UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO EM MICROONDAS DA FIBRA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.) SEGUIDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

FORTALEZA
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO EM MICROONDAS DA FIBRA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.) SEGUIDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

FORTALEZA

2010

R617e Rodrigues, Tigressa Helena Soares

Estudo do pré-tratamento alcalino em microondas da fibra do caju (Anacardium occidentale L.) seguido de hidrólise enzimática para produção de etanol/ Tigressa Helena Soares Rodrigues, 2010.

69 f. ; il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves

Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2010.

1. Caju – tratamento 2. Álcool – controle de produção 3. Saccharomyces cerevisiae I. Gonçalves, Luciana Rocha Barros (orienta.). II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDD 660

TIGRESSA HELENA SOARES RODRIGUES

ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO EM MICROONDAS DA FIBRA DO CAJU (*Anacardium occidentale* L.) SEGUIDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Sueli Rodrigues
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido saúde e disposição para os estudos.

À minha família, pelo apoio moral, compreensão, atenção e incentivo na minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves, pela oportunidade, paciência e dedicação em fazer de sua experiência profissional e pessoal parte do meu crescimento, e por sua confiança no meu trabalho.

À Profa. Maria Valderez Ponte Rocha, com quem iniciei na carreira acadêmica, minha eterna gratidão pela experiência de vida repassada e sincera amizade, uma homenagem especial.

Ao Dr. Gustavo Adolfo Saavedra Pinto, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, que dedicou sua experiência e seu tempo em minha formação pessoal e profissional, e por ter gentilmente cedido a matéria-prima para realização deste estudo.

À Profa. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, que contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior e à Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia, pela gentileza em me receber no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPE para a caracterização do bagaço de caju. Aos amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos, em especial a doutoranda Solange Vasconcelos que me acompanhou durante os experimentos de caracterização.

À Profa. Sandra R. Ceccato Antonini, pelas orientações para o enriquecimento deste trabalho.

Ao Prof. Antonio Eurico Belo Torres, que gentilmente contribuiu para realização das análises de caracterização do bagaço de caju.

À Agência Nacional do Petróleo pela oportunidade e suporte financeiro no desenvolvimento desse estudo, em especial ao prh – 31: Prof. HosibeRto Batista Sant'Ana (coordenador do programa), Joselene Lima (secretária do programa) e Prof. Alexandre Abreu (professor visitante).

Ao Diego pela paciência, compreensão e carinho.

A todos os professores que fizeram parte da minha história educacional, que me abriram novos horizontes dentro da minha formação profissional.

Aos meus amigos do GPBio, que fazem desse grupo um ambiente divertido e agradável de trabalhar, meu carinho por todo o conhecimento e paciência repassados no desenvolvimento dos experimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioprocessos, da Embrapa Agroindústria Tropical, pela saudosa convivência durante a graduação no desenvolvimento dos experimentos de iniciação científica.

Aos meus colegas de Graduação e Pós-Graduação, que contribuíram para minha formação, trocando experiências, cada um dando sua contribuição para o melhor aprendizado do grupo.

RESUMO

Neste trabalho, estudaram-se aspectos do pré-tratamento alcalino em microondas e hidrólise enzimática da fibra do caju para produção de etanol. A primeira etapa do trabalho foi a caracterização da matéria-prima, bagaço de caju, obtendo-se teores de 19,21% ± 0,35 de celulose, 12,05% ± 0,37 de hemicelulose e 38,11% ± 0,08 de lignina. O pré-tratamento do bagaço de caju, anteriormente imerso em solução de hidróxido de sódio até homogeneização, foi conduzido em aparelho de microondas doméstico. Como não foi possível a extração do hidrolisado por filtração após o pré-tratamento, uma alíquota obtida da primeira lavagem para ajuste do pH foi injetada no HPLC, não se identificando concentração apreciável de açúcares. Diante disso, a análise de açúcares foi realizada por HPLC após a hidrólise enzimática do material pré-tratado. As condições de hidrólise enzimática foram fixadas em 2% (m/v) de concentração de sólidos, atividade enzimática de 15 FPU/g de fibra pré-tratada em microondas (CAB-M), pH 5 a 45ºC e 150 rpm. Avaliou-se a influência da concentração do álcali na geração de glicose, após a etapa de hidrólise enzimática, acompanhando-se também os perfis de celobiose e xilose. Os maiores rendimentos de glicose, 76,4 e 72,9 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, foram obtidas em ambas concentrações de NaOH estudadas, 0,2 e 1,0 M, respectivamente. Neste caso, a digestibilidade de celulose alcançada foi de 33,89% ± 1,06 e 29,75% ± 3,10, respectivamente. As maiores concentrações de celobiose foram obtidas na maior concentração de NaOH estudada (1,0 M). Em relação aos níveis de celulose, hemicelulose e lignina, a concentração de 1,0 M apresentou maior destaque pelo acréscimo na porcentagem de celulose (22,07% ± 1,03), e hemicelulose (14,36% ± 0,44) e redução da porcentagem de lignina para 32,38% ± 1,86. Estudou-se também, mantendo-se a concentração de NaOH em 1,0 M, a influência da potência das microondas (600 e 900 W) e do tempo de pré-tratamento (15 e 30 minutos). Nestes ensaios, observou-se que o aumento no valor destas variáveis não influenciou nas concentrações de glicose resultantes. Em seguida, realizaram-se ensaios visando o aumento nos teores de açúcares com vistas à fermentação do hidrolisado. As variáveis estudadas foram a concentração de sólidos (2 e 16% m/v) e atividade enzimática (15 e 30 $FPU.g^{-1}_{CAB\text{-}M}$). Em relação à concentração de sólidos, observou-se um aumento na concentração final de glicose, de 1,5 $g.L^{-1}$ para 8,8 $g.L^{-1}$, quando se aumentou o teor de 2 para 16% (m/v). Mantendo-se o teor de sólidos em 16% (m/v), avaliou-se o efeito do aumento na atividade enzimática, obtendo-se uma concentração de glicose 1,8 vezes maior, ou aproximadamente 15 $g.L^{-1}$, quando se utilizaram 30 $FPU/g_{CAB\text{-}M}^{-1}$. Após a hidrólise enzimática, realizou-se filtração do hidrolisado, ajuste do pH para 4,5-5,0 e esterilização para posterior etapa de fermentação. A fermentação do hidrolisado por *Saccharomyces cerevisiae* resultou, após 4 horas de fermentação, em concentração de etanol e produtividade de 5,6 $g.L^{-1}$ e 1,41 $g.L.^{-1}h^{-1}$, respectivamente. Os resultados de eficiência e rendimento foram de 93,44% e 0,48 $g_{Etanol}.g_{Glicose}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o bagaço de caju é matéria-prima interessante para produção de etanol, porém as variáveis do pré-tratamento por microondas precisam ainda ser melhor estudadas visando o aumento da concentração de glicose no hidrolisado obtido após hidrólise enzimática.

Palavras chave: Bagaço de caju, Pré-tratamento, Microondas, Etanol e *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

In this work, some aspects of microwave alkali (NaOH) pretreatment of CAB (cashew apple bagasse) and its enzymatic hydrolysis were studied to ethanol production. CAB was previously submerged in alkali solution, after that, it was treated in a domestic microwave oven. First, biomass composition of CAB was determined, and the percentage of cellulose, hemicellulose and lignin was, 19.21% ± 0.35, 12.05% ± 0.37 and 38.11% ± 0.08, respectively. After the pretreatment, a sample of the liquid fraction, after the first wash, was collected and analyzed by HPLC. However, no glucose, or any other sugar, was detected. Therefore, the sugars were accomplished after enzymatic hydrolysis of the pretreated material (CAB-M). The conditions of enzymatic hydrolysis were: 2% (m/v) of solid concentration, enzymatic activity of 15 FPU/$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, pH 5, 45ºC and 150 rpm. The influence of alkali concentration on glucose production and the cellobiose and xylose profiles was evaluated. Results showed that, after enzymatic hydrolysis, alkali concentration exerted influence on glucose formation, and the best result was achieved in both concentrations studied (0.2 e 1.0 M), 76.4 and 72.9 mg.$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, respectively. In this case, the digestibilities of cellulose were 33.89% ± 1.06 and 29.75% ± 3.10, respectively. The highest cellobiose concentration was achieved when 1.0 M was used, and this condition resulted in the following biomass composition: 22.07% ± 1.03 of cellulose, 14.36% ± 0.44 of hemicellulose and 32.38% ± 1.86 of lignin. On the other hand, pretreatment time (15-30 minutes) and microwave power (600-900 W) exerted no significant effect on hydrolysis. During enzymatic hydrolysis, improvement on solid percentage (16% w/v) resulted in an increase of glucose concentration from 1.5 $g.L^{-1}$ to 8.8 $g.L^{-1}$. Increasing on enzyme loading (30 FPU.$g^{-1}_{CAB\text{-}M}$) at 16% w/v, increased glucose concentration to 15 $g.L^{-1}$. After enzymatic hydrolysis, the liquid fraction was separated by filtration. The pH was adjusted to 4.5-5.0 and the liquid was sterilized for fermentation. The fermentation of the hydrolyzate by *Saccharomyces cerevesiae* resulted in ethanol concentration and productivity of 5.6 $g.L^{-1}$ and 1.41 $g.L^{-1}.h^{-1}$, respectively. The results obtained of efficiency and ethanol yield were 93.44% and 0.48 g/g glucose, respectively. The results obtained in this work indicate that cashew apple bagasse is an interesting raw material for ethanol production; however some aspects of microwave alkali pretreatment have to be further investigated to increase glucose concentration after enzymatic hydrolysis.

Key words: Cashew apple bagasse, Alkali microwave pretreatment, Ethanol and *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE SÍMBOLOS

FP	Papel de filtro Whatman n°1
CB	Celobiose
CAB	*Cashew apple bagasse* (bagaço de caju)
CAB-M	*Cashew apple bagasse* (bagaço de caju) pré-tratado em microondas
Qp	Produtividade de etanol
η	Eficiência do processo fermentativo
Yp/s	Fator de conversão de substrato (glicose) em produto (etanol)
t	Tempo de fermentação
Pf	Concentração de produto (etanol)
Si	Concentração de substrato inicial (glicose)
Sf	Concentração de substrato final (glicose)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS..... i
LISTA DE TABELAS..... iii
1. Introdução..... 1
2. Revisão Bibliográfica..... 4
2.1 Estrutura da biomassa lignocelulósica..... 4
2.2.1 Celulose..... 4
2.1.2 Hemicelulose..... 5
2.1.3 Lignina..... 5
2.2 Produção de etanol de lignocelulósicos..... 6
2.2.1 Pré-tratamento..... 7
2.2.2 Hidrólise Enzimática..... 9
2.2.3 Fermentação..... 10
2.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica..... 10
2.3.1 Pré-tratamento ácido..... 11
2.3.2 Pré-tratamento alcalino..... 12
2.3.3 Pré-tratamento por microondas..... 14
2.4 Produção de etanol do hidrolisado obtido do pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de caju..... 17
3. Materiais e Métodos..... 18
3.1 Materiais..... 18
3.1.1 Pré-tratamento..... 18
3.1.1.2 Matéria-prima..... 18
3.1.1.3 Microondas..... 18
3.1.2 Hidrólise enzimática..... 19
3.1.2.1 Enzima 19
3.1.3 Fermentação..... 19
3.1.3.1 Microrganismo..... 19
3.1.3.2 Meios de cultura..... 20
3.1.3.2.1 Meio de manutenção e propagação do inóculo..... 20
3.2 Métodos..... 21
3.2.1 Pré-tratamento..... 21

3.2.1.1 Preparação da matéria-prima..... 21
3.2.1.2 Caracterização da matéria-prima..... 21
3.2.1.3 Pré-tratamento com NaOH em microondas..... 21
3.2.1.4 Determinação do efeito da concentração de NaOH..... 22
3.2.1.5 Determinação do efeito da potência das microondas..... 22
3.2.1.6 Determinação do efeito do tempo de pré-tratamento..... 23
3.2.2 Hidrólise enzimática..... 23
3.2.2.1 Determinação da atividade enzimática no complexo enzimático..... 23
3.2.2.2 Hidrólise enzimática do material pré-tratado..... 23
3.2.2.3 Separação do hidrolisado..... 24
3.2.2.4 Estudo do efeito da concentração de sólidos e atividade enzimática..... 25
3.2.3 Fermentação do hidrolisado..... 25
3.2.3.1 Preparação do meio de cultivo 25
3.2.3.2 Propagação do inóculo..... 25
3.2.3.3 Fermentação..... 26
3.3 Métodos Analíticos..... 26
3.3.1 pH do meio de cultivo..... 26
3.3.2 Concentração de biomassa..... 27
3.3.3 Determinação da concentração de açúcares e etanol..... 27
3.3.4 Parâmetros cinéticos estudados no processo fermentativo..... 27
3.4 Análise estatística dos dados..... 28
4. Resultados e Discussões..... 29
4.1 Caracterização do bagaço de caju..... 29
4.2 Pré-tratamento do bagaço de caju..... 31
4.2.1 Efeito da concentração de álcali..... 32
4.2.2 Efeito da variação na potência do microondas..... 38
4.2.3 Efeito da variação no tempo de pré-tratamento 39
4.3 Hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado em microondas: Efeito da concentração de sólidos e atividade enzimática..... 42
4.4 Fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* do hidrolisado obtido após pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de caju..... 45
5. Conclusões..... 48
6. Referências Bibliográficas..... 50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Organização geral da estrutura dos lignocelulósicos..... 4

FIGURA 2 - Estrutura da celulose..... 5

FIGURA 3 - Principais compostos fenólicos que compõem a estrutura da lignina. (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferil e (c) álcool sinapil..... 6

FIGURA 4 - Fluxograma geral do processo de produção de etanol de lignocelulósicos.... 7

FIGURA 5 - Aparelho de microondas utilizado neste trabalho..... 18

FIGURA 6 - *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose..... 19

FIGURA 7 - Posição dos frascos Erlenmeyers durante o pré-tratamento da fibra do caju no aparelho de microondas..... 22

FIGURA 8 - Agitador orbital (Tecnal – TE 422) utilizado para hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado..... 24

FIGURA 9 - Agitador orbital (Tecnal – TE 420) utilizado para fermentação do hidrolisado obtido após pré-tratamento alcalino da fibra de caju em microondas..... 26

FIGURA 10 - Bagaço de caju *in natura* (A), tratado com 0,2 $mol.L^{-1}$ (B) e 1,0 $mol.L^{-1}$ (C) de NaOH em microondas a 600 W de potência durante 15 minutos..... 30

FIGURA 11 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos..... 33

FIGURA 12 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de celobiose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos..... 35

FIGURA 13 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de xilose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos..... 36

FIGURA 14 - Digestibilidade de celulose após a influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de glicose durante a hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos..... 38

FIGURA 15 - Influência da variação da potência do aparelho de microondas na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra com 1,0 $mol.L^{-1}$ de NaOH, após 15 minutos de pré-tratamento..... 39

FIGURA 16 - Influência da variação do tempo de pré-tratamento na obtenção de glicose

após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, realizado em microondas a 600 W de potência..... 40

FIGURA 17 - Influência da variação do tempo de pré-tratamento na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, realizado em microondas a 900 W de potência..... 41

FIGURA 18 - Rendimentos de glicose após hidrólise enzimática (15 FPU.$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$) de CAB-M (2 e 16% m/v) pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W por 15 minutos.... 42

FIGURA 19 - Rendimentos de glicose após hidrólise enzimática (15 e 30 FPU.$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$) de CAB-M (16% m/v) pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W por 15 minutos..... 44

FIGURA 20 - Perfil de fermentação do hidrolisado obtido após enzimática hidrólise (30 FPU.$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$) de CAB-M (16% m/v) pré-tratado com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W de potência por 15 minutos e *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm. Glicose (■), Etanol (●), Biomassa (▲), Glicerol (▼) e Xilose (►)..... 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação dos pré-tratamentos segundo o efeito sobre a matéria-prima. 8

TABELA 2 - Parâmetros estudados na literatura no pré-tratamento com microondas combinado com hidróxido de sódio..... 16

TABELA 3 - Composição do meio para propagação de células de *S. cerevisiae*..... 20

TABELA 4 - Caracterização do bagaço de caju após pré-tratamento alcalino em microondas. Após 15 minutos de exposição e 600 W de potência..... 30

TABELA 5 - Determinação de lignina do bagaço de caju após pré-tratamento alcalino em microondas. Após 15 minutos de exposição e 600 W de potência..... 31

TABELA 6 - Digestibilidade após 72 h de hidrólise enzimática para fibra pré-tratada após variação da concentração de NaOH (600 W por 15 minutos)..... 37

TABELA 7 - Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação com *S. cerevisiae* para diversos substratos da literatura..... 47

1. INTRODUÇÃO

O aumento populacional associado ao consumo crescente de energia, principalmente os derivados do petróleo, que por sua vez não são de fontes renováveis, tem impulsionado pesquisas na busca por fontes alternativas de energia que atenda a grande demanda por combustíveis. Associado ao problema da demanda, problemas ambientais estão envolvidos no uso em demasia de combustíveis de origem fóssil. Com isso, o interesse por combustíveis alternativos tem se expandido. Para que um biocombustível seja uma alternativa ambiental e economicamente viável frente aos demais, é necessário que este seja energeticamente competitivo, menos poluente e sua produção possa ser realizada em larga escala sem a competição por áreas de cultivo alimentar (Alzate e Toro, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.,* 2006; Hill *et al.,* 2006; Kim *et al.*, 2008).

Nesse sentido, a conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, especialmente a produção de etanol por fermentação do licor extraído da biomassa rico em fonte de carbono, conhecido também por etanol de segunda geração, vem sendo avaliada como rota promissora de bioenergia (Sun e Cheng, 2002; Alzate e Toro, 2006; Zhu *et al.*, 2006).

Em alguns países da Europa e principalmente no Brasil e EUA, o etanol é utilizado em larga escala, com perspectivas de ser o combustível renovável dominante no setor de transporte nos próximos 20 anos. Uma preocupação crescente em relação à oferta de combustíveis fósseis tem sido evidenciada pelos crescentes e oscilantes preços do barril de petróleo no mercado, o qual se aproximou de US$ 150,00 por barril, durante o ano de 2008 (Revista Época, 2008). Além disso, a expansão da utilização do etanol contribui para redução da emissão dos gases que contribuem para o efeito estufa (Nigam, 2000; Persson *et al.*, 2002; Alzate e Toro, 2006; Hahn-Hägerdal, *et al.*, 2006).

Etanol é atualmente produzido da sacarose da cana-de-açúcar e do amido de milho, entre outros materiais amiláceos. Contudo, vantagens podem ser enumeradas com relação à utilização de materiais lignocelulosícos, principalmente os resíduos agroindustriais para obtenção de etanol: inexistência de conflitos por disputa de terras para cultivo de alimentos ou matéria-prima para produção de energia, redução dos impactos ambientais resultantes do acúmulo desses resíduos, criação de novas oportunidades em regiões rurais, minimização da emissão de poluentes, entre outros (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Os materiais lignocelulósicos representam a maior porcentagem de biomassa de baixo custo existente, abrangendo resíduos de origem doméstica, agrícola e industrial, permitindo a obtenção de um combustível de valor agregado além da reutilização de um rejeito (Alzate e Toro, 2006; Hu e Wen, 2008). Esses materiais são em sua maioria constituídos de cerca de 60 a 75% de celulose e hemicelulose, que juntos com lignina compõem a estrutura dos vegetais (Vásquez *et al.*, 2007).

As agroindústrias no Nordeste brasileiro representam papel sócio-econômico relevante na economia regional, em especial a agroindústria do caju, sendo o estado do Ceará o maior produtor de caju, seguido dos estados do Rio Grande do Norte e Piauí. O beneficiamento do caju tem por principal finalidade a produção de castanha, um produto tipo exportação de grande valor no mercado externo. O mercado interno e externo do beneficiamento da castanha em 2008 foi de aproximadamente 267.355 toneladas, representada pela movimentação superior a 146 milhões de dólares em exportações de amêndoas, milhares de empregos, diretos e indiretos, em todas as atividades dos segmentos produção, industrialização e comercialização da cadeia agroindustrial (Revista da FIEC, 2009).

No momento do descastanhamento, grande parte do pedúnculo, cerca de 90%, é desperdiçada sendo parte perdida ainda no campo. No processamento do pedúnculo do caju para produção de bebidas, principal aplicação do pseudofruto, 40% (m/m) de bagaço são obtidos, que por sua vez não possuem valor comercial podendo ser adquirido por R$ 0,25/Kg (Paiva *et. al.*, 2002; Assunção e Mercadante, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Matias *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007). Nesse contexto, a fibra do caju se enquadra como fonte lignocelulósica alternativa abundante e de baixo custo para obtenção de açúcares fermentescíveis e sua subseqüente conversão em etanol.

Diante disso, a produção de bioetanol, a partir desses materiais, baseia-se na etapa inicial de padronização do tamanho de partícula seguida de pré-tratamento com vistas à disponibilização da celulose e hemicelulose presente no resíduo para etapa posterior de hidrólise enzimática. Em geral, os açúcares obtidos das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática são fermentados por uma vasta microbiota como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A lignina, outro componente dos lignocelulósicos, depois de separado, pode ser utilizada como fonte de energia ou aditivo na produção de polímeros (Gosselink *et al.*, 2004; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Atualmente, uma diversidade de pré-tratamentos tem sido avaliada na remoção de açúcares de lignocelulósicos, destacando-se pré-tratamento com ácido diluído em simples e duplo estágio; amônia, peróxido de hidrogênio e em microondas (Saha, 2003; Wyman *et al.*, 2005a; Hu e Wen, 2008). Em relação ao pré-tratamento em microondas, trata-se de um método alternativo e de eficiência reconhecida na geração de calor por radiação, além de fácil operação (Zhu *et al.*, 2005). Estudos relatam que a radiação proveniente das microondas é capaz de alterar a estrutura da parede celular dos vegetais gerando calor interpartícula, contribuindo para uma maior ruptura das estruturas recalcitrantes da lignocelulose, degradando a lignina e parte das hemiceluloses, elevando a acessibilidade enzimática durante a hidrólise (Zhu *et al.*, 2005; Hu e Wen, 2008; Ma *et al.*, 2009).

Nesse contexto, este trabalho objetiva o estudo do pré-tratamento do bagaço de caju com hidróxido de sódio (NaOH) combinado com microondas para geração de açúcares fermentescíveis através da hidrólise enzimática do material tratado e, subseqüente, fermentação do licor obtido por *Saccharomyces cerevisiae* para produção de etanol.

Para alcançar o objetivo, inicialmente realizou-se a caracterização da matéria-prima, bagaço de caju. No pré-tratamento, estudou-se a variação da concentração de hidróxido de sódio, da potência do microondas e do tempo de pré-tratamento. Na etapa de hidrólise enzimática, estudou-se a variação da concentração de sólidos e atividade enzimática. Por fim, a partir do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise enzimática, realizou-se fermentação pela levedura *S. cerevisiae*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Estrutura da biomassa lignocelulósica

Em geral, os materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, que se encontram associados em uma estrutura complexa definindo a estrutura da maioria dos vegetais (Figura 1). A composição desses constituintes varia de acordo com a natureza do vegetal. Em geral, o maior componente é a celulose (35–50%), seguido da hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%). Proteínas, gorduras e cinzas fazem parte de uma fração do lignocelulósico. A organização e interações entre esses componentes contribuem para a formação de uma barreira natural que reduz o acesso de enzimas hidrolíticas à cadeia de celulose desses materiais (Keshwani, 2009).

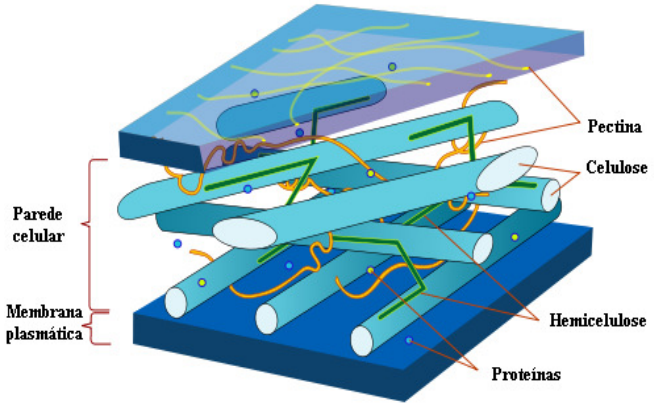


Figura 1 - Organização geral da estrutura dos lignocelulósicos[1].

2.1.1 Celulose

Celulose é um homopolímero formado de unidades de β-D-glicose que são ligadas por interações β-1,4-glicosídicas (Figura 2). A natureza dessas ligações resulta a formação de uma cadeia linear de moléculas de glicose (Keshwani, 2009). Diante disso, a celulose existe

[1] www.nature.com/nrg/journal/v9/n6/full/nrg2336.html, acessado em 01 de novembro de 2009

na natureza na forma cristalina, sendo essa característica uma barreira para sua hidrólise enzimática.

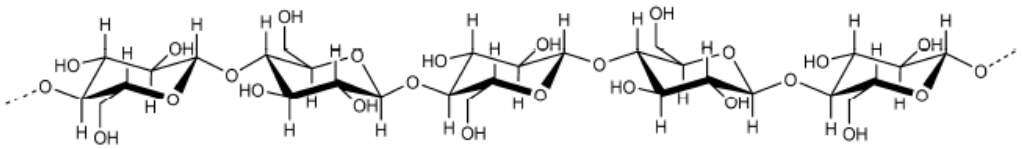


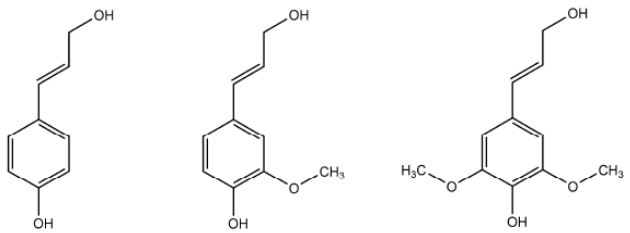
Figura 2 - Estrutura da celulose.

2.1.2 Hemicelulose

Ao contrário da celulose, as hemiceluloses são heteropolímeros constituídos de açúcares de cinco carbonos, como xilose e arabinose, e seis carbonos, a exemplo de galactose, manose e glicose. Enquanto a estrutura da celulose é constante, a hemicelulose pode variar, além da composição, sua organização estrutural. Como resultado da interação entre os diferentes açúcares, a hemicelulose apresenta baixa cristalinidade em relação à celulose sendo mais facilmente hidrolisada (Saha, 2003).

2.1.3 Lignina

Em contraste com a celulose e a hemicelulose, a lignina é um polímero complexo formado de compostos fenólicos (Figura 3), que são também chamados de monolignóis. As ligações aleatórias carbono-carbono entre os monolignóis resultam na formação de dímeros, trímeros e tetrâmeros que definem a estrutura complexa da lignina. Essas ligações carbono-carbono constituem o principal obstáculo à ruptura da cadeia de lignina (Gosselink *et al.*, 2004; Keshwani, 2009).



(a) (b) (c)

Figura 3 - Principais compostos fenólicos que compõem a estrutura da lignina: (a) álcool cumarílico, (b) álcool coniferil e (c) álcool sinapil.

2.2 Produção de etanol de lignocelulósicos

Atualmente, duas rotas destacam-se na produção de etanol de fermentação. No Brasil, a produção de etanol é realizada da fermentação da sacarose extraída da cana-de-açúcar. Em outros países, a conversão é realizada por materiais amiláceos na qual o processo acontece em duas etapas. Inicialmente, o amido é solubilizado para em seguida ser convertido em glicose que é fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Na conversão de materiais lignocelulósicos em etanol (Figura 4), a primeira etapa consiste no pré-tratamento da matéria-prima com a finalidade de remoção das estruturas primárias da matéria-prima tornando a celulose disponível ao ataque enzimático (Saha 2003; Saha *et al*, 2005a,b; Alzate e Toro, 2006). Em seguida, os polímeros de hemicelulose e celulose são hidrolisados por enzimas em seus monômeros que são convertidos em etanol por bactérias e leveduras. Destaca-se que o processo de hidrólise enzimática e fermentação podem acontecer em conjunto (SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas) ou de forma independente (Alzate e Toro, 2006; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

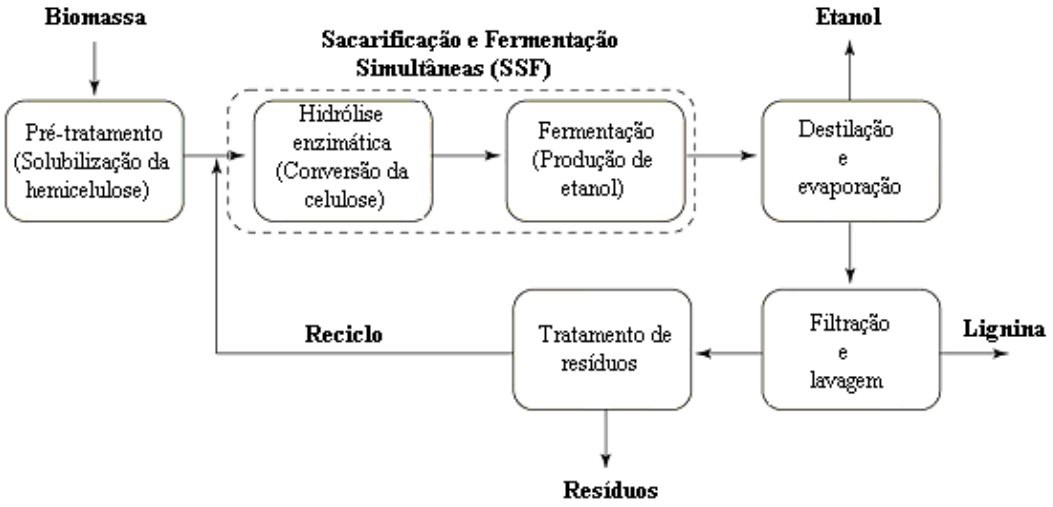


Figura 4 - Fluxograma geral de um processo de produção de etanol de lignocelulósicos (Hahn-Hägerdal *et al*., 2006).

Após a fermentação, o etanol é separado para ser finalmente comercializado, como combustível ou adicionado à gasolina. A lignina que é recuperada da matéria-prima pode ser utilizada no processo como fonte de energia. Atualmente, novas tecnologias estão em desenvolvimento para agregar valor à lignina no mercado de alimentos, fármacos, cosméticos e higiene pessoal (Gosselink *et al*., 2004; Hahn-Hägerdal *et al*., 2006).

2.2.1 Pré-tratamento

O objetivo do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é a redução da cristalinidade da celulose e solubilização das estruturas recalcitrantes da parede do vegetal. Diante disso, para que o processo de obtenção de etanol de lignocelulósicos seja um processo economicamente viável, é necessária uma seleção rigorosa do tipo de pré-tratamento a ser aplicado, uma vez que esta etapa irá influenciar diretamente os rendimentos de glicose durante a hidrólise enzimática do material. Um eficiente pré-tratamento minimizará os custos envolvidos na aquisição de enzimas, o que viabiliza o processo (Alzate e Toro, 2006; Hahn-Hägerdal *et al*., 2006).

Vários pré-tratamentos têm sido estudados na literatura para a disponilibilização da celulose, destacando-se pré-tratamento com ácidos (H_2SO_4, H_3PO_4 e SO_2) e com álcalis (NaOH, AFEX e H_2O_2) (Saha, 2003). No pré-tratamento ácido, a cadeia de hemicelulose é hidrolisada, enquanto no pré-tratamento alcalino, a lignina é solubilizada, sendo a hemicelulose hidrolisada por hemicelulases (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Em geral, o pré-tratamento é classificado de acordo com o efeito sobre matéria-prima, divididos em físicos, químico, físico-químico e biológico (Tabela 1). Cada categoria de pré-tratamento apresenta particularidades para aplicação em larga escala. Os físicos, embora simples, apresentam elevado custo energético. Os pré-tratamentos físico-químicos são eficientes, mas a produção de inibidores nesse processo é elevada. O que também ocorre com os pré-tratamentos químicos. Os biológicos são desinteressantes para aplicação comercial devido ao elevado tempo do processo. Em relação ao uso de microondas, o custo é maior quando combinado com o pré-tratamento químico, que aumenta o custo do processo, embora seja mais eficiente (Saha, 2003; Alzate e Toro, 2006; Hu e Wen, 2008; Keshwani, 2009).

Tabela 1. Classificação dos pré-tratamentos segundo o efeito sobre a matéria-prima.

Categoria	Exemplos
Físicos	Moagem, microondas.
Químicos	Ácidos, álcalis, solventes orgânicos, peróxidos e ozônio.
Físico-Químicos	Explosão a vapor, AFEX e explosão com CO_2.
Biológicos	Decomposição microbiana de lignina.

A eficiência do pré-tratamento está fortemente influenciada pela natureza da matéria-prima e sua composição em termos de celulose, hemicelulose e lignina. Portanto, para cada tipo de resíduo, existe um tipo específico de pré-tratamento que promove maior disponibilização da celulose. No caso de palha de milho, diversos pré-tratamentos estão sendo estudados na disponibilização dos açúcares (ácido diluído, vapor superaquecido e AFEX) (Um *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003; Wyman, 2005), sendo os rendimentos em açúcares obtidos próximos ao valor teórico após a hidrólise enzimática. No pré-tratamento com vapor

superaquecido, quando se utilizou pequenas quantidades de SO_2 ou somente vapor, os rendimentos em açúcares foram similares (Öhgren *et al.*, 2007). Para *softwood* (madeira mole), o pré-tratamento com H_2SO_4 ou SO_2 é essencial para a solubilização das hemiceluloses e aumento nos rendimentos dos açúcares após a hidrólise enzimática (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

O pré-tratamento com vapor adicionado com ácido tem sido eficiente tanto com resíduos agroindustriais como os da atividade florestal (Gollapalli, *et al.*, 2002; Söderström *et al.*, 2005). Outros métodos, como AFEX (explosão com vapor de amônia) e oxidação úmida, apresentam melhores resultados quando aplicados em resíduos agroindustriais.

2.2.2 Hidrólise enzimática

Na etapa de hidrólise enzimática, o material pré-tratado, rico em celulose é submetido ao contato com um coquetel de enzimas para a disponibilização da glicose presente. As condições ótimas de atividade enzimática no processo são particulares de cada extrato enzimático e influenciadas pela natureza do mesmo. Para celulases e β-glicosidases de fungos filamentosos existe uma faixa ótima de temperatura e pH para atividade enzimática, que se encontra em torno de 50°C e pH 4,0 – 5,0 (Tengborg *et al.*, 2001).

As celulases são um complexo de enzimas constituído de três enzimas com funções distintas, as endoglucanases (EG), celobiohidrolases (CBH) ou exoglucanases e a β-glicosidase. As endoglucanases inicialmente atacam aleatoriamente a cadeia de celulose para formar glicose, celobiose e celotriose. As celobiohidrolases fracionam a cadeia em dímeros de glicose (celobiose). Outra enzima, β-glicosidase possui a função de conversão da molécula de celobiose em duas moléculas de glicose, e sua ausência pode provocar inibição pelo produto devido ao excesso de celobiose formado (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006, Keshwani, 2009).

No caso da hidrólise enzimática da hemicelulose, o processo é mais complexo que o da celulose, porém apresenta a vantagem da maior acessibilidade ao substrato, pois a estrutura das hemiceluloses não é cristalina como as celuloses (Saha, 2003).

2.2.3 Fermentação

Ao contrário da fermentação da sacarose e do melaço da cana-de-açúcar, o hidrolisado obtido após hidrólise enzimática dos lignocelulósicos encontra-se rico em pentoses e hexoses além da presença de inibidores como ácidos orgânicos, furanos e fenóis formados durante o pré-tratamento do material. A principal pentose existente no hidrolisado, xilose, não é fermentada por leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. Bactérias anaeróbicas fermentam a xilose, mas apresentam inibição em elevadas concentrações de etanol. A levedura *Pichia stipitis* converte xilose em etanol apresentando razoáveis rendimentos e produtividade, entretanto seu crescimento é fortemente influenciado pela presença dos inibidores formados durante o pré-tratamento (Nigam, 2001; Yu e Zhang, 2003; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

Nesse sentido, a utilização de microrganismos recombinantes tem sido uma alternativa promissora para a maximização da produção de etanol, principalmente em processos SSF – sacarificação e fermentação simultâneas. Genes de *P. stipitis* de assimilação de pentose (xilose redutase e xilulose desidrogenase) têm sido introduzidos em cepas de *S. cerevisiae* (Chu e Lee, 2007; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Outra possibilidade é a manipulação dos genes responsáveis pela produção da enzima xilose isomerase da bactéria *Thermus thermophiluse* e do fungo *Piromyces sp.* que converte xilose em xilulose que por sua vez é metabolizada pela levedura (Kuyper *et al.*, 2003). Em cepas de *Zimomonas mobilis*, uma levedura que converte hexoses em etanol, genes de *Escherichia coli* foram introduzidos para induzir o consumo de xilose e sua conversão em etanol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

2.3 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Neste trabalho, diante da grande diversidade de pré-tratamentos na literatura, selecionaram-se três para serem descritos a seguir: pré-tratamento ácido, alcalino e por microondas.

2.3.1 Pré-tratamento ácido

Como anteriormente citado, o pré-tratamento ácido tem por finalidade a solubilização da hemicelulose dos lignocelulósicos minimizando os custos de aquisição de hemicelulases, além da liberação de parte da glicose presente na cadeia de celulose. Na literatura constam muitos trabalhos baseado no estudo do pré-tratamento com ácido diluído (Saha e Bothast, 1999; Söderström *et al.*, 2003; Um *et al.*, 2003; Yu e Zhang, 2003; Saha *et al.,* 2005(a,b); Rocha *et al.*, 2008).

Söderström *et al.,* (2003) estudaram o pré-tratamento de *softwood* (madeira mole) com ácido sulfúrico diluído em dois estágios. No primeiro, as condições foram fixadas em 0,5% (v/v) H_2SO_4, 180°C durante 10 min. No segundo estágio, os autores induziram uma maior severidade no pré-tratamento através da variação das condições de temperatura, tempo e concentração de ácido. Os autores destacaram que, após o primeiro estágio, houve remoção de cerca de 12% da celulose presente no material. No segundo, a remoção dos açúcares foi acima de 33% do valor teórico de acordo com a condição de pré-tratamento aplicada. Destaca-se que no segundo estágio, embora os rendimentos de açúcares tenham sido superiores, houve maior formação de inibidores, a exemplo do hidroximetilfurfural e furfural. Estes mesmos inibidores também foram identificados no segundo estágio do pré-tratamento ácido de palha de arroz e trigo nos estudos de Saha *et al.* (2005a,b).

Nos estudos de Um *et al.* (2003), os autores compararam o pré-tratamento com ácido sulfúrico e fosfórico diluídos de palha de milho. Além da concentração de ácido, os autores investigaram a influência do tempo de pré-tratamento fixando os demais parâmetros. Os autores afirmaram que o pré-tratamento com ácido é um método eficiente na disponibilização das hemiceluloses (62 – 90%) da palha de milho proporcionando uma boa digestibilidade da celulose presente (> 80%) após a etapa de hidrólise enzimática. Em todos os casos estudados, o desempenho com H_2SO_4 foi superior em relação ao pré-tratamento com H_3PO_4.

Saha *et al.* (2005a,b) estudaram o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído para dois lignocelulósicos distintos: palha de arroz e trigo. No caso da palha de trigo, uma faixa de concentração do ácido (0 – 1,0% v/v) foi estudada proporcionando uma conversão de 47% da celulose presente após a hidrólise enzimática do material. Quando os autores aumentaram a concentração do ácido para 4% (v/v), os rendimentos em açúcares obtidos quase dobraram de

valor. Para palha de arroz, foi realizado um estudo similar de variação das variáveis do pré-tratamento como tempo, temperatura e concentração do ácido. Neste caso, o maior rendimento em açúcares foi de 44% após a hidrólise enzimática do material pré-tratado com 1,0% (v/v) de H_2SO_4 a 160°C por 15 minutos. Contudo, um estudo do acréscimo do tempo de pré-tratamento foi realizado (30 e 60 minutos), sendo os rendimentos obtidos superiores ao caso anterior.

Na literatura acima referida para pré-tratamento com ácido, os autores ressaltaram a importância no estudo das variáveis mais influentes no pré-tratamento para determinação de uma condição ótima, destacando-se: concentração do ácido, concentração de sólidos e tempo de pré-tratamento. Diante disso, Rocha *et al.* (2008) estudaram esses parâmetros para bagaço de caju pré-tratado com ácido sulfúrico diluído. Nesse trabalho, os autores inicialmente fixaram a concentração de sólidos variando a concentração de ácido, posteriormente, realizou-se o estudo da concentração de sólidos e tempo de pré-tratamento. A condição que proporcionou melhores rendimentos em termos de rendimentos de glicose (81,4 mg/g de bagaço) foi: 0,6 $mol.L^{-1}$ de ácido, 30% (m/v) de sólidos e tempo de pré-tratamento de 15 minutos.

2.3.2 Pré-tratamento alcalino

Assim como o uso de ácidos para solubilização das hemiceluloses, o uso de álcalis tem sido estudado na solubilização da lignina dos lignocelulósicos, entretanto a utilização de álcalis como o hidróxido de sódio e outras bases apresentam desvantagens para aplicação em potencial. Em primeiro lugar o custo do reagente seguido de dificuldades na recuperação e recirculação do álcali, que possibilitaria a redução dos custos do processo (Wyman *et al.*, 2005).

Contudo, o pré-tratamento com amônia tem recebido destaque por, além de promover uma maior exposição da celulose pela modificação da estrutura da lignina facilitando o ataque enzimático, a amônia apresenta a facilidade de poder ser recuperada e reciclada devido à sua elevada volatilidade (Gollapalli *et al.*, 2002; Wyman *et al.*, 2005). O pré-tratamento por explosão de vapor com amônia (AFEX) também abrange uma elevada área superficial do lignocelulósico devido às propriedades de solvatação da água presente na

solução. Além disso, o processo pode ser realizado em vasos de pressão de custo inferior ao utilizado para pré-tratamento com ácido diluído e a amônia residual no hidrolisado pode posteriormente servir de fonte de nitrogênio durante a fermentação (Wyman *et al.*, 2005).

O processo AFEX com recirculação de amônia (10 a 15% m/v), conhecido por ARP (*ammonia recycle percolation*), tem sido estudado para palha de milho a elevadas temperaturas (150 – 170°C) (Kim *et al.*, 2003). Nos estudos de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), para o mesmo substrato, os valores de digestibilidade foram próximos de 90% após a hidrólise enzimática com carga enzimática de 10 FPU/g glicanas. Vale ressaltar que este processo também tem promovido elevados níveis de deslignificação para resíduos agroindustriais e madeiras (Kim *et al.*, 2000).

O pré-tratamento por hidróxido de cálcio ($Ca(OH)_2$) consiste na elevação do pH promovendo a solubilização da lignina, sendo uma alternativa de baixo custo para pré-tratamento. Em geral as proporções do reagente são de 0,1 g $Ca(OH)_2$/g biomassa, sendo que 5 g H_2O/g biomassa também é necessário no pré-tratamento. O pré-tratamento por $Ca(OH)_2$ pode ser realizado em uma ampla faixa de temperatura (25 – 130°C) durante horas até dias. Dependendo da temperatura de trabalho, este pré-tratamento remove aproximadamente 33% da lignina. No caso de materiais com baixo teor de lignina (*switchgrass*, ou grama), este nível de remoção de lignina proporciona elevada digestibilidade durante a hidrólise enzimática do material (Kaar e Holtzapple, 2000). Nos demais casos, é necessária a adição de oxigênio (pré-tratamento por oxidação úmida) em elevadas condições de temperatura e pressão (15 atm e 160°C) resultando em uma reação rápida com remoção de cerca de 80% de lignina (Chang *et al.*, 2001).

Saha e Cotta (2006) estudaram o pré-tratamento de palha de trigo com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 2,15% (v/v), 35°C por 24 horas. Os autores observaram que após a hidrólise enzimática o maior rendimento de açúcares foi de 96,7%, equivalente a 672 mg/g de biomassa, com a adição de um coquetel composto por três enzimas comerciais: celulase, β-glicosidase e xilanase.

Outra importante função dos álcalis após o pré-tratamento dos lignocelulósicos é a possibilidade de remoção de inibidores formados da degradação dos açúcares. Estes subprodutos incluem ácidos alifáticos, furaldeídos e compostos fenólicos (furfural e hidroximetilfurfural) que estão contidos do hidrolisado que posteriormente inibiriam o crescimento microbiano e a formação de etanol durante a fermentação (Persson *et al.*, 2002).

No trabalho de Persson *et al.* (2002), os autores estudaram o efeito de diversos álcalis (NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ e NH_3) e sais (NaCl, Na_2SO_4, KCl, K_2SO_4, $CaCl_2$ e $CaSO_4$) na remoção de inibidores presentes no hidrolisado obtido do pré-tratamento de *spruce* (*Picea abies*) com ácido sulfúrico diluído. O tratamento (*overliming*) foi realizado pelo ajuste do pH do hidrolisado em uma faixa de pH de 5,5 – 10,0 sob condições fixas de temperatura e agitação. Neste trabalho, a utilização de álcalis proporcionou maior remoção dos inibidores do que os sais, com destaque para o efeito da variação do pH. Valores elevados de pH resultam em maior remoção dos inibidores no hidrolisado.

Eken-Saraçoglu e Arslan (2000) estudaram o tratamento (*overliming*) do hidrolisado obtido do pré-tratamento com ácido diluído de sabugo de milho. O estudo foi realizado através de diferentes combinações de técnicas com álcalis e adsorventes, usando somente ajuste pH para 6,0 ou 10,0 ou seguido de adição de zeólita sob temperatura e agitação controladas. Os autores observaram que o ajuste do pH para 10,0 foi mais eficiente na remoção dos inibidores que o ajuste para 5,0, sendo esta condição a que proporcionou maior concentração de etanol após a fermentação. A adição de zeólita reduziu a concentração de açúcares iniciais provavelmente devido à adsorção dos açúcares no adsorvente.

2.3.3 Pré-tratamento por microondas

As microondas ocupam uma região do espectro eletromagnético entre o infravermelho e ondas de radiofreqüência. Essa região possui uma ampla faixa de freqüência variando de 300 MHz a 30 GHz, sendo que uma parcela dessa faixa é utilizada em transmissões de radares e telecomunicações. Com isso, limitou-se a utilização de aparelhos de microondas domésticos e industriais para uma faixa entre 900 MHz e 2,45 GHz (Keshwani, 2009).

A freqüência máxima de operação dos aparelhos de microondas, 2,45 GHz, é insuficiente para induzir qualquer atividade química nos materiais. Entretanto, se o material exposto contiver moléculas polares ou íons, a radiação pode acelerar o processo. Outras vantagens da utilização de tecnologias com microondas incluem a redução do investimento inicial, uniformidade e seletividade no processo, além da capacidade de iniciar e interromper o processo de forma instantânea (Keshwani, 2009).

Os benefícios associados à radiação com microondas têm levado este processo a inúmeras aplicações como secagem, aquecimento, cozimento e esterilização (Keshwani, 2009). Nesse contexto, é razoável o estudo do uso de microondas no pré-tratamento de lignocelulósicos.

Alguns autores relatam que o uso de microondas é um método alternativo em relação ao aquecimento convencional (Hu e Wen, 2008; De la Hoz *et al.*, 2005). Comparado ao aquecimento baseado na transferência de calor por condução e convecção, o qual é realizado pela transferência de calor superficial, as microondas apresentam a capacidade de criar um campo eletromagnético interpartículas gerando calor de forma rápida e direta, o que vem a favorecer a ruptura das estruturas recalcitrantes dos lignocelulósicos.

Contudo, ressalta-se que a utilização somente da radiação não apresenta efeito expressivo sobre o lignocelulósico. É necessária a utilização de algum composto polar ou iônico que induza a ruptura do material. Diante disso, os trabalhos da literatura, que estudam o efeitos das microondas no pré-tratamento dos lignocelulósicos, avaliam a combinação da radiação com o uso de compostos alcalinos (NaOH, $Ca(OH)_2$ e Na_2CO_3) e ácidos (H_2SO_4) (Palmarola-Adrados 2005; Zhu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Hu e Wen, 2008 e Keshwani, 2009).

Keshwani (2009), inicialmente estudou o efeito de NaOH, H_2SO_4 e H_2O no pré-tratamento de *switchgrass* (grama). As condições do pré-tratamento foram as seguintes: 250 W de potência, 100 g/L de sólidos a tempo variável. Após a hidrólise enzimática, a adição de H_2SO_4 e H_2O não apresentou nenhum resultado positivo nos rendimentos de açúcares. Já a adição de NaOH proporcionou aumento nos rendimentos em açúcares em relação ao controle, de 151 a 446 mg/g quando pré-tratado na concentração de 2% (m/v) de NaOH por 10 minutos. Em seguida, o autor realizou o estudo com vários álcalis no pré-tratamento de dois lignocelulósicos distintos: *switchgrass* e *coastal bermudagrass* (grama). Dos álcalis avaliados (Na_2CO_3, $Ca(OH)_2$ e NaOH), o NaOH se destacou para ambos os substratos devido a sua elevada polaridade e solubilidade.

Alguns autores (Zhu *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Hu e Wen, 2008 e Keshwani, 2009), testaram o pré-tratamento em microondas combinado com álcali (NaOH) para os seguintes substratos: palha de arroz, palha de trigo, *switchgrass* e *coastal bermudagrass*. Com a finalidade de buscar uma condição ótima de pré-tratamento, que proporcionasse maiores rendimentos em açúcares após a hidrólise enzimática, estes autores (Zhu *et al.*, 2005; Hu e

Wen, 2008; Keshwani, 2009) estudaram uma faixa de parâmetros durante a etapa de pré-tratamento. Esses dados estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros estudados na literatura no pré-tratamento com microondas combinado com hidróxido de sódio.

Lignocelulósico	Potência ou temperatura	Tempo de pré-tratamento	Concentração de NaOH
Palha de arroz[1]	300, 500 e 700 W	15 – 120 minutos	1% (m/v)
Switchgrass[2]	70 – 90°C	5 – 40 minutos	0,05 – 0,3 g álcali/g biomassa
Switchgrass[3]	250 W	5 – 20 minutos	1 – 3% (m/v)
Coastal bermudagrass[3]	250 W	5 – 20 minutos	1 – 3% (m/v)

[1] Zhu *et al.*, 2005
[2] Hu e Wen, 2008
[3] Keshwani, 2009

Para palha de arroz, Zhu *et al.* (2005) conseguiram os melhores resultados em termos de celulose quando as condições do pré-tratamento foram de 700 W de potência durante 30 minutos para 1% (m/v) de NaOH. Os autores Hu e Wen (2008) alcançaram o rendimento de açúcares em torno de 99% do potencial disponível para hidrólise do *switchgrass* nas seguintes condições de pré-tratamento: 190°C por 30 minutos para 0,1 g de NaOH/g de biomassa. Para o mesmo substrato, Keshwani (2009) obteve os maiores rendimentos em açúcares nas condições de 250 W por 10 minutos e 2% (m/v) de NaOH. No caso de *coastal bermudagrass*, a concentração de 1% (m/v) de NaOH e 10 minutos foram suficientes para proporcionar maiores rendimento em açúcares. Diante disso, observa-se que as condições ótimas de pré-tratamento vão variar de acordo com a natureza do substrato e com a combinação dos parâmetros de pré-tratamento anteriormente descritos.

2.4 Produção de etanol do hidrolisado obtido do pré-tratamento e hidrólise enzimática de bagaço de caju

Em trabalhos anteriores com fibra de caju, Rocha *et al.* (2009) avaliaram pré-tratamento de bagaço de caju com ácido sulfúrico diluído, individualmente ou seguido de pré-tratamento com álcali, sendo os resíduos sólidos obtidos nomeados de CAB-H e CAB-OH, respectivamente. No caso de CAB-H, o pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico diluído na concentração de 0,8 $mol.L^{-1}$, 30% (m/v) de sólidos, conduzidos em autoclave a 121°C por 15 minutos. Para CAB-OH, após o pré-tratamento citado, o sólido resultante foi novamente pré-tratado em autoclave com hidróxido de sódio (NaOH), na concentração de 4% (m/v), 30% (m/v) de sólidos, a 121°C por 30 minutos. Na etapa de hidrólise enzimática, CAB-H e CAB-OH foram submetidas às seguintes condições de hidrólise enzimática antes da fermentação: 16% (m/v) de sólidos, 30 $FPU.g_{CAB}^{-1}$, a 45°C por 72 horas.

De acordo com os resultados obtidos por Rocha *et al.,* (2009), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* consumiu toda glicose disponível nos hidrolisados sem suplementação adicional de nutrientes além de produzir etanol em ambos os hidrolisados. Para CAB-H, a concentração inicial de glicose de 17,4 $g.L^{-1}$ resultou em concentração e produtividade de etanol de 8,2 $g.L^{-1}$ e 2,7 $g.L.^{-1}h^{-1}$ após 3 h de fermentação, respectivamente. Quando CAB-OH foi utilizado (concentração de glicose inicial de 52,4 $g.L^{-1}$), a concentração de etanol e produtividade obtidas foram de 20,0 $g.L^{-1}$ e 3,33 $g.L.^{-1}h^{-1}$, respectivamente, em 6 h de fermentação. Ressalta-se que para CAB-OH, realizou-se dois pré-tratamentos com finalidades distintas: o pré-tratamento com ácido diluído para disponibilização das hemiceluloses, e o pré-tratamento com álcali para degradação da lignina.

Os rendimentos em etanol baseado na glicose contida no meio foram de 0,38 $g_{Etanol}.g_{Glicose}^{-1}$ e 0,47 $g_{Etanol}.g_{Glicose}^{-1}$, utilizando os hidrolisados obtidos de CAB-OH e CAB-H, respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Pré-tratamento

3.1.1.2 Matéria-prima

Neste trabalho, avaliou-se o potencial do bagaço de caju como matéria-prima lignocelulósica para produção de etanol do licor obtido da hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas. O bagaço de caju utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Indústria de Processamento de Sucos do Brasil situada no Ceará, Brasil. A matéria-prima doada foi estocada na temperatura de -10°C até seu uso.

3.1.1.3 Microondas

O pré-tratamento da fibra do caju após homogeneização em solução de NaOH, foi realizado em um aparelho de microondas (Figura 5) de uso doméstico, modelo LG – MS/114 ML de 2,45 GHz. O microondas apresenta potência máxima de 1150 W com variação de escala distribuída em 10 níveis. Para regulação da potência desejada, ajustou-se no equipamento a potência de trabalho segundo as potências disponíveis dos níveis existentes.

Figura 5 – Aparelho de microondas utilizado neste trabalho.

3.1.2 Hidrólise Enzimática

3.1.2.1 Enzima

O complexo enzimático utilizado neste estudo foi cordialmente doado pela empresa Novozymes (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), na forma de extrato enzimático comercial denominado Celluclast 1.5L. Este extrato é composto por um coquetel de enzimas, destacando-se celulases e β-glicosidases. Na realização dos experimentos, a atividade enzimática foi baseada na atividade de celulases presente, já que se apresenta em maior quantidade no complexo.

3.1.3 Fermentação

3.1.3.1 Microorganismo

A cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6) utilizada nos ensaios fermentativos foi isolada de uma levedura comercial (Saf-momento - SAF Argentina, Buenos Aires) no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

Figura 6 – *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose.

3.1.3.2 Meios de Cultura

3.1.3.2.1 Meios de manutenção e propagação do inóculo

Para manutenção da levedura *S. cerevisiae*, utilizou-se o meio Ágar Sabouraud Dextrose da empresa Acumedia (Michigan, EUA), contendo em sua composição: Dextrose 40 $g.L^{-1}$, Caseína 5 $g.L^{-1}$, Extrato de tecido animal 5 $g.L^{-1}$ e Ágar 15 $g.L^{-1}$. A cultura foi mantida em estoque a 4°C em placa contendo Ágar Sabouraud Dextrose, com realização de repique a cada 3 meses. Para a obtenção do inóculo do microrganismo, preparou-se meio de cultura com composição descrita na Tabela 3. O pH do inóculo foi ajustado para uma faixa de 4,5 – 5,0 e esterilizado a 110°C por 10 minutos.

Tabela 3 - Composição do meio para propagação de células de *S. cerevisiae*.

Componente	Concentração ($g.L^{-1}$)
Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	30,00
Extrato de Levedura	5,00
Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$)	10,00
Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)	4,50
Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$)	1,00
Sulfato de zinco ($ZnSO_4$)	0,65

3.2 Métodos

3.2.1 Pré-tratamento

3.2.1.1 Preparação da matéria-prima

O bagaço de caju inicialmente foi lavado com água corrente para retirada de impurezas, seco a 50-60°C por 24 horas, triturado, peneirado e estocado até seu uso. Após peneiramento do material, as partículas que ficaram retidas entre as peneiras de Mesh 18-80 foram utilizadas como matéria-prima para a realização dos experimentos.

3.2.1.2 Caracterização da matéria-prima

O bagaço de caju, antes e após o pré-tratamento em microondas, foi caracterizado quanto à sua composição de celulose, hemicelulose e lignina. Empregou-se, na sua quantificação, duas metodologias: uma obtida da organização norte-americana de energias renováveis, NREL (Sluiter *et al.,* 2008), National Renewable Energy Laboratory[2], empregada na quantificação somente de lignina das amostras, e a metodologia de Gouveia *et al*. (2009), validada para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2.1.3 Pré-tratamento com NaOH em microondas

O pré-tratamento do bagaço de caju consistiu na imersão da fibra em solução de NaOH até homogeneização, mantendo a concentração de sólidos de 30 $g.L^{-1}$, procedimento realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, em triplicata. Em seguida, realizou-se a homogeneização do conteúdo com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, o material foi posto no aparelho de microondas, com os frascos Erlenmeyer em posição triangular no interior do equipamento (Figura 7) sendo a potência e o tempo ajustados para os

[2] www.nrel.gov, acessado em 01 de julho de 2009

valores desejados. Após o pré-tratamento, o pH do material foi neutralizado por lavagens com água destilada. Em seguida foi seco a 50°C por 24 horas e estocado até seu uso.

Figura 7 – Posição dos frascos erlenmeyers durante o pré-tratamento da fibra do caju no aparelho de microondas.

3.2.1.4 Determinação do efeito da concentração de NaOH

Para se avaliar o efeito da concentração de NaOH na obtenção de açúcares durante a etapa de hidrólise enzimática, estudaram-se duas concentrações de hidróxido de sódio (0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$) no pré-tratamento da fibra do caju.

3.2.1.5 Determinação do efeito da potência das microondas

Estudaram-se, dois níveis de potência das microondas (600 W e 900 W) durante o pré-tratamento do bagaço de caju. Segundo Zhu *et al.* (2005) e Hu e Wen (2008), trata-se de um variável de relevante importância na geração de calor interpartículas da matéria-prima lignocelulósica.

3.2.1.6 Determinação do efeito do tempo de pré-tratamento

Estudou-se o efeito do tempo de pré-tratamento (15 e 30 minutos) em ambas as potências das microondas avaliadas durante o pré-tratamento da fibra do caju na geração de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática do material pré-tratado.

3.2.2 Hidrólise enzimática

3.2.2.1 Determinação da atividade enzimática no complexo enzimático

A atividade do complexo enzimático Celluclast 1.5L foi expressa em unidades de papel de filtro (FPU) por mL do complexo segundo a metodologia de Ghose (1987). A atividade da Celluclast 1.5L obtida foi de 134,63 FPU/mL de extrato enzimático. Em relação à atividade de β-glicosidases (celobiases), o extrato comercial apresenta atividade em torno de 5,0 $U_{celobiose}$/mL (Adriano, 2008).

3.2.2.2 Hidrólise enzimática do material pré-tratado

A hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado foi realizada com extrato enzimático comercial, Celluclast 1.5L (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark), preparado na forma de solução através da adição de quantidade de enzima suficiente para se obter a atividade desejada em termos de FPU/g de fibra pré-tratada. A solução enzimática foi preparada em tampão citrato na concentração de 50 mM e pH 5,0. Os experimentos foram conduzidos em triplicata em Erlenmeyers de 250 mL contendo a fibra pré-tratada imersa na solução enzimática, ambos na porcentagem de sólidos e atividade previamente determinados. Posteriormente, os frascos foram postos em agitador orbital (Tecnal – TE 422) sob agitação de 150 rpm, a 45°C por 72 horas (ver Figura 8). A cada 24 horas, retirou-se 1,5 mL da mistura reacional para determinação de açúcares.

Após a quantificação dos açúcares na amostra, em $g.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, ou seja gramas de açúcar (glicose, xilose e celobiose) por gramas de CAB-M (bagaço de caju pré-tratado em microondas, em inglês *cashew apple bagasse*). Determinou-se a digestibilidade de celulose

durante a hidrólise segundo a metodologia NREL (Selig *et al*., 2008), descritas nas equações 1 e 2:

$$g_{celulose}consumida = g_{glicose} \cdot g_{CAB-M}^{-1} x g_{CAB-M} inicial x 0{,}9 \quad (1)$$

$$Digestibilidade = \frac{g_{celulose}consumida}{g_{celulose}inicial} x100 \quad (2)$$

Figura 8 - Agitador orbital (Tecnal – TE 422) utilizado para a hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado.

3.2.2.3 Separação do hidrolisado

Depois de decorrida as 72 horas de hidrólise enzimática, realizou-se filtração a vácuo em papel de filtro faixa preta (filtração rápida) para separação dos sólidos e do hidrolisado obtido, sendo este estocado na temperatura de -10°C até seu uso na etapa de fermentação.

3.2.2.4 Estudo do efeito da concentração de sólidos e atividade enzimática

Avaliou-se neste trabalho parâmetros que incrementassem a concentração de açúcares após a etapa de hidrólise enzimática com vistas à fermentação. Segundo Tengborg *et al.* (2001), Zhu *et al.* (2005) e Vásquez *et al.* (2007), os parâmetros que exercem maior influência na hidrólise enzimática são a concentração de sólidos e a atividade enzimática. Diante disso, estudou-se a influência da concentração de sólidos de bagaço de caju pré-tratado nas porcentagens de 2 e 16% m/v, e atividade enzimática do complexo enzimático Celluclast 1.5L por massa de fibra pré-tratada na atividade de 15 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ (equivalente a 135 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ do extrato enzimático) e 30 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ (270 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ do extrato enzimático).

3.2.3 Fermentação do hidrolisado

3.2.3.1 Preparação do meio de cultivo

Depois da obtenção do hidrolisado na etapa de hidrólise enzimática por filtração, realizou-se a centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos, seguida de filtração a vácuo em papel de filtro faixa azul (filtração média) para remoção de partículas suspensas. Posteriormente o líquido obtido foi dividido em frascos erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultivo, sendo o procedimento realizado em duplicata. Em seguida, o pH do hidrolisado foi ajustado para 4,5 - 5,0 e esterilizado a 110°C por 10 minutos em autoclave.

3.2.3.2 Propagação do inóculo

O inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* foi preparado adicionando-se 3 alças da placa contendo o microrganismo em 50 mL de meio para propagação do inóculo, descrito na Tabela 1 no item 2.1.3.2.1. A seguir, realizou-se a incubação a 150 rpm e 30°C por 24 horas, em agitador orbital (Tecnal – TE 420). Posteriormente, centrifugou-se o inóculo a 10.000 rpm por 15 min para se obter a biomassa inicial do ensaio fermentativo.

3.2.3.3 Fermentação

A fermentação do hidrolisado foi conduzida em Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio em um agitador rotativo (Tecnal - TE 420) a 30°C e 150 rpm (Figura 9). A concentração inicial de microrganismo inoculado no meio de cultura foi 13 $g.L^{-1}$. O hidrolisado do pré-tratamento foi utilizado como meio de cultivo sem suplementação adicional de fonte de nutrientes. Amostras do meio de cultivo (1,0 mL) foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise.

Figura 9 - Agitador orbital (Tecnal – TE 420) utilizado para fermentação do hidrolisado obtido após pré-tratamento alcalino da fibra de caju em microondas.

3.3 Métodos Analíticos

3.3.1 pH do meio de cultivo

O pH do hidrolisado utilizado como meio de cultivo sem suplementação adicional de nutrientes foi determinado através do potenciômetro do fabricante Tecnal, modelo Tec-3MP, na temperatura ambiente de 27°C.

3.3.2 Concentração de biomassa

A concentração celular foi determinada através da análise da massa seca, segundo a metodologia proposta por Atala (Atala *et al.*, 2001). Amostras do meio de cultura (1,0 mL) foram coletadas e centrifugadas a 6.000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para análise de carboidratos. O precipitado foi lavado com 0,5 mL de água destilada para remoção de excedente de meio de cultura, novamente centrifugado (6.000 rpm/15minutos) e seco a 50°C em estufa até peso constante.

3.3.3 Determinação da concentração de açúcares e etanol

A concentração de carboidratos (celobiose, glicose e xilose) e etanol foram medidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, em inglês HPLC), utilizando um sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração (Modelo 2414) e com uma coluna Aminex HPX 87H (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Solução de H_2SO_4 a 5 $mmoL.L^{-1}$ em Água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA) foi utilizado como fase móvel na taxa de 0,5 $mL.min^{-1}$ a 65°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 μL.

A conversão de açúcares neste trabalho foi definida em termos de mg de carboidrato por g de bagaço de caju pré-tratado em microondas (*cashew apple bagasse* – CAB-M), o que corresponde a $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$.

3.3.4 Parâmetros cinéticos estudados no processo fermentativo

Os parâmetros cinéticos estudados durante o processo fermentativo foram a produtividade (Q_p), eficiência (η) e conversão substrato/produto (Yp/s). Esses parâmetros foram calculados pelas equações 3, 4 e 5, respectivamente.

$$Qp = \frac{Pf}{t} \quad (3)$$

Onde Q_p ($g.L^{-1}.h^{-1}$) é a produtividade, Pf é a concentração de etanol ($g.L^{-1}$) no final da fermentação e t (h) é o tempo de fermentação.

$$\eta = \frac{Pf}{(Si - Sf)x0,5111} x100 \quad (4)$$

Sendo η (%) a eficiência, Si a concentração inicial dos substratos, glicose e frutose ($g.L^{-1}$), Sf a concentração final ($g.L^{-1}$). O fator 0,5111 deve ser multiplicado ao denominador devido a estequiometria da equação, em que a produção anaeróbica máxima possível que pode ser gerada a partir de uma grama de açúcares é 0,5111g de etanol (Hashizume e Aquarone, 2005).

$$Yp/s = \frac{Pf}{(Si - Sf)} \quad (5)$$

Onde Yp/s é o fator de conversão de substrato em produto, valor adimensional, Pf é a concentração de etanol ($g.L^{-1}$) no final da fermentação, Si e Sf são as concentrações inicial e final de glicose, respectivamente.

3.4 Análise estatística dos dados

Realizou-se estudo estatístico dos dados por ANOVA dos rendimentos de açúcares (glicose, xilose e celobiose) obtidos após hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado por microondas. A análise dos dados foi realizada no programa Microcal Origin, versão 6.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização do bagaço de caju

A fim de acompanhar a evolução do pré-tratamento da fibra do caju, determinaram-se os teores de celulose, hemicelulose e lignina na fibra, segundo Gouveia *et al*. (2009). Na quantificação de lignina, empregou-se também outra metodologia, esta proveniente da organização norte-americana de energias renováveis, NREL (National Renewable Energy Laboratory). Para o bagaço de caju isento de pré-tratamento (*in natura*), de acordo com a metodologia de Gouveia (Gouveia *et al*., 2009), as porcentagens de celulose, hemicelulose e lignina foram, respectivamente, 19,21% ± 0,35, 12,05% ± 0,37 e 33,80% ± 1,30 (m/m) (Tabela 4). Segundo a metodologia do instituto NREL, a fibra do caju *in natura* apresentou teores de glicanas (celobiose e glicose) e lignina de 20,54% ± 0,70 e 32,49% (m/m), respectivamente. Não foi possível a quantificação de xilanas (xilose, arabinose, galactose e manose) por esta metodologia. Outros autores (Ferreira *et al*., 2004), quantificaram celulose, hemicelulose e lignina do bagaço de caju, obtendo-se os seguintes resultados, 24,3%, 18,5%, 22,5%, respectivamente. Observa-se que os valores da literatura são maiores em relação à celulose e hemicelulose, enquanto que em relação à lignina, os valores obtidos neste trabalho são superiores ao da literatura.

De acordo com os resultados, observa-se que para ambas as metodologias estudadas, o bagaço de caju apresenta teores similares de celulose, entretanto a porcentagem de lignina segundo a metodologia NREL foi menor. Ressalta-se que, segundo os protocolos do NREL, glicanas são constituídas somente de celobiose e glicose. Este resultado não difere consideravelmente da composição de celulose de Gouveia (2009), formado pela soma dos teores de glicose, celobiose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural. Na caracterização do bagaço de caju *in natura*, segundo esta metodologia, a maior contribuição para celulose deveu-se a glicose, pois a contribuição para celobiose foi nula, e inferior a 1,0% (m/m) para ácido fórmico e hidroximetilfurfural.

Neste trabalho, realizou-se o estudo de variáveis que pudessem influenciar a composição do bagaço de caju após o pré-tratamento alcalino em microondas. Entre elas, avaliou-se a influência da concentração de hidróxido de sódio (0,2 e 1,0 mol.L^{-1}) na composição da fibra. Na Tabela 4, estão os resultados para caracterização utilizando a metodologia de Gouveia (2009).

Tabela 4 - Caracterização do bagaço de caju após pré-tratamento alcalino em microondas. Após 15 minutos de exposição e 600 W de potência.

Concentração de NaOH (mol.L^{-1})	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
BC *in natura*	19,21% ± 0,35	12,05% ± 0,37	38,11% ± 0,08
0,0	19,34% ± 1,44	11,74% ± 0,94	39,83% ± 1,15
0,2	20,29% ± 0,62	13,98% ± 0,40	44,61% ± 0,12
1,0	22,07% ± 1,03	14,36% ± 0,44	32,38% ± 1,86

Observa-se na Tabela 4 que os valores de celulose e hemicelulose aumentaram em relação ao controle (bagaço de caju isento de NaOH). Entretanto, os resultados para lignina não seguiram esse comportamento. Observou-se uma redução da porcentagem de lignina somente ao se utilizar a concentração de 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, equivalente a 15%. No controle (0,0 mol.L^{-1}), observa-se um pequeno aumento na porcentagem de lignina, porém para a concentração de 0,2 mol.L^{-1} esse aumento é expressivo. Esse acréscimo na lignina pode estar relacionado à característica do bagaço, que depois de tratado apresenta uma textura mais consistente, que dificulta a hidrólise ácida durante a caracterização (ver Figura 10).

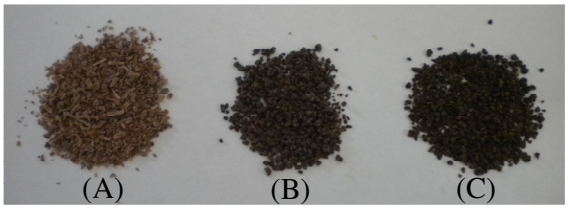


Figura 10 – Bagaço de caju *in natura* (A), tratado com 0,2 mol.L^{-1} (B) e 1,0 mol.L^{-1} (C) de NaOH em microondas a 600 W de potência durante 15 minutos.

Observa-se na Tabela 5 que, para todas as condições estudadas, não houve uma variação significativa de lignina segundo a metodologia do instituto NREL, o que não acontece com outros trabalhos da literatura (Hu e Wen 2008; Keshwani, 2009), ao estudarem o pré-tratamento alcalino (NaOH) em microondas. Nesses trabalhos, o aumento da concentração de NaOH reduziu as porcentagens de lignina dos lignocelulósicos estudados.

Tabela 5 – Determinação de lignina do bagaço de caju após pré-tratamento alcalino em microondas. Após 15 minutos de exposição e 600 W de potência.

Concentração (mol.L^{-1})	Lignina (%)
BC *in natura*	33,80% ± 1,30
0,0	35,44% ± 1,26
0,2	37,21% ± 1,99
1,0	32,11% ± 1,39

4.2 Pré-tratamento do bagaço de caju

Diante da diversidade de pré-tratamentos disponíveis na literatura (Saha, 2003; Um *et al.*, 2003; Yu e Zhang, 2004; Saha *et al.*, 2005; Saha e Cotta, 2006; Rocha *et al.*, 2009), o pré-tratamento em microondas merece destaque devido à sua elevada eficiência na geração de calor, provocando a ruptura das estruturas recalcitrantes da parede celular dos vegetais. Outros autores (Hu e Wen, 2008) identificaram a presença de oligossacarídeos na fração líquida extraída do pré-tratamento e obtiveram rendimentos que não excederam a 1,8% em massa em relação ao substrato (grama). Neste trabalho, como não foi possível a separação do hidrolisado por filtração após o pré-tratamento, uma alíquota obtida da primeira lavagem para ajuste do pH foi injetada no HPLC, não se identificando concentração apreciável de açúcares (concentração < 0,001%).

Além disso, outros autores (Kaar e Holtzapple, 2000), ao estudarem pré-tratamento de palha de milho, observaram que os rendimentos em açúcares da hidrólise enzimática foram independentes dos teores de sólidos usados durante o pré-tratamento para uma faixa de 60 – 200 g.L^{-1}. Entretanto, Hu e Wen (2008) estudaram uma faixa similar de

concentração de sólidos, sendo os maiores níveis de glicose obtidos a baixas concentrações de sólidos (50 - 200 $g.L^{-1}$). Neste trabalho, a concentração de sólidos no pré-tratamento foi mantida constante em 300 $g.L^{-1}$. No trabalho de De la Hoz *et al.* (2005), os autores destacaram que, para amostras com baixos teores de sólidos, uma elevada proporção de água favorece a absorção da energia proveniente da irradiação das microondas, uma vez que a absorção é devida à oscilação das moléculas de água que por sua vez transfere essa energia ao lignocelulósico em contato, promovendo a ruptura de suas estruturas recalcitrantes.

Neste estudo, utilizou-se a notação CAB-M atribuída ao resíduo sólido obtido após o pré-tratamento alcalino em microondas. A seguir, são descritos os resultados obtidos para cada etapa avaliada durante o pré-tratamento.

4.2.1 Efeito da concentração de álcali

Recentemente, alguns trabalhos estão em desenvolvimento buscando a avaliação do pré-tratamento em microondas combinado com álcali, motivados pela capacidade da radiação romper as estruturas mais recalcitrantes da matéria lignocelulósica, além da solubilização da lignina e degradação parcial das hemiceluloses (Zhu *et al.*, 2005, 2006; Hu e Wen, 2008). Com isso, duas concentrações de hidróxido de sódio (NaOH) foram testadas para a avaliação do potencial do uso de microondas no pré-tratamento da fibra do caju seguido de sua hidrólise enzimática. As Figuras 11 e 12 apresentam os resultados após a hidrólise enzimática, rendimentos de glicose e celobiose, respectivamente. Vale ressaltar que as condições da hidrólise enzimática estudadas nesse trabalho, temperatura de 45°C e pH igual a 5,0, são citadas por outros autores como as melhores condições de atividade enzimática para Celluclast 1.5L (Saha *et al.*, 2005; Vásquez *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2009).

Na Figura 11, observa-se que em ambas as concentrações estudadas (0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$) os resultados para glicose foram superiores ao controle, ou seja, bagaço de caju pré-tratado com adição somente de água destilada. A partir desses dados, realizou-se estudo estatístico por ANOVA no programa Microcal Origin, versão 6.0. De acordo com os resultados, para um nível de significância de 99%, a adição de NaOH (0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$) melhorou os rendimentos de glicose durante o processo de hidrólise enzimática. Em relação à variação da concentração de NaOH, houve significância somente em 24 horas de hidrólise.

No trabalho de Rocha *et al.* (2009), os autores realizaram pré-tratamento da fibra do caju com ácido sulfúrico diluído, obtendo um material denominado CAB-H. Neste trabalho, os autores obtiveram, após hidrólise enzimática nas mesmas condições aqui estudadas (concentração de substrato, temperatura e pH), rendimentos de glicose de 44 $mg.g_{CAB\text{-}H}^{-1}$, valor inferior aos resultados obtidos neste trabalho; 76,4 e 72,9 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, respectivamente, utilizando 0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$ de NaOH, o que eleva o potencial do microondas no pré-tratamento de lignocelulósicos.

No trabalho de Hu e Wen (2008), os autores destacaram, durante a hidrólise enzimática (12 FPU/g de substrato) do lignocelulósico *switchgrass* (grama) pré-tratado em microondas (190°C por 30 minutos), um aumento na concentração de glicose com o acréscimo da concentração de NaOH de 0 a 0,1 $g.g^{-1}$ de biomassa (equivalente a 0,2 $mol.L^{-1}$ de NaOH). A partir deste valor, o acréscimo na concentração do álcali de 0,2 e 0,3 $g.g^{-1}$, equivalente a 0,4 e 0,6 $mol.L^{-1}$, não influenciou no rendimento de glicose. Entretanto, os autores acompanharam um decréscimo nos níveis de xilose, associando-o a uma queda na degradação da hemicelulose à medida que se aumentava a concentração de álcali.

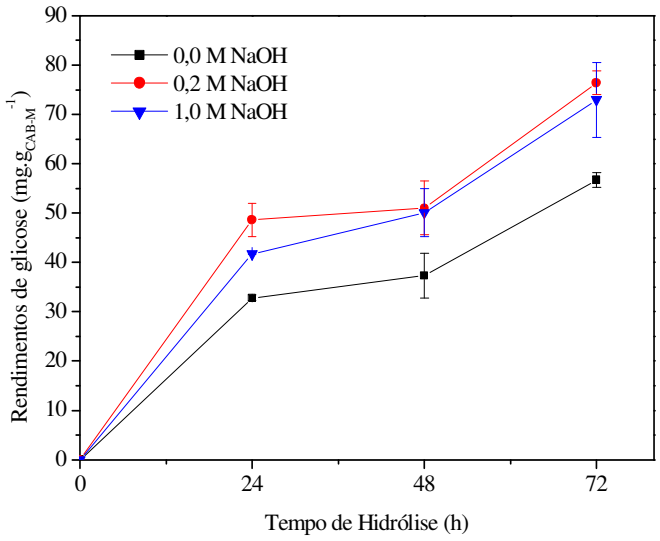


Figura 11 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

Em contrapartida, outro autor (Keshwani, 2009) avaliou a hidrólise enzimática de *switchgrass* pré-tratado a 250 W por 15 minutos nas seguintes condições de concentração de álcali: 0,25; 0,50 e 0,75 $mol.L^{-1}$. Nos resultados, a concentração de 0,5 $mol.L^{-1}$ NaOH proporcionou os melhores rendimentos em glicose (245 $mg.g_{switchgrass}^{-1}$). O autor ressaltou que a atividade de celulase (40 FPU/g) e celobiase (70 CBU/g) usadas foram suficientes para minimizar possíveis inibições enzimáticas.

Na Figura 12, são apresentados os resultados dos rendimentos de celobiose presente no hidrolisado durante o processo enzimático. Observa-se que, ao final da hidrólise, os rendimentos de celobiose aumentam com o aumento da concentração de NaOH, sendo máximo para 1,0 $mol.L^{-1}$ (38,4 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$). Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, a adição de NaOH (0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$) foi significativa para os rendimentos de celobiose a partir de 48 horas de hidrólise enzimática. Em relação à variação da concentração do álcali, houve significância somente em 72 horas de hidrólise.

Celobiose é um produto da ruptura da cadeia de celulose assim como glicose, entretanto sua presença no hidrolisado pode acarretar na inibição enzimática da celulase (Tengborg *et al.*, 2001). Com isso, acredita-se que o acréscimo dos níveis de celobiose no decorrer da hidrólise tenha influenciado nos teores de glicose obtidos. A conversão de celobiose em glicose é realizada na presença de β-glicosidase, enzima presente no complexo enzimático Celluclast 1.5L. Contudo, a presença de quantidades suficientes de β–glicosidase, e, consequentemente de elevadas quantidades do complexo enzimático, são necessárias para obtenção de elevados rendimentos de glicose das lignoceluloses (Tengborg *et al.*, 2001; Lynd *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2009). Ressalta-se que, segundo Adriano (2008), a atividade de β–glicosidase presente no complexo Celluclast 1.5L é muito baixa (5,0 $U_{celobiose}$/mL), o que não deixa de ser uma limitação do extrato comercial.

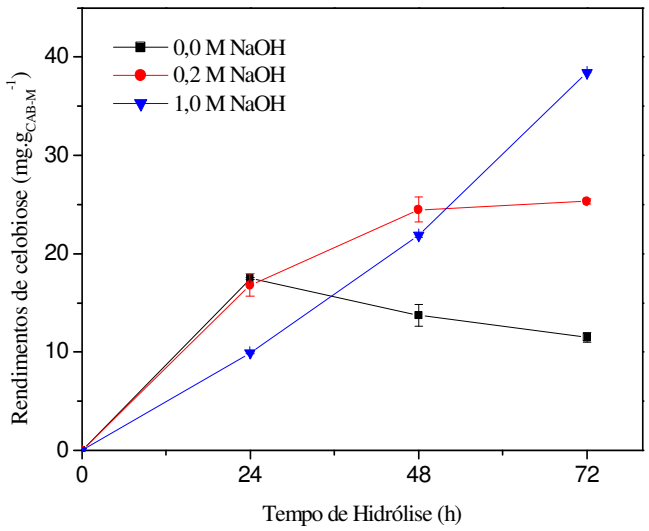


Figura 12 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de celobiose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

A Figura 13 apresenta os resultados dos rendimentos de xilose no hidrolisado durante a hidrólise enzimática de CAB-M. Observa-se que os valores de xilose são crescentes no decorrer do processo para todas as concentrações de NaOH estudadas. O aumento da concentração de NaOH proporcionou um aumento nos rendimentos de xilose, destacando-se a concentração de 1,0 mol.L^{-1}, que ao final de 72 h, resultou em 18,7 mg.g$_{CAB-M}^{-1}$ do açúcar. Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, a adição de NaOH (0,2 e 1,0 mol.L^{-1}) foi significativa para os rendimentos de xilose a partir de 48 horas de hidrólise enzimática. Em relação à variação da concentração do álcali, houve significância durante todo o processo.

Acredita-se que os valores de xilose obtidos sejam atribuídos aos baixos teores de xilanase presente no complexo enzimático utilizado, Celluclast 1.5L, que apresenta em sua composição majoritariamente celulases e pouco teor de β–glicosidases.

Em outros trabalhos da literatura (Hu e Wen, 2008; Keshwani, 2009), os autores estudaram o efeito do pré-tratamento alcalino em microondas na formação de xilose durante a hidrólise enzimática de dois tipos de grama nativa, *switchgrass* (Hu e Wen 2008), *switchgrass* e *coastal bermudagrass* (Keshwani, 2009). Em relação ao substrato *switchgrass*, em ambos os trabalhos os níveis de xilose foram decrescentes com o aumento da concentração de NaOH,

de 0,20 a 0,60 mol.L^{-1} em Hu e Wen (2008) e 0,20 a 0,75 mol.L^{-1} em Keshwani (2009). Ressalta-se que no primeiro trabalho o pré-tratamento foi conduzido a 190°C por 30 minutos, e no segundo a 250 W por 15 minutos. Os autores acreditam que o aumento na concentração do álcali tenha inibido a degradação da xilose, embora a estrutura da hemicelulose a torne mais susceptível ao pré-tratamento e mais acessível ao ataque das enzimas hidrolíticas. Resultados similares para *switchgrass* foram obtidos para *coastal bermudagrass* no trabalho de Keshwani (2009) nas mesmas condições de pré-tratamento anteriormente citadas.

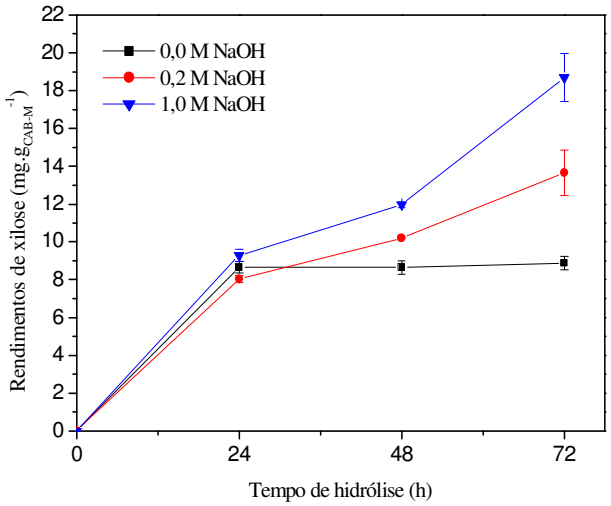


Figura 13 - Influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de xilose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

Na Tabela 6, são mostrados os resultados para digestibilidade do bagaço do caju em função da concentração de NaOH após 72 h de hidrólise enzimática. Como esperado, observou-se que a digestibilidade para a fibra pré-tratada apresentou melhores resultados após adição de NaOH em relação ao controle, ou seja, bagaço de caju pré-tratado em microondas somente com água destilada (isenta de NaOH). De acordo com os resultados, não houve diferença para a digestibilidade para as concentrações de 0,2 mol.L^{-1} e 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, o que pode ser justificado pela presença de celobiose que foi superior na condição de 1,0 mol.L^{-1}, 38,4 mg.g$_{CAB-M}^{-1}$ em relação a 25 mg.g$_{CAB-M}^{-1}$, obtida em 0,2 mol.L^{-1} de NaOH. Segundo Adriano (2008), celobiose é um inibidor da exocelulase, responsável pela remoção de celobiose das extremidades das cadeias de celulose. Assim, baixas quantidades de β-

glicosidase conduzirão a baixas conversões de celobiose em glicose, o que acontece ao se utilizar o complexo enzimático Celluclast 1.5L. Ao final da hidrólise, os valores para 0,2 e 1,0 mol.L^{-1} apresentaram valores de 33,89% ± 1,06 e 29,75% ± 3,10, respectivamente.

Tabela 6 - Digestibilidade após 72 h de hidrólise enzimática para fibra pré-tratada após variação da concentração de NaOH (600 W por 15 minutos).

Concentração de NaOH (mol.L^{-1})	**Digestibilidade em 72h (%)**
0,0 M	26,39% ± 0,67
0,2 M	33,89% ± 1,06
1,0 M	29,75% ± 3,10

A Figura 14 mostra os resultados da evolução da digestibilidade do bagaço de caju com o tempo de hidrólise enzimática para as concentrações de 0,2 e 1,0 mol.L^{-1}, além do controle. Observa-se que os níveis de digestibilidade são crescentes com o tempo, indicando dificuldades no acesso da enzima ao substrato. O aumento na digestibilidade em 0,2 e 1,0 mol.L^{-1} comparando os valores de 24 e 72 horas foram de 36,4 e 42,8%, respectivamente. Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, a adição de NaOH (0,2 e 1,0 mol.L^{-1}) foi significativa para a digestibilidade ao final da hidrólise somente para a concentração de 0,2 mol.L^{-1}. Em relação à variação da concentração do álcali, isso não ocorreu no final do processo.

Não se localizou na literatura resultados de digestibilidade que envolvessem pré-tratamento com álcali em microondas. Porém, outros autores (Um *et al.*, 2003) estudaram o potencial do pré-tratamento com ácido diluído (H_2SO_4 e H_3PO_4) na hidrólise enzimática de palha de milho. Nesse trabalho, assim como neste estudo, o perfil de digestibilidade foi crescente com o tempo de hidrólise enzimática para ambos os ácidos utilizados, destacando-se o ácido sulfúrico que se mostrou mais eficiente no pré-tratamento que o ácido fosfórico. Os autores obtiveram valores máximos de digestibilidade de 75,6% quando pré-tratado com 2,0% (m/v) de H_2SO_4, e 56% após pré-tratamento com 2,0% (m/v) de H_3PO_4.

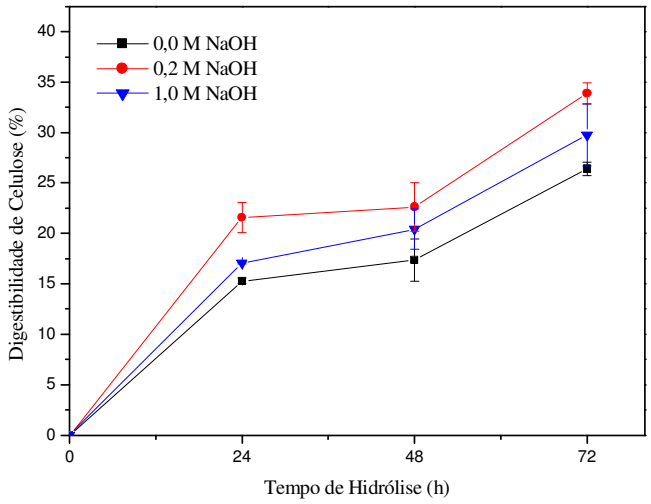


Figura 14 - Digestibilidade de celulose após a influência da variação da concentração de NaOH na obtenção de glicose durante a hidrólise enzimática da fibra pré-tratada em microondas a 600 W durante 15 minutos.

4.2.2 Efeito da variação da potência do microondas

Investigou-se o efeito do aumento da potência de microondas na concentração de glicose após a hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH por 15 minutos, e os resultados encontram-se na Figura 15. Observa-se que o aumento da potência exerceu influência negativa nos valores de açúcares obtidos na etapa da hidrólise enzimática. Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, o aumento da potência não foi significativo para os rendimentos de glicose a partir de 48 horas de hidrólise enzimática.

Nos resultados de Zhu *et al.* (2005), a variação da potência de 300 – 700 W, em microondas com as mesmas características do utilizado neste estudo, não influenciou nos níveis de celulose do lignocelulósico utilizado (palha de arroz) para tempo de pré-tratamento de 15 minutos. Entretanto, o acréscimo no tempo para 30 minutos resultou no aumento da porcentagem de celulose do substrato. Diante disso, avaliou-se posteriormente o tempo de pré-tratamento do bagaço de caju em microondas.

No mesmo trabalho, os autores destacaram a perda de massa atribuída à utilização da radiação, no qual o uso de microondas gera certas reações de natureza ainda desconhecida,

além da solubilização de certos componentes (celulose e lignina) resultado da utilização de NaOH.

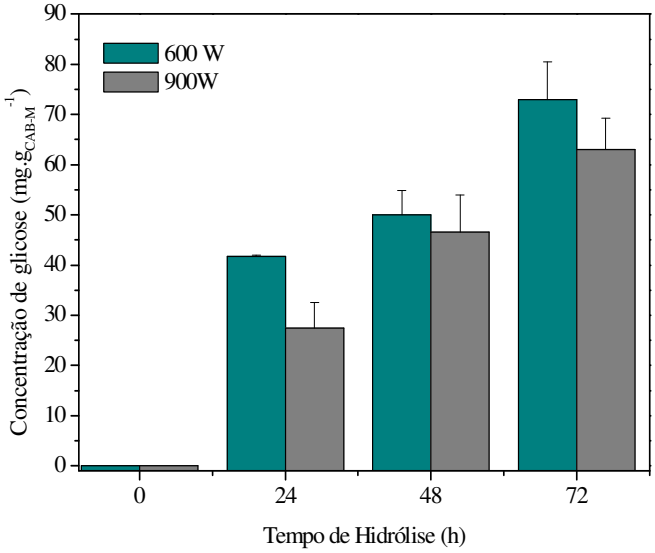


Figura 15 - Influência da variação da potência do aparelho de microondas na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, após 15 minutos de pré-tratamento.

Alguns autores (Hu e Wen, 2008) acompanharam, em seus trabalhos, a temperatura de pré-tratamento em microondas ao invés da potência. O controle de temperatura era realizado por adaptação de um conjunto formado por termopar, sensor e receptor de sinal no aparelho de microondas, o que não permitiu o estudo da influência da temperatura nesse estudo.

4.2.3 Efeito da variação no tempo de pré-tratamento

Os efeitos do tempo de pré-tratamento (15 e 30 minutos) foram investigados mantendo a concentração de NaOH em 1,0 mol.L^{-1} e 600 W de potência. Como mostra a Figura 16, o aumento do tempo de pré-tratamento em microondas da fibra do caju não exerceu influência nos teores de glicose obtidos após hidrolise enzimática do material.

Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, o aumento do tempo de pré-tratamento a 600 W de potência não foi significativo para os rendimentos de glicose a partir de 48 horas de hidrólise enzimática.

Resultados semelhantes foram obtidos por Hu e Wen (2008), no qual os autores avaliaram tempos de pré-tratamento entre 5 e 40 minutos na temperatura de 190°C. Estes observaram que o acréscimo no tempo de pré-tratamento do lignocelulósico não influenciou nos rendimentos de glicose final, exceto para xilose, em que os níveis foram decrescentes após 40 minutos de pré-tratamento. Por outro lado, Zhu *et al.* (2005), avaliaram diferentes condições de pré-tratamento para palha de arroz, sendo a composição da celulose influenciada pelos tempos de pré-tratamento estudados (30 e 42 minutos) em todas as potências estudadas (300, 500 e 700 W).

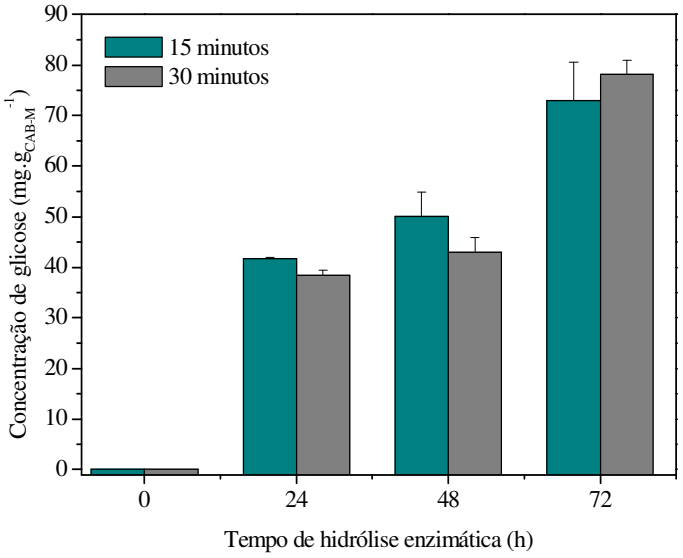


Figura 16 - Influência da variação do tempo de pré-tratamento na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, realizado em microondas a 600 W de potência.

A Figura 17 apresenta os resultados para rendimentos de glicose após a variação do tempo de pré-tratamento para potência de 900 W. Observa-se no gráfico que o aumento no tempo de pré-tratamento de 30 minutos influenciou negativamente a formação de glicose durante a hidrólise enzimática. Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, o aumento do tempo de pré-tratamento a

900 W de potência foi significativo, reduzindo os rendimentos de glicose a partir de 48 horas de hidrólise enzimática. Portanto, o aumento no tempo de pré-tratamento para ambas as potências estudadas não influenciou positivamente nos rendimentos finais de glicose.

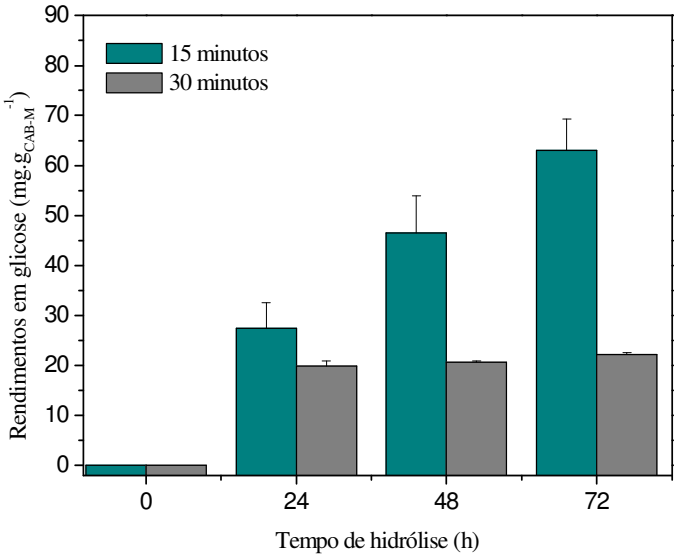


Figura 17 - Influência da variação do tempo de pré-tratamento na obtenção de glicose após hidrólise enzimática da fibra pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH, realizado em microondas a 900 W de potência.

No caso dos substratos *switchgrass* e *coastal bermudagrass* estudados por Keshwani (2009), o autor estudou tempos de pré-tratamento de 5 a 20 minutos, observando influência negativa para tempos superiores a 15 minutos. Neste caso, para ambos os substratos, o tempo de pré-tratamento que proporcionou melhores resultados foi de 10 minutos, embora as concentrações do álcali tenham sido distintas, 0,25 M para *coastal bermudagrass* e 0,50 M para *switchgrass.*

Em relação ao tempo de hidrólise enzimática, observa-se nas Figuras 11 a 17 que o tempo é uma variável relevante na formação de glicose, pois houve um aumento nos rendimentos de glicose ao final do processo à medida que se aumentou o tempo de hidrólise. Resultados similares foram obtidos por outros autores (Rocha *et al.,* 2009; Zhu *et al.,* 2005), que também observaram um aumento no rendimento ao se aumentar o tempo, sendo a maior concentração de açúcares alcançada após 72 horas de hidrólise.

4.3 Hidrólise enzimática do bagaço de caju pré-tratado em microondas: Efeito da concentração de sólidos e atividade enzimática

A Figura 18 mostra os resultados do efeito do aumento da porcentagem de sólidos (2 e 16% m/v) nos rendimentos em açúcares após hidrólise enzimática de CAB-M, utilizando 15 FPU.g_{CAB-M}^{-1}. Observa-se a conversão foi 1,3 vezes maior quando se utilizaram 2 % (m/v) de CAB-M em comparação a 16% (m/v). As maiores conversões foram, respectivamente, 73 ± 8 mg.g_{CAB-M}^{-1} e 54 ± 8 mg.g_{CAB-M}^{-1}. No entanto, em termos de concentração de glicose, os resultados foram de 8,8 g.L^{-1} para 16% (m/v) e 1,5 g.L^{-1} para 2% (m/v). Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, o aumento da concentração de sólidos foi significativo para os rendimentos de glicose durante o processo, exceto em 72 horas de hidrólise enzimática.

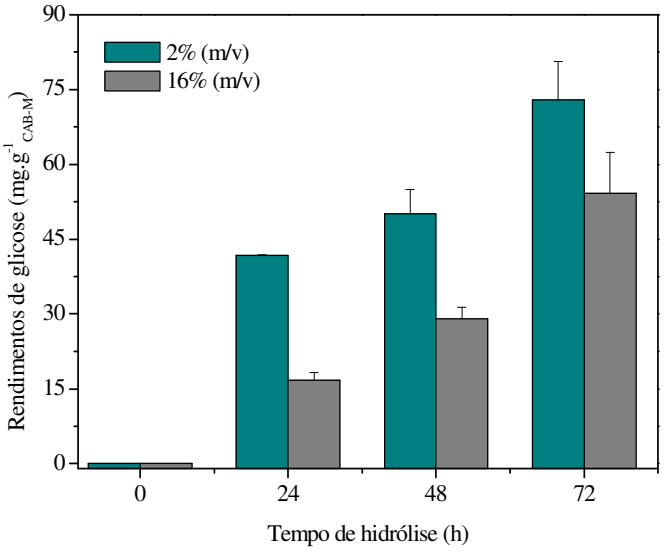


Figura 18 – Rendimentos de glicose após hidrólise enzimática (15 FPU.g_{CAB-M}^{-1}) de CAB-M (2 e 16% m/v) pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W por 15 minutos.

Nos estudos de Tengborg *et al.* (2001), os autores observaram um acréscimo na conversão de celulose ao trabalharem com baixas concentrações de substrato (2 - 5% m/v) para um tipo de biomassa nativa (*spruce*) pré-tratada com dióxido de enxofre (SO_2). No entanto, o aumento na porcentagem de sólido para 10% m/v resultou nos mesmos níveis de

conversão de celulose, mas a concentração de glicose dobrou de valor. Vásquez *et al.* (2007) avaliaram a interação de alguns fatores como temperatura, carga enzimática e porcentagem de sólidos na conversão em glicose de bagaço de cana. Em geral, a influência negativa exercida pelo aumento na porcentagem de sólidos nos rendimento de glicose é atribuída à inibição enzimática resultante do aumento na concentração de glicose. Contudo, com vistas à fermentação do hidrolisado para produção de etanol, faz-se necessário a obtenção de um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, o que é alcançado ao se trabalhar com elevadas concentrações de substrato na etapa de hidrólise enzimática. Portanto, alguns trabalhos na literatura (Tengborg *et al.*, 2001; Zhu *et al.,* 2005; Vásquez *et al.,* 2007; Rocha *et al.,* 2009) têm avaliado certos fatores, no decorrer da hidrólise enzimática, que exercem influência nos rendimentos em açúcares ao se utilizar elevadas concentrações de substrato. Os autores destacaram os seguintes: decréscimo na reatividade do substrato durante hidrólise, inibição enzimática pela presença de celobiose, interferência da lignina na formação do complexo enzima-substrato e inibição pelo produto devido ao acréscimo na concentração de glicose.

Tengborg *et al.* (2001) destacaram que celobiose é formada pela ruptura da cadeia de celulose. Sua conversão em glicose é realizada pela enzima β–glicosidase, presente no complexo Celluclast 1.5L. Com isso, quantidades suficientes do complexo enzimático são de grande importância para o acréscimo nos rendimentos de glicose visando sua conversão em etanol. Diante disso, com o objetivo de realizar a fermentação do hidrolisado para produção etanol, estudou-se a influência do aumento da atividade enzimática, para 30 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, na concentração final de glicose.

A Figura 19 apresenta os dados resultantes do aumento da atividade na hidrólise enzimática de CAB-M a 16% (m/v). A maior concentração de glicose (15 $g.L^{-1}$ ou 98 ± 8 $mg.g^{-1}_{CAB\text{-}M}$) foi obtida após 72 h de hidrólise utilizando 30 $FPU.g^{-1}_{CAB\text{-}M}$. Quando se avaliou 15 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, mantendo-se fixa a porcentagem de sólidos, a conversão em glicose foi 1,8 vezes menor. Segundo o estudo estatístico por ANOVA (Microcal Origin, versão 6.0), para um nível de significância de 99%, o aumento da atividade enzimática foi significativo para os rendimentos de glicose em todo o processo de hidrólise enzimática.

Em relação aos rendimentos de celobiose, após 72 h de hidrólise enzimática os resultado foram de 21 e 27 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ para atividade de 15 e 30 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, respectivamente. Resultados similares foram obtidos por Rocha *et al.* (2009), após pré-tratamento de bagaço de caju com ácido sulfúrico diluído. Os autores obtiveram 19 $g.L^{-1}$ de

glicose para as mesmas condições de concentração de sólidos e atividade enzimática (16% m/v e 30 FPU.g_{CAB-H}^{-1}).

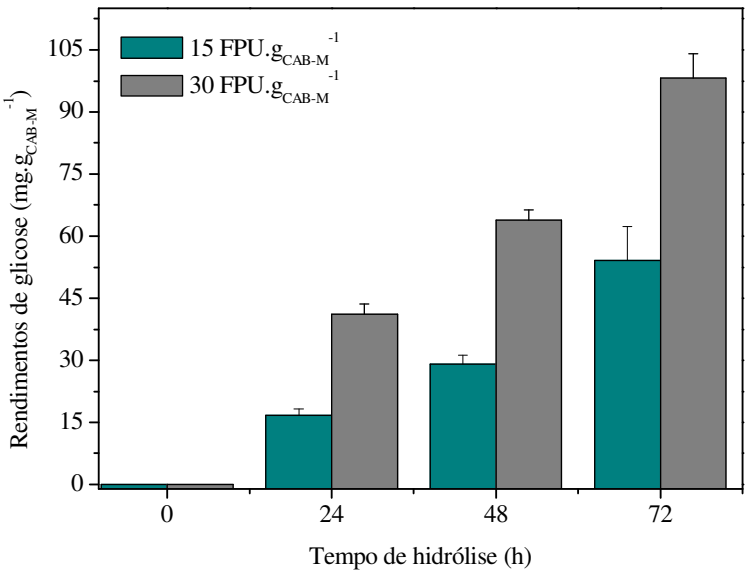


Figura 19 – Rendimentos de glicose após hidrólise enzimática (15 e 30 FPU.g_{CAB-M}^{-1}) de CAB-M (16% m/v) pré-tratada com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W por 15 minutos.

No trabalho de Rocha *et al.* (2009), os autores estudaram parâmetros de hidrólise enzimática similares aos conduzidos neste trabalho, 2 e 16% m/v de concentração de sólidos e atividade enzimática de 15 e 30 FPU.g_{CAB-H}^{-1}, com o objetivo de aumentar os teores de açúcares para posterior fermentação. A sacarificação enzimática do substrato resultante (CAB-H) a 2% (m/v) e 15 FPU.g_{CAB-H}^{-1} foi realizada em diferentes temperaturas (30, 37 e 45°C), sendo os melhores resultados obtidos na temperatura de 45°C, resultando em rendimento de glicose de 44 ± 2 mg.g_{CAB-H}^{-1}, após 72 horas de hidrólise. A 45 ºC, a hidrólise enzimática de CAB-M resultou em 73 ± 8 mg.g_{CAB-M}^{-1}, ou seja, 1,7 vezes maior do que o rendimento de Rocha *et al.,* 2009. Estes autores (Rocha *et al.*, 2009) observaram ainda que o aumento na atividade enzimática de 15 para 30 FPU.g_{CAB-H}^{-1}, para uma concentração de sólidos de 16% (m/v), aumentou a concentração de glicose para 122,2 ± 0,5 mg.g_{CAB-H}^{-1} (ou 19,55 ± 0,08 g.L^{-1}). Neste trabalho, entretanto, a maior concentração de glicose nas mesmas condições foi de 98 ± 8 mg.g_{CAB-M}^{-1} (ou 15 g.L^{-1}), após 72 h de hidrólise.

4.4 Fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* do hidrolisado obtido após pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de caju

Avaliou-se a capacidade da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* em produzir etanol a partir do hidrolisado de bagaço de caju pré-tratado por microondas. As condições de pré-tratamento foram fixadas em 1,0 $mol.L^{-1}$ de hidróxido de sódio, 600 W de potência por 15 minutos. Esta condição foi selecionada de acordo com os resultados de celulose, em que a concentração de 1,0 $mol.L^{-1}$ se destacou com maior teor de celulose. A hidrólise enzimática do sólido resultante do pré-tratamento com microondas foi conduzida utilizando 16% (m/v) de sólidos e 30 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ do complexo enzimático Celluclast 1.5L a 45°C por 72 horas.

A fermentação foi conduzida usando 13 $g.L^{-1}$ de biomassa inicial, sendo os perfis de glicose, etanol, biomassa, glicerol e xilose mostrados na Figura 20. Observa-se que *Saccharomyces cerevisiae* cresceu e também produziu etanol no hidrolisado obtido de CAB-M sem adição de nutrientes com o consumo de toda glicose presente. Identificou-se a presença de xilose durante a fermentação que se manteve constante em torno de 2 $g.L^{-1}$. Houve formação de glicerol, sendo a máxima concentração (1,5 $g.L^{-1}$), obtida após 4 horas de fermentação.

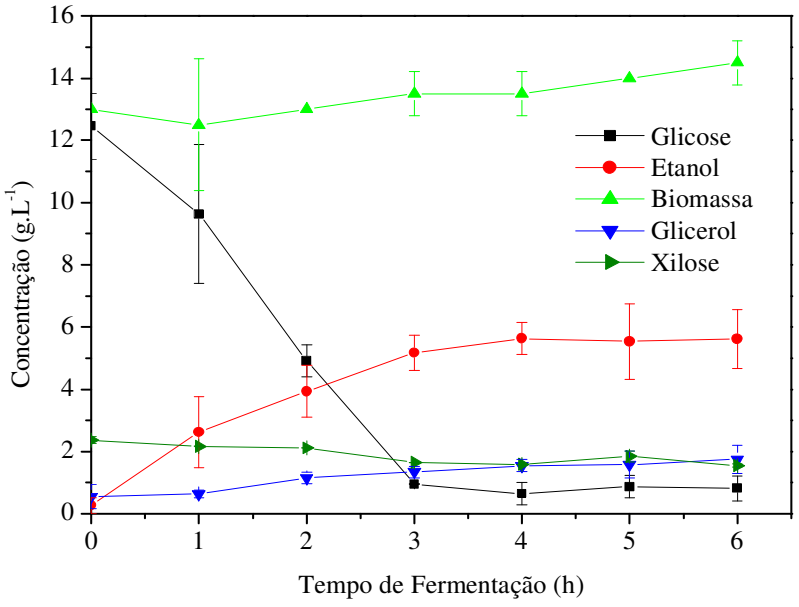


Figura 20 – Perfil de fermentação do hidrolisado obtido após enzimática hidrólise (30 FPU.$g_{CAB\text{-}M}^{-1}$) de CAB-M (16% m/v) pré-tratado com 1,0 mol.L^{-1} de NaOH a 600 W de potência por 15 minutos e *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm. Glicose (■), Etanol (●), Biomassa (▲), Glicerol (▼) e Xilose (▶).

O hidrolisado obtido de CAB-M apresentou concentração inicial de glicose de 12,5 g.L^{-1} e, após 4 horas de fermentação, a concentração de etanol alcançou 5,6 g.L^{-1}. Neste tempo, a produtividade foi de 1,41 g.L.$^{-1}$h^{-1}. Após esse tempo, as concentrações de glicose permaneceram constantes, em torno de 1,0 g.L^{-1}. Ressalta-se que a partir de 3 h de fermentação a concentração de etanol permaneceu em torno de 5,0 g.L^{-1}, com o esgotamento da glicose presente. A produtividade correspondente foi de 1,72 g.L.$^{-1}$h^{-1}. O rendimento em etanol obtido neste estudo baseado nos teores de glicose disponíveis, foi de 0,45 $g_{Etanol}.g_{Glicose}^{-1}$.

Zhu *et al.,* (2006) avaliaram a produção de etanol a partir de palha de trigo após pré-tratamento alcalino em microondas no sistema de fermentação SSF (Fermentação e Sacarificação Simultâneas). A máxima concentração de etanol obtida foi de 34,3 g.L^{-1} após 72 h de fermentação, com produtividade de 0,48 g.L.$^{-1}$h^{-1} e concentração inicial de palha de trigo pré-tratado de 100 g.L^{-1}. Ressalta-se que as condições de atividade enzimática no processo foram de 15 mg.$g_{substrato}^{-1}$ para substrato comercial com atividade de celulase e celobiase de 0,53 FPU/mg e 0,19 CBU/mg, respectivamente. Os autores destacaram que no processo de

SSF, o pré-tratamento alcalino em microondas apresentou valores de rendimento e produtividade de etanol superiores ao pré-tratamento alcalino convencional (realizado em aquecedor comum) proporcionado por uma elevada taxa de hidrólise enzimática promovido pelo pré-tratamento em microondas.

Na Tabela 7 estão apresentados os dados para conversão de substrato em produto, $Y_{P/S}$, obtido neste trabalho como outros da literatura para fermentação alcoólica de suco de caju e em meio sintético composto somente por glicose e frutose P.A.

Tabela 7 - Comparação dos parâmetros cinéticos da fermentação com *S. cerevisiae* para diversos substratos da literatura.

Substrato	Produtividade ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Eficiência (%)	Conversão $Y_{P/S}$ (g/g)
Meio Sintético (Glicose + Frutose)[1]	2,58	97,66	0,50
Suco de caju (Glicose + Frutose)[2]	3,02	84,30	0,43
Suco de caju (Glicose + Frutose)[1]	4,29	88,95	0,47
Este trabalho (Glicose)	1,41	93,44	0,48

[1]Pacheco *et al.*, 2009

[2]Pinheiro *et al.*, 2008

Observa-se da Tabela 7 que a eficiência e conversão ($Y_{P/S}$) do processo fermentativo do hidrolisado obtido deste trabalho apresentou valores similares aos da literatura, estando próximos aos valores para suco de caju e meio sintético. Esse resultado torna o hidrolisado obtido do bagaço de caju uma alternativa interessante para produção de etanol por fermentação. Embora a produtividade deste trabalho tenha sido inferior aos demais, ressalta-se que a concentração de açúcares totais nos trabalhos da literatura foi superior a 70 $g.L^{-1}$. Diante disso, ressalta-se a importância do estudo do pré-tratamento em microondas mais profundamente assim como outros pré-tratamentos que proporcionem um aumento na concentração de açúcares do hidrolisado.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados da caracterização da fibra, a utilização do pré-tratamento alcalino em microondas foi capaz de solubilizar parte da lignina da fibra do caju, tornando a celulose mais disponível ao ataque enzimático. A caracterização da fibra *in natura* resultou em teores de 19,21% ± 0,35 de celulose, 12,05% ± 0,37 de hemicelulose e 38,11% ± 0,08 de lignina. Após o pré-tratamento alcalino com 1,0 M em microondas, os níveis de celulose, hemicelulose e lignina foram de 22,07% ± 1,03, 14,36% ± 0,44 e 32,38% ± 1,86, respectivamente.

No estudo da influência da concentração do álcali, ambas as concentrações estudadas (0,2 e 1,0 $mol.L^{-1}$) proporcionaram maiores rendimentos em glicose (76,4 e 72,9 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, respectivamente). Identificou-se nestes ensaios a presença de celobiose nas concentrações de 25 e 38 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, respectivamente. Nestas condições, a digestibilidade de celulose foi de 33,89% ± 1,06 e 29,75% ± 3,10, respectivamente.

O estudo da potência e do tempo de pré-tratamento não influenciou de forma significativa a formação de glicose na hidrólise enzimática. O aumento da potência reduziu a concentração final de glicose, enquanto que o aumento do tempo de pré-tratamento de 15 para 30 minutos, a 600 W não influenciou os níveis de glicose obtidos. Contudo, a 900 W de potência, o tempo de pré-tratamento reduziu de forma expressiva a concentração de glicose.

Diante disso, com o propósito da fermentação do hidrolisado para obtenção de etanol, estudaram-se outros fatores que elevassem as concentrações de glicose no hidrolisado durante a etapa de hidrólise enzimática: concentração de fibra e carga enzimática. No estudo da influência da concentração de sólidos, a concentração de glicose obtida aumentou de 1,5 $g.L^{-1}$ para 8,8 $g.L^{-1}$, embora o rendimento em termos de fibra pré-tratada tenha decrescido, de 73 ± 8 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$ para 54 ± 8 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$. Após o aumento da atividade enzimática para 30 $FPU.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$, a maior concentração de glicose obtida foi de 15 $g.L^{-1}$ (98 $mg.g_{CAB\text{-}M}^{-1}$) após 72 h de hidrólise.

A fermentação do hidrolisado por células de *S. cerevisiae* resultaram na concentração de etanol de 5,6 $g.L^{-1}$ após 4 h de fermentação, com produtividade de 1,44 $g.L^{-1}h^{-1}$. Neste caso, o rendimento em etanol foi de 0,48 $g_{Etanol}.g_{Glicose}^{-1}$. Dos resultados obtidos, o pré-tratamento em microondas combinado com álcali é uma alternativa na remoção das estruturas recalcitrantes da fibra do caju tornando a celulose mais disponível ao ataque

enzimático, sendo os nutrientes do hidrolisado consumidos pela levedura durante a etapa de fermentação, obtendo-se etanol. No entanto, devido aos baixos valores de concentração de glicose no hidrolisado, devem-se avaliar outras variáveis, bem como, estudar a possibilidade de combiná-lo com outros pré-tratamentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, W. S. Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos - São Paulo, Brasil, 2008.

ALZATE, C. A. C. e TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. *Energy.* v. 31, p. 2447-2459, 2006.

ASSUNÇÃO, L. R. B. e MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Food Composition and Analysis,* v. 16, p. 647–657, 2003.

ATALA D.I.P.; COSTA A. C. e MACIEL R. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91, n. 3, p. 353-365, 2001.

CHANG, V.S.; NAGWANI, M.; KIM, C. H. e HOLTZAPPLE, M.T. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 94, p. 1–28, 2001.

CHU, B.C.H. e LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. *Biotechnology Advances,* v. 25, n. 5, p. 425-441, 2007.

DE LA HOZ, A.; DIAZ-ORTIZ, A. e MORENO, A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews,* n. 34, v. 2, p.164-178, 2005.

EKEN-SARAÇOGLU, N. e ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Biotechnology Letters*, v. 22, n.10, p. 855–858, 2000.

FERREIRA, A. C. H.; NEIVA, J. N. M.; RODRÍGUEZ, N. M.; LOBO, R. N. B. e VASCONCELOS, V. R., Valor nutritivo das silagens de capim-elefante com diferentes níveis de subprodutos da indústria do suco de caju. *Revista Brasileira de Zootecnia.* v. 33, n. 6, p. 1380-1385, 2004.

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

GOLLAPALLI, L. E.; DALE, B.E. e RIVERS, D.M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 98–100, p. 23–35, 2002.

GOSSELINK, R. J. A.; DE JONG, E.; GURAN, B. e ABÄCHERLI, A. Co-ordination network for lignin—standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). *Industrial Crops and Products.* v. 20, p. 121-129, 2004.

GOUVEIA, E. R.; DO NASCIMENTO R; T; SOUTO-MAIOR, A. M. e ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. Química Nova. n. 6, v. 32, p. 1500-1503, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN G. e ZACCHI G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology.* v. 24, n. 12, 549-556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; JEPPSSON, M. e GORWA-GRAUSLUND, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology,* v. 108, p. 147-177, 2007.

HASHIZUME, T. e AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial, vol 4, p. 43, 1ª reimpressão, 2005.

HILL, J.; NELSON, E.; TILMAN, D., POLASKY, S. e TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *PNAS*. v. 103, n. 30, 11206-11210, 2006.

HU, Z. N. e WEN, Z. Y. Enhacing enzymatic digestibility of switchgrass by microwave-assisted alkali pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*. v. 38, p. 369-378, 2008.

KAAR, W.E. e HOLTZAPPLE, M.T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy*. v. 18, n. 3, p. 189–199, 2000.

KESHWANI, D. R. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Tese de Doutorado. Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América – EUA, 2009.

KIM, J.S.; LEE, Y.Y. e PARK, S.C. Pretreatment of wastepaper and pulp mill sludge by aqueous ammonia and hydrogen peroxide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 84/86, n. 1/9 p. 129–139, 2000.

KIM, T.H.; KIM, J.S.; SUNWOO, C. e LEE, Y.Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresource Technology*, v. 90, p. 39–47, 2003.

KIM, J. S.; KIM, H.; LEE, J. S.; LEE, J. P. e PARK, S. C. Pretreatment characteristics of waste oak wood by ammonia percolation. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 148, p. 15-22, 2008.

KUYPER, M., HARHANGI, H. R., STAVE, A. K., WINKLER, A. A., JETTEN, M. S. M., DE LAAT W. T.A.M., DEN RIDDER J. J.J., DEN CAMP H. J.M. OP, VAN DIJKEN J. P e PRONK, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of european microbiological societies yeast research,* v. 4, p. 69–78, 2003.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H. e PRETORIOUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews,* v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002.

MA, H.; LIU W. W.; XING C.; WUA Y. J. e YU Z. L. Enhanced enzymatic saccharification of rice straw by microwave pretreatment. *Bioresource Technology,* v. 100, p. 1279-1274, 2009.

MATIAS, M. F. O.; OLIVEIRA, E. L.; GERTRUDES, E. e MAGALHÃES, M. M. A., Use of fibres obtained from the cashew (*Anacardium occidentale,* L.) and guava (*Psidium guayava*) fruits for enrichment of food products. *Brazilian Archives of Biology Technology,* v. 48, p. 143-150, 2005.

NIGAM, J.N. Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 208-215, 2001.

ÖHGREN, K.; BURA, R.; SADDLER, J. e ZACHHI, G. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover. *Bioresource Technology,* v. 98, p. 2503-2510, 2007.

PACHECO A. M.; GONDIM D. R. e GONÇALVES L. R. B. Ethanol production by fermentation using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in cashew apple bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (in press), 2010.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKA P.; GALBE M. e ZACCHI G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology,* v. 96, p. 843–850, 2005.

PALMQVIST, E. e HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosics hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17–24, 2000.

PAIVA, J.R.; CARDOSO, J.E.; BARROS, L. DE M.; CRISÓSTOMO, J.R.; CAVALCANTI, J.J.V. e ALENCAR, E.S. Clone de cajueiro-anão precoce BRS 226 ou Planalto: nova alternativa para o plantio na região semi-árida do Nordeste. Comunicado Técnico. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, n. 78, 2002.

PERSSON, P.; ANDERSON, J.; GORTON, L.; LARSSON, S.; NILVEBRANT, N. e JÖNSSON, L. J. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* v. 50, p. 5318-5325, 2002.

PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; e GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v.148, p.227-234, 2008.

REVISTA ÉPOCA 2008: Disponível na URL: Revista Época 2008 – site: http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0EMI7860-1526100.html reportagem sobre economia de 11/07/2008. Acessado em: novembro 2008.

REVISTA DA FIEC – Federação das Indústrias do Estado do Ceará, ano 2, edição 21, publicada em 28.02.2009.

ROCHA M. V. P.; RODRIGUES T. H. S.; GONÇALVES L. R. B. e MACEDO G. R. Estudo do pré-tratamento de bagaço de caju para a produção de bioetanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Recife, PE, 2008.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MACEDO, G.R. e GONÇALVES, L. R. B., Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with diluted sulfuric acid for bioethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* v. 155, p. 407–417, 2009.

RODRIGUES, T. H. S.; DANTAS, M. A. A.; PINTO, G. A. S. e GONCALVES, L. R. B. Tannase production by solid state fermentation of cashew apple bagasse. *Applied*

Biochemistry and Biotechnology. v. 136, p. 675 – 688, 2007.

SAHA, B. C. e BOTHAST, R. J. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 76, p. 65-77, 1999.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* v. 30, n. 5, p. 279-291, 2003.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A. e WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress*, v. 21, p. 816-822, 2005a.

SAHA B. C.; ITEN L. B., COTTA M. A. e WU Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3693–3700, 2005b.

SAHA, B. C. e COTTA M. A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress,* v. 22, p. 449-453, 2006.

SELIG M.; WEISS N. e JI Y. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report, NREL, 2008.

SLUITER A.; HAMES B.; RUIZ R.; SCARLATA C.; SLUITER J.; TEMPLETON D. e CROCKER D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report, NREL, 2008.

SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M. e ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H_2SO_4 impregnation for ethanol production, *Biomass and Bioenergy*, v. 24, p. 475-486, 2003.

SÖDERSTRÖM, J.; GALBE, M. e ZACHHI, G. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, v. 25, p. 187– 202, 2005.

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

TENGBORG, C.; GALBE, M. e ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnology Progress,* v. 17, p. 110-117, 2001.

UM, B. H.; KARIM, M. N. e HENK L. L. Effect of sulfuric and phosphoric acid pretreatments on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 115-125, 2003.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA JR., M. B. e PEREIRA JR., N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* v. 136, p. 141-154, 2007.

WYMAN, C.E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M. R. L. e LEE, Y. Y.Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959–1966, 2005.

YU, Z. e ZHANG, H. Pretreatments of cellulose pyrolysate for ethanol productionby *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia sp. YZ-1* and *Zymomonas mobilis*. *Biomass and Bioenergy*, v. 24, p. 257-262, 2003.

YU, Z. e ZHANG H. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae. Bioresource Technology.* v. 93, p. 199-204, 2004.

ZHU, S. D.; WU, Y. X.; YU, Z. N; LIAO, J. T. e ZHANG Y. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*. v. 40, p. 3082-3086, 2005.

ZHU, S. D.; WU, Y.X.; YU, Z.N.; ZHANG, X.; WANG, C.W.; YU, F.Q. e JIN, S.W. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry*. v. 41, p. 869-873, 2006.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo