais porque a concentração de celulose relativa ao bagaço integral aumentou, o contrário ocorreu com a celulose beta, nesse espectro pode se notar também a ausência de lignina (1660, 1630 e 1480 cm^{-1}) e de hemicelulose (1730 e 1254 cm^{-1}).

FIGURA 25. Espectros de FTIR do bagaço de cana “in natura” integral e das frações celulose alfa e beta, lignina e hemicelulose com identificação das bandas com funções mais importantes.

Após a irradiação com feixe de elétrons obteve-se os espectros de FTIR para o bagaço em todas as doses absorvidas e esses espectros são apresentados nas FIG. 26, 27 e 28, divididos em intervalos de comprimento de onda para melhor visualização e análise.

O espectro de FTIR do bagaço de cana irradiado em diferentes doses absorvidas na faixa de 650 a 1200 cm^{-1} está apresentado na FIG. 26. Os picos 1109 e 1167 cm^{-1} são da deformação plana do C-H aromático e o pico 835 cm^{-1} é da ligação C-H fora do plano. O pico em 1033 cm^{-1} é indicativo do estiramento C-O no C-3, estiramento C-O no C-6 e estiramento C-C.

A banda em 900 cm^{-1} representa a ligação beta glicosídica (1→4) entre as unidades de açúcares e o grau de rompimento da ligação de ponte de hidrogênio

intramolecular. Tem sido reportado na literatura que a absorbância em 900 cm^{-1} está associada com o estiramento do antisimétrico anel fora de fase da celulose amorfa e o pico 1033 cm^{-1} pode ser relacionado a um aumento na celulose cristalina.

FIGURA 26. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 650 a 1200 cm^{-1}

Na FIG. 27 apresenta-se o intervalo de 1100 a 1800 cm^{-1} do espectro do bagaço de cana irradiado, que representa principalmente a lignina. Os grupos funcionais mais importantes da lignina incluem carbonilas, hidroxilas fenólicas, anéis aromáticos e metoxilas em 1595 e 1220 cm^{-1} (aril éter estiramento C-O). Os picos nas bandas de 1606 , 1518 e 1430 cm^{-1} são originados das vibrações do esqueleto aromático da lignina.

A banda 1245 representa a absorção C-O do grupo acetil da hemicelulose. Alguns picos importantes retirados da literatura que servem para avaliar o efeito da radiação ionizante são o pico do carbonila ester 1736 cm^{-1} e o aldeído em 1638 cm^{-1} que estão presentes na hemicelulose e no complexo

hemicelulose/lignina. A diminuição desses picos está diretamente relacionada deslignificação e hidrólise da hemicelulose e houve redução na amostra irradiada com 20 kGy.

FIGURA 27. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 1100 a 1800 cm^{-1}

A parte final do espectro de FTIR do bagaço é apresentada na FIG. 28 com as bandas de 2800 a 3700 cm^{-1} . A absorção 3350 cm^{-1} representa o estiramento do grupo -OH da celulose.

Cada grupo de glicose da celulose possui 3 grupos de hidroxilas alcoólicas e os átomos de hidrogênio na proximidade do oxigênio formam as pontes de hidrogênio com distâncias entre 0,28 a 0,30 nm. Essas pontes impedem o ataque das enzimas à celulose. A redução dessa banda no espectro indica o rompimento das ligações de pontes de hidrogênio entre as glicoses, aumentando a acessibilidade da enzima. A banda em 2923 representa o estiramento C-H e sua redução indica que o grupo metil/metileno da celulose foi rompido.

FIGURA 28. Espectros de FTIR do bagaço antes e após irradiação em diferentes doses absorvidas na faixa de 2800 a 3700 cm^{-1}

Segundo a literatura (Kumar, 2009), a técnica de FTIR é uma ferramenta adequada para avaliar mudanças na cristalinidade da celulose após o pré-tratamento. Uma forma de avaliação é através do cálculo das alterações relativas ($=100 \cdot \text{intensidade na amostra sem tratamento} - \text{intensidade na amostra irradiada} / \text{intensidade na amostra sem tratamento}$), onde valor positivo indica redução.

A cristalinidade pode ser avaliada pela razão das intensidades das bandas de 1033 e 900 cm^{-1} . Essas relações foram calculadas para as amostras irradiadas em diferentes doses e os resultados são apresentados na TAB. 4. Os valores em vermelho são os que apresentaram redução.

TABELA 4 - Alterações relativas considerando as doses absorvidas após irradiação do bagaço com feixe de elétrons (os valores em vermelho são os que apresentaram redução).

Banda	Descrição	20 kGy	30 kGy	50 kGy	70 kGy	100 kGy	150 kGy
3350	ruptura da ponte de hidrogênio	- 6,00	30,80	- 20,53	- 13,15	- 17,42	- 21,80
2900	ruptura do grupo metil/metileno da celulose	2,00	32,34	- 10,98	- 17,37	- 7,39	- 7,19
1730	remoção da cadeia lateral da lignina	- 0,23	26,73	- 21,89	- 20,97	- 21,66	- 21,89
1660	Esqueleto aromático da lignina	1,18	33,81	- 11,82	- 8,04	- 5,67	- 10,40
1630	Degradação da lignina	0,81	34,15	- 14,23	- 9,96	- 6,10	- 10,77
1480	Degradação da lignina	- 6,06	33,65	- 17,36	- 15,75	- 17,77	- 16,55
1254	Indica remoção do grupo acetila	- 10,53	- 13,10	- 9,24	- 15,91	- 15,32	- 14,85
900	Celulose amorfa	7,07	- 12,89	- 6,03	- 1,25	1,87	- 4,37
1032/900	Razão de celulose amorfa para cristalina	- 16,48	5,47	- 3,08	- 7,16	- 12,39	- 4,91

3.4. Efeitos do processamento por feixe de elétrons na hidrólise enzimática

Com os resultados obtidos de massa de glicose após hidrólise enzimática do bagaço de cana foram calculadas as taxas de conversão para cada dose absorvida. Na FIG. 29 são apresentados os resultados da média de três hidrólises realizadas com amostras de três diferentes ensaios.

Observando-se a FIG. 29(A), (faixa de 0 kGy a 100 kGy) nota-se que o aumento mais significativo ocorreu com doses absorvidas até 50 kGy. Essa redução pode ser associada à degradação da glicose pela radiação e também à formação dos subprodutos da degradação dos açúcares, como demonstrado no item 3.2.

A conversão de celulose a glicose aumentou com a dose absorvida chegando ao máximo de 27% com uma dose de 300 kGy e 48 h de hidrólise

enzimática (FIG. 29B). Doses mais altas não aumentaram essa eficiência, ao contrário causaram uma redução.

FIGURA 29. Conversão de celulose a glicose após 24 h e 48 h de hidrólise enzimática do bagaço de cana irradiado na faixa de dose absorvida até 100 kGy (A) e até 500 kGy (B).

Os resultados de hidrólise enzimática obtidos para doses absorvidas menores que 50 kGy são muito importantes para a aplicação da tecnologia de feixe de elétrons porque, além de causar menos danos à estrutura dos açúcares

liberados, reduzindo a formação de inibidores, torna a tecnologia mais viável e competitiva economicamente, tanto em gasto de energia como em tempo necessário para o processamento.

3.5. Efeito do pré-tratamento combinado por explosão a vapor e irradiação na hidrólise enzimática

Os resultados da análise composicional do bagaço de cana submetido ao pré-tratamento combinado de irradiação após explosão a vapor são apresentados na FIG. 30 juntamente com o bagaço “in natura”, ou seja, sem processamento, para comparação.

O bagaço explodido apresentou redução no teor de hemicelulose levando a um aumento relativo nos teores de lignina, celulose e fração solúvel. Após a irradiação houve um aumento de cerca de 4% na fração solúvel com uma dose absorvida de 15 kGy. As doses de irradiação acima de 20 kGy não apresentou variação significativa nos constituinte do bagaço pré-tratado.

FIGURA 30. Variação da composição relativa do bagaço de cana “in natura”, explodido e irradiado em diferentes doses absorvidas

O furfural é o principal subproduto do processamento por explosão a vapor. A concentração de furfural sofreu redução progressiva com o aumento das doses de irradiação aplicadas. As amostras irradiadas a 200 kGy apresentaram uma redução de 60,2% e 67,3% de furfural ao final de 24 h e 48h de hidrólise, respectivamente (FIG.31). Essa redução na concentração de furfural indica que a irradiação destrói o furfural.

FIGURA 31. Concentração de furfural antes e após hidrólise enzimática nas amostras pré-tratadas com explosão a vapor seguida de irradiação com feixe de elétrons.

FIGURA 32. Variação da concentração de açúcares solúveis no bagaço de cana explodido em função da dose absorvida

Os resultados de conversão a glicose das amostras que foram pré-tratadas com explosão a vapor e irradiação em diferentes doses e submetidas à hidrólise enzimática por 17h, 24h e 48 h são apresentados na FIG 33. Não houve um aumento significativo na conversão a glicose nas amostras irradiadas. Esse aumento foi de apenas 2% para uma dose absorvida de 10 kGy e a partir desta dose verificou-se uma queda progressiva na conversão com o aumento de dose aplicada .

Esperava-se que a remoção do furfural facilitasse a ação das enzimas e assim aumentar a conversão, mas isso não ocorreu. Um fato que pode ter contribuído para essa redução no rendimento é a degradação dos açúcares, principalmente a glicose, causado pela radiação.

FIGURA 33. Conversão de celulose a glicose pelos processos combinados de explosão a vapor e irradiação em diferentes doses absorvidas em 17h, 24h e 48 h de hidrólise enzimática.

3.6. Avaliação da mistura de enzimas

Na FIG.34 são apresentados os resultados de conversão de celulose a glicose obtidos para as diferentes misturas enzimáticas em 24h e 48h, para as amostras pré-tratadas com doses absorvidas de 10 kGy, 30 kGy e 50 kGy.

A mistura cinco apresentou os melhores resultados de conversão em 24 h de incubação, cerca de 30% de conversão na amostra sem irradiar e houve um aumento para a irradiada com 10 kGy para cerca de 35%. Mas após 48 h de incubação houve uma redução de glicose em todas as misturas, excetuando-se a mistura um que já havia sido estudada. A mistura de número cinco era muito complexa, composta de hemicelulase, beta-glicosidade e o complexo enzimático (Arabinase, β -glucanase, Celulase, Hemicelulase, Pectinase e Xilanase) (TAB.2), atacou todos os polissacarídeos e, provavelmente, foi inibida pelos açúcares liberados. Foi utilizada para pesquisa, mas o custo seria muito elevado em aplicações reais. Esses ensaios serão repetidos posteriormente, com bagaço mais fresco, pois usamos o bagaço que já estava armazenado (entresafra). As enzimas foram fornecidas em quantidades suficientes para muitos estudos com diferentes parâmetros.

A mistura cinco apresentou os melhores resultados de conversão em 24 h de incubação, cerca de 30% de conversão na amostra sem irradiar e houve um aumento para a irradiada com 10 kGy para cerca de 35%. Mas após 48 h de incubação houve uma redução de glicose em todas as misturas, excetuando-se a mistura um que já havia sido estudada. A mistura de número cinco era muito complexa, composta de hemicelulase, β -glicosidade e o complexo enzimático (Arabinase, β -glucanase, Celulase, Hemicelulase, Pectinase e Xilanase) (TAB.2), atacou todos os polissacarídeos e, provavelmente, foi inibida pelos açúcares liberados.

FIGURA 34. Conversão de celulose a glicose em 24h e 48h para as diferentes misturas de enzimas em bagaço pré-tratado por irradiação

As misturas de diferentes enzimas também foram testadas nas amostras de bagaço pré-tratado com explosão a vapor seguido de irradiação. As melhores taxas de conversão foram verificadas nas amostras contendo as misturas enzimáticas 1, 2 e 4 (TAB.2). Após 24 h de hidrólise, verificou-se uma conversão de até 20% em todas as amostras, como apresentado na FIG.35. Comportamento semelhante foi verificado ao final de 48h de hidrólise (FIG.35). O processamento por radiação não levou a uma melhora nesse quadro, pelo contrário houve uma redução na conversão para as diferentes doses absorvidas.

FIGURA 35. Conversão de celulose a glicose em 24h e 48h para as diferentes misturas de enzimas e bagaço pré-tratado por explosão a vapor e irradiação.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho pode se concluir que:

- O sistema utilizado mostrou-se adequado para a irradiação do bagaço de cana com feixe de elétrons, o que foi comprovado pelo controle dosimétrico utilizando-se dosímetros comerciais;
- O processamento com feixe de elétrons levou a alterações na estrutura e composição do bagaço de cana. A lignina não foi degradada totalmente, mas sofreu alterações que propiciaram a interação da radiação com a celulose e a hemicelulose;
- O teor de umidade do bagaço de cana é um parâmetro muito importante na eficiência do processamento por irradiação, pois promove a formação dos radicais oxidantes, principalmente hidroxilas;
- A irradiação com feixe de elétrons promoveu um aumento no rendimento de hidrólise enzimática da celulose no bagaço “in natura”, mas no caso do bagaço explodido não houve alteração nesse rendimento.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, ET AL. *J. Chem. Technol. & Biotechnol*, v.82, p. 340-349, 2007.
2. AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS. Radiation energy treatment of water, wastewater and sludge. A State of the Art Report. New York, N.Y., p.30-34, 1992.
3. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for use of a polymethylmethacrylate dosimetry system. (ASTM 51276), 2002.
4. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard practice for use of radiochromic optical waveguide dosimetry system. International Designation: (ASTM E-1310), 1989.
5. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for 1% sodium hydroxide solubility of wood. United States: ASTM, 1995. (ASTM D 1109).
6. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard test method for water solubility of wood. United States: ASTM, 1995. (ASTM D 1110).
7. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Pastas celulósicas – Determinação de celuloses alfa, beta e gama. Rio de Janeiro: ABNT, 1998. (NBR 14032).
8. BACHMAN, S.; GIESZCZYNSKA, J. Effect of gamma irradiation on pesticide residue in food products. In: IAEA, Ed. Agrochemicals: Fate in food and the Environment". Vienna, **International Atomic Energy Agency**, p. 313-315, 1982.

9. BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. ***Biotechnology advances***, v. 15, p. 583-620, 1997.
10. BIELY, P. Microbial xylanolytic system. ***Trends in Biotechnology***, v.3: 286-290, 1985.
11. BRENNER, W.; RUGG, B.; ARNON, J. Radiation pretreatments for optimizing the sugar yield in the acid hydrolysis of waste cellulose. ***Radiat. Phys. Chem*** 14, 299-308, 1979.
12. BRUNOW, G. Methods to reveal the structure of lignin. In: Hofrichter M., Steinbucher, A. (Ed.) Lignin, Humic Substances and Coal. ***Wiley-VCH***, Germany, 89-116, 2001
13. BROWNING, B.L. ***Methods of wood chemistry, Vol. 2***, New York, Interscience Publishers, 1967.
14. CARVALHO, W. CANILHA, L. FERRAZ, A. MILAGRES, A.M.F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. ***Química Nova***, vol.32, nº8, p.2191-2195, 2009.
15. CANILHA, L. ; SANTOS, V.T.O. ; ROCHA, G. J. M. ; ALMEIDA e SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. ; SILVA, S.S. ; FELIPE, M.G.A. ; FERRAZ, A. ; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. ***Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology***, v. 38, p. 1467-1475, 2011.
16. CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS – CGEE. ***Bioetanol Combustível: Uma oportunidade para o Brasil***. Brasília – DF, 2009. Disponível: < http://www.cgEE.org.br/publicacoes/bioetanol2_2009.php> Acesso em: 18/01/2013.
17. CHANG, V.S., HOLTZAPPLE, M.T. Fundamentals factors affecting biomass enzymatic reactivity. ***Appl. Biochemistry Biotechnology***, v.84, p.3-17, 2000.

- 18.CHARLESBY, A. Degradation of cellulose by ionizing radiation. **J. Polym. Sci.**, v.15, p.263–270, 1995.
- 19.CHUNDAWAT, S.P.S., VENKATESH, B., DALE, B.E. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. **Biotechnol. Bioeng.** 96 (2), 219-231, 2007.
- 20.CRAMPION, E.W.; MAYNARD, L.A. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. **J. Nutrition**, v.15, n.4, p.383-395, 1938.
- 21.DEKKER, R.F. **Biodegradation of the hemicelluloses**, In: Higushi, T. (ed.) Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components, pp. 505- 532. Academic press. New York, 1985a.
- 22.DEKKER, R.F. The enzymatic Hydrolysis of Biomass, In: Moraes, F.F; Zanin, G.M. (ed.) Anais do II **Seminário de “Hidrólise Enzimática de Biomassas”**, vol 1, pp.55-92. Maringá, 1985b.
- 23.DRAUDE, K. M.; HURNIAWAN, C. B.: DUFF, S. J. B. Effects of oxygen delignification on the rate and extend of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresource Technology**, 79, p.113-120, 2001.
- 24.DRISCOLL, M; STIPANOVIC, A.; WINTER, W.; CHENG, H.; MANNING, M.; SPIESE, J.; GALLOWAY, R. A.; CLELAND, M. R. Electron beam irradiation of cellulose. **Radiat. Phys. Chem**, v.78, p.539-542, 2009
- 25.DUARTE, C. L. **Aplicação do processo avançado de oxidação por feixe de elétrons na degradação de compostos orgânicos presentes em efluentes industriais**. 1999. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

26. DUARTE, C. L.; GERALDO, L. L.; P. JUNIOR, O. A.; BORRELY, S. I.; SATO, I. M.; SAMPA, M. H. O. Treatment of effluents from petroleum production by electron beam irradiation. ***Radiat. Phys. Chem***, v.71, n.1, p.445-459, 2004.
27. DUARTE, C. L.; OIKAWA, H.; MORI, M. N.; SAMPA, M. H. O. Present status of environmental application of electron beam accelerator in Brazil. In: ***International Symposium on Utilization of Accelerators***, Viena, International Energy Agency, p.1-8, 2006.
28. DUARTE, C. L.; SAMPA, M. H. O.; RELA, P. R.; OIKAWA, H.; SILVEIRA, C. G. Advanced oxidation process by electron-beam-irradiation induced decomposition of pollutants in industrial effluents. ***Radiat. Phys. Chem*** v.63, n.3, p.647-651, 2002.
29. DUBEY, K. A.; PUJARI, P. K.; RAMNANI, S. P.; KADAM R. M.; SABHARWAL, S. Microstructural studies of electron beam-irradiated cellulose pulp. ***Radiat. Phys. Chem***, v.69, p.395-400, 2004.
30. DZIEDZIELA, W. M.; KOTYNSKA, D. J. Functional groups in γ irradiated cellulose. ***Radiat. Phys. Chem***, v.23, n.6, p. 723-725, 1984.
31. ELLIOTT, Arthur. ***Infra-red spectra and structure***. London, Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1969.
32. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA Embrapa, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_711200516719.html> Acesso em: 18/01/2013
33. ERENO, D. Álcool de Celulose. ***Pesquisa Fapesp***, 133, p. 29-31, 2007.
34. ERIKSSON, K. E.; BLANCHETTE, R.A., ANDER, P. ***Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components***. Springer-Verlag. Berlim. 416 p., 1990.

- 35.FAN, L.T.; LEE, H.Y.; BEARDMORE, D.H. Major Chemical and Physical Features of Cellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Hydrolysis. **Adv. Biochem. Eng.** v.14, p.101-117, 1980.
- 36.FAN, L.T.; LEE, H.Y.; GHARPURAY, M.M. **Cellulose Hydrolysis**, Berlin, vol. 3, p. 5-51, 1987.
- 37.FANG, J.M.; SUN, R. C.; SALISBURY, D.; FOWLER, P.; TOMKINSON, J. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkaline and hydrogen peroxide extractions. **Polymer Degradation and Stability**, v. 66, p. 423-432, 1999.
- 38.FENGEL, D. WEGENER, G. **Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter, Inc. New York, 1989.
- 39.FOLDVÁRY, Cs. M; TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L. Effect of high energy radiation and alkali treatment on the properties of cellulose. **Radiat. Phys. Chem**, v.67, pp.505-508, 2003.
- 40.GABRIELLI, I.; GATENHOLM, P.; GLASSER, W.G.; JAIN, R.K.; KENNE, L. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate Polymers**, 43, pp.367-374, 2000.
- 41.GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants – state of the art. **Radiat. Phys. Chem**, 47(4), pp.581-593, 1986.
42. GETOFF, N.; SOLAR, S. Radiation induced decomposition of chlorinated phenols in water. **Radiat. Phys. Chem**, v. 31, p. 121-130, 1988.
- 43.CHENG, S; KERLUKE, D. R. Radiation processing for modification of polymers. **Annu. Tech.Conf. Soc. Plast. Eng.**, V.61 (3), pp.2694–2699, 2003.
- 44.GLASSER, W. G.; KELLY, S. S. **Encyclopedia of Polymer Science and Engeneering**. New York, John Wiley & Sons, Inc. Lignin. pp.796-849, 1987.

45. HAJI-SAEID, M.: SAMPA, M. H. O.; Radiation treatment for sterilization of packaging materials. **Radiat. Phys. Chem**, v.76, p.1535-1541, 2007.
46. HAN, Y.W.; CATALANO, E.A.; CIEGLER, A. Chemical and physical properties of sugarcane bagasse irradiated with γ rays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.311, pp.34-38, 1983.
47. HASSUANI, S. J. Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash/Suleiman José Hassuani, Manoel Regis Lima Verde Leal, Isaías de Carvalho Macedo – Piracicaba: **PNUD-CTC**, 2005. p. 217. (Série Caminhos para Sustentabilidade).
48. HENRISSAT, B., TEERI, T. T. WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**. v.425, pp.352-354, 1998.
49. HOLTZAPPLE, M. T. **Hemicellulose**. In: Macrae R, Robinson R. K., Sadler M.J, editors. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition, vol.2, London: Academic Press. p.2324-2334, 1993b.
50. HOLTZAPPLE, M. T.; CARAM, H. S.; HUMPHREY, A.E. The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 775-780, 1984.
51. HOLTZAPPLE, M. T.; Li Zhu, Jonathan P. O'Dwyer, Vincent S. Chang, Cesar B. Granda Structural features affecting biomass enzymatic digestibility **Bioresource Technology** v.99, p. 3817–3828, (2008)
52. I Ax – TECHNOLOGIES – General Dynamitron Manual of Electron beam Accelerator. “Radiation Dynamics, “INC – RDI” – 1996. Disponível em: www.iaxtech.com. Acesso em:03/01/2013

53. JEFFRIES, T.W. **Biodegradation of lignin and hemicelluloses**. In: Ratledge, C. (ed.) *Biochemistry of Microbial Degradation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 1994, p. 233-277.
54. JEFFRIES, T.W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 27, 1-32, 1983.
55. KHAN, F.; AHMAD, S. R.; KRONFLI, E. γ Radiation induced changes in the physical and chemical properties of lignocellulose. ***Biomacromolecules***, vol.7, p.2303-2309, 2006.
56. KIRK, T.K.; CULLEN, D. **Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi**. In: Young, R. and Akhtar, M. *Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. New York: John Wiley and Sons, 1998, p. 273-308.
57. KIRK, T.K.; SCHULTZ, E.; CONNORS, W.J.; LORENZ, L.F.; ZEIKUS, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. ***Archives of Microbiology***. 117: 277-285, 1978.
58. KOENIG, L. J. **Spectroscopy of Polymers**. 2^o ed. New York, Elsevier Science Inc., 1999.
59. KUHAD, R.C.; SINGH, A.; ERIKSSON, K.E.L. **Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls**. In: Eriksson, K.E.L., *Biotechnology in the pulp and paper industry*. Berlin: Springer-Verlag, 1997, p. 45-126 (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology).
60. KUMAKURA, M; KAETSU, I. Radiation-induced degradation and subsequent hydrolysis of waste cellulose materials. ***I. Journal of Applied Radiation and Isotopes***, V.30, p.139-141, 1978.

61. KUMAKURA, M.; KAETSY, I.; FUJIMURA, T. Utilization of radiation technique on the saccharification and fermentation of biomass. **Radiat. Phys. Chem**, v.18, n.3-4, p.827-835, 1981
62. KUMAKURA, M.; KAETSY, I. Effects of radiation pretreatment of bagasse on enzymatic and acid hydrolysis. **Biomass**, v.3, n.3, p.199-208, 1983.
63. KUMAKURA, M.; KAETSY, I. Effects of electron beam current on radiation pretreatment of cellulosic wastes with electron beam accelerator. **Radiat. Phys. Chem**, v.23, n.5, p.523-527, 1984.
64. KUMAR, R., MAGO, G., BALAN, V. WYMAN, C. Physical and chemical characterization of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. **Biores. Technol.**, v.100, 3948-3962, 2009
65. LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresources Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002,
66. LEHNINGER, A.L. **Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function**. New York, 1985. 833 p.
67. LEONHARDT, J.W.; HENNING, A.; NEHRING, K.; BAR, M.; FLACHOWSKY, G.; WOLF, I. **Gamma and electron radiation effects on agricultural by-products with high fiber content**. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Nuclear techniques for assessing and improving ruminant feed*. Vienna, 1983. p.195-202.
68. LEE, S.; SHAH, Y.T. **Biofuels and Bioenergy – Processes and Technologies**. CRC Press, Ohio, USA, p. 93-140, 2012.,

69. LU Y, YANG B, GREGG D, SADDLER JN, MANSFIELD SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam exploded softwood residues. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.98-100, p.641-654, 2002.
70. LYND, L.R.; Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass. **Ann. Rev. Energy Environmental**, v. 21, p.403-465, 1996.
71. MACHADO, F. B. P.. **Brasil, a doce terra**. UDOP – União dos Produtores de Bioenergia. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=26351>> Acesso: 18/01/2013
72. MANDELS, M.; REESE, E.T., In: Reese, E.T. (ed.) **Advances in enzymatic hydrolysis of cellulose and related material**. Pergamon, New York, p.115, 1963.
73. MANI, S.; TABIL, L. G. OPUKU, A. **Etanol from agricultural crop residues**, an overview Asae/Csae North Central Intersectional Meeting. Canada, 2002.
74. MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnol. Prog.**, v.15, p.804-816, 1999.
75. McLAREN, K. G. Degradation of cellulose in irradiated wood and purified celluloses. **Intern. J. Appl. Radiat. Isotop.** V.29, P.631-635, 1978.
76. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA - MAPA – Estatísticas. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>. Acesso em: 22/02/2013.
77. MORI, M. N.; SAMPA, M. H. O.; DUARTE, C. L. Study of the degradation of chlorpyrifos by ionizing radiation. **J. Radioanal. And Nucl. Chem.**, v.270 (1), p.99-102, 2006.

78. MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, 96, p.673-686, 2005.
79. MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyses for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. v.93, p. 1-10, 2004.
80. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. "Analytical Procedures for Standard Biomass Analysis." Available electronically (2010), http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
81. NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY. Determination of sugars, byproducts and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510 – 42623, 2006.
82. OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa, **Química Nova**, v.33, nº7, p.1549-1558, 2010.
83. PALMQVIST, E, HAHN-HÅGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. v.74, p.25-33, 2000.
84. PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Biosource Technology**, p.69-80, 2000.
85. PESQUISA FAPESP - **Álcool a partir do bagaço da cana** - Edição Impressa 95 - Janeiro 2004 - www.fapesp.br – Acesso em: 08/04/2008
86. **PETROBRÁS** - *Segunda geração de biocombustíveis: Petrobrás desenvolve tecnologia*. Disponível em:: <<http://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/r1->

segunda-geracao-biocombustiveis-petrobras-desenvolve-tecnologia-26-10-07.htm> Acesso: 18/01/2013

87. Plano Decenal de Expansão de Energia 2020 PDE-2020 / Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Brasília: MME/EPE, 2011. Disponível em: < http://www.epe.gov.br/PDEE/20120302_1.pdf > Acesso em: 18/01/2013
88. PLANO NACIONAL DE AGROENERGIA – 2006-2011 / **PNA-2005**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: < <http://docsagencia.cnptia.embrapa.br/cana/AGROENERGIA.pdf>> Acesso em: 18/01/2013.
89. PLANO NACIONAL DE ENERGIA 2030 / **PNE-2007**. Ministério de Minas e Energia ; colaboração Empresa de Pesquisa Energética. Brasília : MME : EPE, 2007. Disponível em:< http://www.epe.gov.br/PNE/20080512_2.pdf> Acesso em: 18/01/2013
90. PORTAL BRASIL - ***Próxima safra de cana de açúcar será de 600 milhões de toneladas - Produção na temporada 2012/13 será 6,5% maior que a safra passada.*** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/arquivos/2012/08/09/proxima-safra-de-cana-de-acucar-sera-de-quase-600-milhoes-de-toneladas>> Acesso em: 18/01/2013.
91. ProÁlcool – Indústria Sucroalcooleira. **BiodieselBR**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool/programa-etanol.htm> Acesso em: 18/01/2013
92. Química verde no Brasil – 2010 – 2030. Edição revisada e atualizada. Brasília DF. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, CGEE, 2010. Disponível em: < <http://www.ladebio.org.br/download/quimica-verde-no-brasil.pdf>> Acesso em: 18/01/2013

93. RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, p. 863-871, 2003.
94. *Processo DHR*. Revista Química e Derivados. Disponível em: <www.quimica.com.br/revista/qd417/alcool4.htm> Acesso em: 18/01/2013.
95. REYES, J.; ZAMORA, P.P.; DURAN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulasas. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, v.21(2), p.140-143, 1998.
96. RIBEIRO, M.A.; ***Estudos sobre a Remoção de Metais Tóxicos em Efluentes Industriais após Irradiação com Feixe de Elétrons***, 2002. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN, São Paulo.
97. RODRIGUES, R.C.I.B., ROCHA, G.J.M., RODRIGUES, Jr, D., FILHO, H.J.I., FELIPE, M.G.A., PESSOA Jr, A.P. Scale-up diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate (SBHH). **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.101, pp.1247-1253, 2010.
98. SANTOS, F.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, vol.35, n.5, pp.1004-1010, 2012.
99. SEWALT V., GLASSER W., BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **J. Agri. Food Chem.**, v.45, p.1823–1828, 1997.
100. SCHMELLING, D. POSTER, D.; CHAYCHIAN, M; NETA, P.; MCLAUGHLIN, W.; SILVERMAN, J.; AS-SHEIKHLY, M. Applications of ionizing radiation to the remediation of materials contaminated with metals and polychlorinated biphenyls. **Radiat. Phys. Chem**, v.52, n.1-6, pp. 371-377, 1998.

101. SIMÕES, J. - Produção de Etanol Celulósico no País Depende de Investimento Privado; Só Dedini e Petrobras Têm Plantas-Piloto em Operação. Revista Inovação UNICAMP. Publicação:27/11/2007. Disponível em:<<http://www.inovacao.unicamp.br/destaques/producao-de-etanol-celulosico-no-pais-depender-de-investimentoprivado-so-dedini-e-petrobras-tem-plantas-piloto-em-operacao>> – Acesso em: 08/04/2008
102. SOARES, I. B.; TRAVASSOS, J. A.; BAUDEL, H. M.; BENACHOUR, M.; ABREU, C. A. M. Effects of washing, milling and loading enzymes on the enzymatic hydrolysis of a steam pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crop and Products**, n.33, p. 670-675, 2011.
103. SOARES, P. A., ROSSELL, C. E. V.; **Conversão da Celulose pela Tecnologia Organosolv** – NAIPPE Núcleo de Análise Interdisciplinar de Políticas e Estratégias da Universidade de São Paulo vol.3, 2004.
104. SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v.84, p.331-339, 2004.
105. SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p.1-11, 2002.
106. TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L.; BORSA, J.; FOLDVÁRY, Cs.; HARGITTAI, P.; ZOLD, O. Effect of γ irradiated on cotton-cellulose. **Radiat. Phys. Chem**, v.55, p.663-666, 1999
107. TAKÁCS, E.; WOJNÁROVITS, L.; FOLDVÁRY, Cs.; HARGITTAI, P.; BORSA, J.; SAJÓ, I. Effect of combined gamma-irradiation and alkali treatment on cotton-cellulose. **Radiat. Phys. Chem**, v.57, p.399-403, 2000.
108. TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotech.**, v.15, p.160-167, 1997.

109. THOMPSON, C.I.; LOWE, R. M.; RAGAUSKAS A. J. Imaging cellulose fiber with interfaces with fluorescence microscopy and resonance energy transfer. ***Carbohydrate Polymers***, v.69, p.799-804, 2007.
110. VITTI, M. S. S.; MASTRO, N. L.; KIKUCHI, O. K.; NOGUEIRA, N. L. Irradiação de resíduos fibrosos com feixe de elétrons: efeitos na composição química e digestibilidade. ***Scientia Agrícola***, v.55 (2), p.159-171, 1998.
111. WOODS, R.J. Radiation chemistry and its application to environment pollution. In: COOPER, J.C.; CURRY, R.D.; O'SHEA, K.E. ed. ***Environmental Applications of Ionizing Radiation***. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1998. p. 1-32.
112. YANG, B.; WYMAN, C. E.; Characterization of the degree of polymerization of xylooligomers produced by flow through hydrolysis of pure xylan and corn stover with water. ***Bioresource Technology***, vol.99, p.5756-5762, 2008.

PUBLICAÇÕES

Duarte, CL. Ribeiro, MA, Oikawa H, Mori, MN, Napolitano, CM, Galvão, CA. 2012. Electron beam combined with hydrothermal treatment for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. ***Radiat. Phys. Chem.*** 81 (8), p. 1008-1011.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969806X11004063>

Duarte, C.L., et al., Study of thermal treatment combined with radiation on the decomposition of polysaccharides in sugarcane bagasse. ***Radiat. Phys. Chem.*** (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.06.019>

Ribeiro, M.A., et al., Degradation mechanism of polysaccharides on irradiated sugarcane bagasse. ***Radiat. Phys. Chem.*** (2012),

<http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.06.034>