

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

HELLOISE GABRIELLE DA MOTA

**COMPARAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE ESCRITÓRIO
COM PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO**

RECIFE

2015

HELLOISE GABRIELLE DA MOTA

**COMPARAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE ESCRITÓRIO
COM PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ester Ribeiro Gouveia

RECIFE

2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Mota, Helloise Gabrielle da

Comparação da hidrólise enzimática de papel de escritório com pré-tratamento químico e pré-tratamento físico / Helloise Gabrielle da Mota. – Recife: O Autor, 2015.

57 f.: il.

Orientadores: Ester Ribeiro Gouveia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2015.

Inclui referências

1. Biotecnologia – Indústria 2. Hidrólise 3. Papel I. Gouveia, Ester Ribeiro (orient.) II. Título.

660

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-332

HELLOISE GABRIELLE DA MOTA

**COMPARAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PAPEL DE ESCRITÓRIO
COM PRÉ-TRATAMENTO QUÍMICO E PRÉ-TRATAMENTO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial. Aprovada em 27/03/2015.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ester Ribeiro Gouveia
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Leonor Alves de Oliveira da Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^ª. Fernanda Leitão Vaz
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste - CETENE

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus pais, a Wilder Corrêa, a todos os amigos de pós-graduação, em especial a Samara Mendonça, Nina Mello e Iranildo, aos companheiros de laboratório, em especial a Jessica Rocha e Bárbara Alencar. Agradeço a Ana Carolina de Lira, Cíntia Mourelle, Ericson Miguel e Alexandre Lima. Agradeço ao CETENE, em especial ao Doutor Esteban e aos técnicos Isaac e Aldenise. Agradeço aos professores George Rocha e Ana Maria Souto-Maior. Agradeço também à CAPES, à orientação e à comissão examinadora. Sem vocês o percurso não teria sido possível. Obrigada.

RESUMO

No Brasil, o descarte de papel representa cerca de 40% do total de dejetos sólidos municipais. Visto que boa parte desses resíduos não é reciclada, e que a composição do papel contém mais de 60% de carboidratos, o papel apresenta um forte potencial para a produção de açúcares. O objetivo deste trabalho foi comparar a hidrólise enzimática de papel de escritório descartado, após pré-tratamento químico (com ácido sulfúrico 1% V/V; 50 rpm) com a hidrólise realizada após pré-tratamento físico, no qual o papel foi processado em moinho de facas a 10 mesh. Para tal estudo, foi aplicado um planejamento fatorial 2^4 , cujos fatores e níveis inferior e superior foram, respectivamente: tempo da hidrólise (24 e 72 h); carga enzimática (15 e 30 FPU/g celulose); carga de papel (4,5 e 7,5% m/V); e pré-tratamento (químico ou físico). Todas as hidrólises foram realizadas a 50°C e 150rpm, utilizando as enzimas comerciais Celluclast 1.5L e β -glucosidase Novozymes. As concentrações de celobiose e glicose foram determinadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e a análise do planejamento pelo software Statistica 7.0. O material foi caracterizado por meio das técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (Fourier Transmission Infrared – FTIR) e Difração de raios X (DRX). Análises estatísticas mostraram melhores resultados para o planejamento cujo material foi quimicamente pré-tratado, atingindo concentração de glicose de cerca de 25 g/L para o processo com 53,5 horas de duração, com carga enzimática igual a 20,8 FPU/g de substrato e 9% de carga de papel.

Palavras-chave: Açúcares. Papel. Material lignocelulósico. Hidrólise.

ABSTRACT

In Brazil, paper disposal represents about 40% of all municipal solid waste. Since much of this waste is not recycled, and that more than 60% of waste paper is composed by carbohydrates, the paper has great potential for the production of sugars. The objective of this study was to compare the enzymatic hydrolysis of office paper discarded after chemical pretreatment (with sulfuric acid 1% V/V, 50 rpm) with the hydrolysis performed after physical pretreatment, in which the paper was processed in mill to 10 mesh. For this study, an experimental design was applied, whose factors and lower and upper levels were: time of hydrolysis (24 and 72 h); enzyme loading (15 and 30 FPU/g cellulose); paper loading (4.5 and 7.5% w/v); and pre-treatment (chemical or physical). All hydrolyses processes were carried out at 50 °C and 150 rpm using commercial enzymes Celluclast 1.5L and β -glucosidase Novozymes. Concentrations of cellobiose and glucose were determined by high performance liquid chromatography analysis and the experimental design was analysed using the Statistica 7.0. The material was characterized by Fourier transform techniques (Fourier Infrared Transmission - FTIR) and X-ray diffraction (XRD). Statistical analysis showed better results for the material of which has been chemically pretreated, reaching glucose concentration of about 25 g/L to process during 53.5 hours, with enzyme loading of 20.8 FPU/g of substrate and paper loading of 9%.

Palavras-chave: Sugars. Waste paper. Lignocellulosic substrate. Hydrolysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Condições dos ensaios dos planejamentos fatoriais para os ensaios com pré-tratamento químico e pré-tratamento físico.....	28
Tabela 5.1. Composição percentual de papel de escritório descartado.....	32
Tabela 5.2. Cristalinidade do material.....	38
Tabela 5.3 – Ensaios do planejamento.....	40
Tabela 5.4 – Efeitos dos fatores, coeficientes de regressão e erros padrão do modelo.....	42
Tabela 5.5 – Ensaios do ponto central do planejamento.....	43
Tabela 5.6 – Efeitos dos fatores e coeficientes de regressão do modelo.....	44
Tabela 5.7 – Redirecionamento do planejamento com pré-tratamento químico.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Celulose: fita ou cordão chato	15
Figura 3.2 – Estrutura da cadeia de celulose composta por fitas ligadas entre si por meio de ligações de hidrogênio	15
Figura 3.3 – Representação esquemática da molécula de hemicelulose.....	16
Figura 3.4 – Representação esquemática da molécula de lignina	17
Figura 3.5 – Representação da ação das enzimas sobre a hidrólise da celulose.....	18
Figura 4.1 - Esquema de extração com aparelho de Soxhlet.....	24
Figura 4.2 – Fluxograma das hidrólises	30
Figura 5.1 – Espectro de FTIR para papel com pré-tratamento físico.....	33
Figura 5.2 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 4,5% m/V ...	34
Figura 5.3 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 6% m/V.....	34
Figura 5.4 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 7,5% m/V...	35
Figura 5.5 – Comparação de espectros de FTIR para papel não pré-tratado e papeis pré-tratados com diferentes cargas de sólidos	35
Figura 5.6 – Espectro de DRX para papel com pré-tratamento físico	36
Figura 5.7 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 4,5%.....	36
Figura 5.8 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 6%.....	37
Figura 5.9 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 7,5%.....	37
Figura 5.11 – Diagrama de Pareto para planejamento experimental 2 ⁴	42
Figura 5.12 – Diagrama de Pareto para planejamento experimental 2 ³	43
Figura 5.13 – Superfície de resposta para influência do tempo e da carga enzimática na concentração de glicose.....	44
Figura 5.14 – Superfície de resposta para influência do tempo e da carga de sólidos na concentração de glicose.....	45
Figura 5.15 – Superfície de resposta para influência da carga enzimática e da carga de sólidos na concentração de glicose.....	45

Figura 5.16 – Influência do tempo ao longo do caminho de máxima inclinação.....47

Figura 5.17 – Influência da carga enzimática ao longo do caminho de máxima inclinação...47

Figura 5.18 – Influência da carga de sólidos ao longo do caminho de máxima inclinação.....48

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 PAPEL	14
3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	17
3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	23
4.2 CARACTERIZAÇÃO	23
4.2.1 <i>Preparo do material</i>	23
4.2.2 <i>Determinação da umidade</i>	23
4.2.3 <i>Determinação dos extrativos</i>	24
4.2.4 <i>Hidrólise com ácido sulfúrico</i>	25
4.2.5 <i>Determinação da lignina insolúvel e cinzas</i>	26
4.2.6 <i>Determinação de lignina solúvel</i>	26
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	27
4.4 PRÉ-TRATAMENTO	28
4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	29
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	30
4.7 TRATAMENTO DE DADOS	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 CARACTERIZAÇÃO	32
5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	39
5.3 ENSAIOS NA DIREÇÃO DA MÁXIMA INCLINAÇÃO	46
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

Embora o uso de combustíveis fósseis continue aumentando, juntamente com a quantidade de veículos nas ruas, é notável também o crescimento do consumo de combustíveis renováveis. Em 2012 o consumo de gasolina foi 12% maior que em 2011, já em 2013, o aumento foi de apenas 5%, enquanto em 2014 verificou-se um aumento de 7% no consumo da mesma, em relação ao ano anterior. Em relação ao etanol, que já atingia mais de 15% do consumo total de combustíveis no Brasil em 2013, registrou-se um aumento de 10,5% do consumo em 2014 (BRUMMER *et al.*, 2014; Valor Econômico, 2014; G1, 2015).

Os esforços em busca de novas fontes de energia renovável continuam crescendo, com o objetivo de reduzir a emissão de gases do efeito estufa e, embora a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar já seja bastante difundida, é importante que outras fontes renováveis e abundantes sejam estudadas (BRUMMER *et al.*, 2014).

O Brasil é o quarto maior produtor de celulose de eucalipto para produção de papel, tendo produzido 10,3 milhões de toneladas de papel em 2012, tornando-se o 9º maior produtor mundial de papel. Em 2015, a produção permanece praticamente estável, com a produção de 10,4 milhões de toneladas, ocupando a posição de 11º maior produtor mundial. Apesar da queda no ranking de produção, é notável o crescimento constante do país no setor desde a década de 1960 (Bracelpa, 2013; Painel Florestal, 2014; Ibá, 2015).

Embora mais de 90% das indústrias estejam concentradas nas regiões sul e sudeste, de acordo com Antonio Sergio Alípio, presidente da empresa de papel e celulose Veracel, na Bahia, o solo e o clima do Nordeste apresentam boas condições para o plantio do eucalipto. As indústrias de papel e celulose estão começando a migrar para o norte e nordeste do país. A empresa Suzano Papel e Celulose, por exemplo, que tem planos para levar suas fábricas ao Piauí, inaugurou uma nova fábrica no Maranhão, em março de 2014, com capacidade de produção de 1,5 milhão de toneladas de celulose/ano (O Papel, 2010; Portal Brasil, 2014).

A níveis mundiais, no ano de 2012, foram produzidas quase 400 mil toneladas de papel, sendo 25% da produção total provenientes da China. De acordo com a Pöyry, indústria do setor, até 2025, o continente asiático será responsável pelo crescimento de 90% da indústria do papel, elevando a capacidade em 88 milhões de toneladas de papéis diversos, anualmente (Valor Econômico, 2012; Bracelpa, 2013).

Apesar de 58,9% de todos os papéis que circularam no Brasil, incluindo os não recicláveis, em 2013, terem sido encaminhados para a reciclagem, é grande a perda econômica da porção reciclável que é descartada sem reutilização, fazendo com que o papel

corresponda a 40% do total de dejetos sólidos do país. De acordo com o Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA (2010), o país deixa de ganhar cerca de R\$ 8 milhões ao ano devido ao descarte de papel encaminhado aos aterros e lixões urbanos (Ambiente Brasil, 2013; Bracelpa, 2013; ANAP, 2014).

Visto que o papel pode ter de 50 a 78% de sua composição constituído de carboidratos, além de ser descartado em abundância, este material se apresenta como uma fonte em potencial para a obtenção de açúcares fermentescíveis. O uso do papel descartado exclui ainda a dependência de uma única fonte abundante de matéria-prima renovável para a produção de etanol. Além de incluir o aproveitamento de um resíduo que, embora possa participar do processo cíclico de reciclagem, gerando novo papel, não pode ser reciclado infinitas vezes, pois suas fibras perdem a resistência necessária aos diversos usos ao que o papel é destinado (Bracelpa, 2013).

Ainda, de acordo com estudos realizados na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (Esalq-USP), o processo de reciclagem para produção de papel 100% reciclado, por incluir outras etapas, como a de purificação e remoção de tintas, pode gerar até 6 vezes mais resíduos que a produção de um papel de fibras 100% virgens (O Estado de São Paulo, 2008).

Como demonstrado, o papel é matéria-prima produzida em abundância, que necessita ser destinado a uma nova forma de processamento para redução de seu acúmulo, diante das limitações da reciclagem, além de possuir um alto índice de carboidratos. A literatura mostra que é possível não apenas a produção de açúcares por meio da hidrólise enzimática de papel, como também a produção de etanol em processos fermentativos combinados com a mesma (WANG *et al.*, 2012; ELLISTON *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013, PIVNENKO, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o processo de hidrólise enzimática de papel de escritório com pré-tratamento químico e com pré-tratamento físico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Caracterizar o papel de escritório descartado;
- b. Aplicar um planejamento fatorial 2^4 para investigar o efeito do tempo, da carga enzimática, da carga de papel e do tipo de pré-tratamento na hidrólise;
- c. Aplicar um planejamento fatorial após triagem das variáveis no planejamento 2^4 ;
- d. Realizar ensaios na direção do caminho de máxima inclinação do planejamento fatorial aplicado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PAPEL

Assim como a madeira, o papel tem sua composição variada de acordo com a espécie de sua madeira de origem. Recoret, Gutiérrez e Río (2010) estudaram a madeira de 5 espécies de eucalipto, principal fonte da indústria de papel e celulose – largamente utilizada no sudeste da Europa, no Brasil, na Austrália, no Sul da África, entre outros países – e constataram que os polissacarídeos presentes no eucalipto podem variar de 75 até 78% na composição da madeira. Sendo essa composição liderada por unidades monoméricas de glicose, proveniente da celulose, seguida da xilose, proveniente da hemicelulose.

No papel, a composição varia com o tipo de material produzido. De acordo com Wayman *et al.* (1992), o papel branco de escritório possui 88% de carboidratos; seguido pelo papel kraft, com 81,3%; papelão, com 77,6% (BRUMMER *et al.*, 2014); e jornal, com 70,9%. Segundo Wu *et al.* (2001) e Brummer *et al.* (2014), o papel de escritório possui cerca de 66% de celulose e 13% de hemicelulose em sua composição, além de apenas 0,93% de lignina. Para o papel reciclado, a composição varia de 34% de celulose (MARQUES, 2008) a 54% (BRUMMER *et al.*, 2014). De acordo com Wang *et al.* (2013), o papel de escritório é composto por cerca de 55% de glicose, proveniente da celulose, 14% de xilose, proveniente da hemicelulose, e 5% de lignina. Na composição de diversos tipos de papel, também podem ser encontrados CaCO_3 , utilizados no processo de branqueamento do mesmo, que pode levar à remoção parcial da hemicelulose e da lignina da madeira, reduzindo suas composições finais no produto (CARVALHO e ALMEIDA, 1998; WAN *et al.*, 2015). Desta forma, papéis mais brancos possuem porcentagem de carbonato de cálcio mais alta, atingindo 7,5% no papel de escritório e apenas 2% no jornal (CARVALHO e ALMEIDA, 1998).

A celulose é um polímero linear composta por unidades de glicose. Seus monômeros mantêm-se unidos por meio de ligações do tipo β -1,4, organizando suas unidades em forma de fitas ou cordões chatos, como mostra a Figura 3.1. Essas fitas, por sua vez, unem-se entre si através de pontes de hidrogênio, tanto inter, quanto intramoleculares, como pode ser observado na Figura 3.2 (ATKINS, 2006; WERTZ *et al.*, 2010).

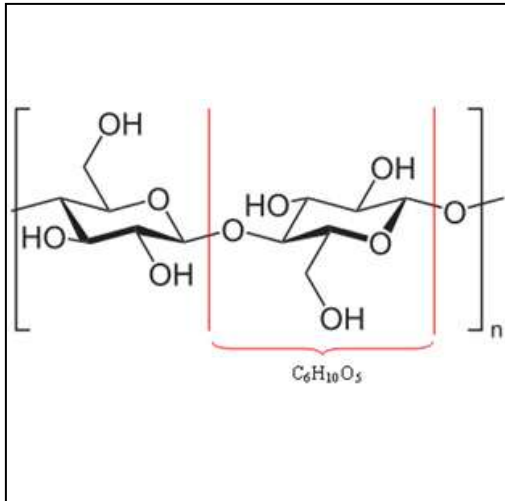


Figura 3.1 – Fita ou cordão chato. (LAGHI, 2007)

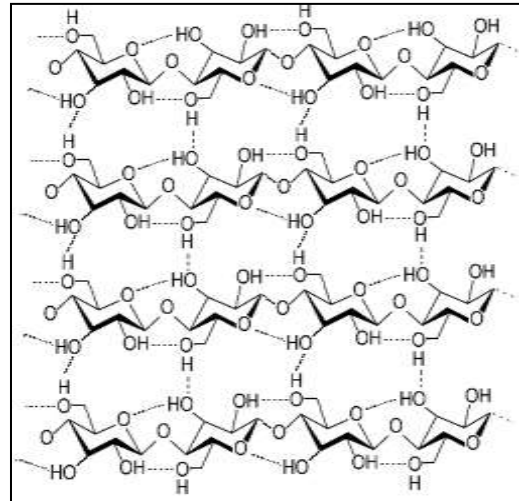


Figura 3.2 – Estrutura da cadeia de celulose composta por fitas ligadas entre si por meio de ligações de hidrogênio. (LAGHI, 2007)

A configuração da cadeia de celulose faz com que a sua estrutura seja forte e flexível e, portanto, útil como material estrutural das plantas. As pontes de hidrogênio conferem cristalinidade à cadeia, permitindo que as fitas se organizem de forma compacta (MARABEZI, 2009; WERTZ *et al.*, 2010; O PAPEL, 2011).

A celulose é a principal matéria-prima para a produção de papel, podendo ser utilizada tanto em forma de fibras curtas – para a produção de papeis de escritório e alguns tipos de papel cartão –, conferindo ao material maior maciez e opacidade, quanto em forma de fibras longas – utilizadas na fabricação de papeis ondulados, para embalagem e outros tipos de papel cartão –, propiciando ao papel maior resistência mecânica. Os dois tipos de fibras também podem ser combinados para produção de outros tipos de papel, como o de imprensa e revistas (Ibá, 2014).

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo de cadeia ramificada e baixo peso molecular, além de apresentar baixo grau de polimerização, não possui estrutura cristalina. Ao contrário da celulose que é formada por sequências de um único monômero, a glicose, a hemicelulose possui em sua composição diversos carboidratos, entre eles pentoses e hexoses, como glicose, xilose, arabinose, manose e galactose, em diferentes proporções, que variam de acordo com o organismo originário da cadeia de hemicelulose (SPIRIDON e POPA, 2005).

A hemicelulose tem como função reforçar a rigidez da celulose, recobrando as fibras celulósicas (WYMAN *et al.*, 2005). A representação esquemática da cadeia de hemicelulose pode ser visualizada na Figura 3.3.

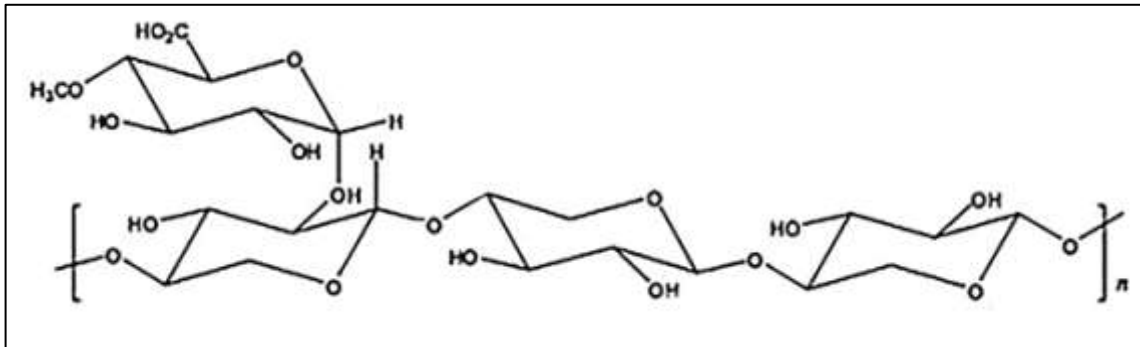


Figura 3.3 – Representação esquemática da molécula de hemicelulose (SANTOS, 2012).

A lignina foi descoberta em 1838, quando Anselme Payen, ao tratar madeira com ácido nítrico, observou uma perda na sua massa. Payen observou que a porção restante era sólida e fibrosa e a nomeou como celulose. Enquanto a porção dissolvida no ácido nítrico, que possuía um teor de carbono ainda mais alto que a celulose, ficou conhecida como lignina. Na madeira das árvores, a lignina desempenha o papel de dar suporte para a planta (SJÖSTRÖM, 1993).

A lignina é um polímero altamente complexo, amorfo e formado por unidades de fenilpropano, na presença de ligações éter, álcoois alifáticos e benzílicos, fenóis, aldeídos, cetonas e ésteres, como pode ser observado na representação esquemática da lignina apresentada na Figura 3.4 (ROWELL, 2013).

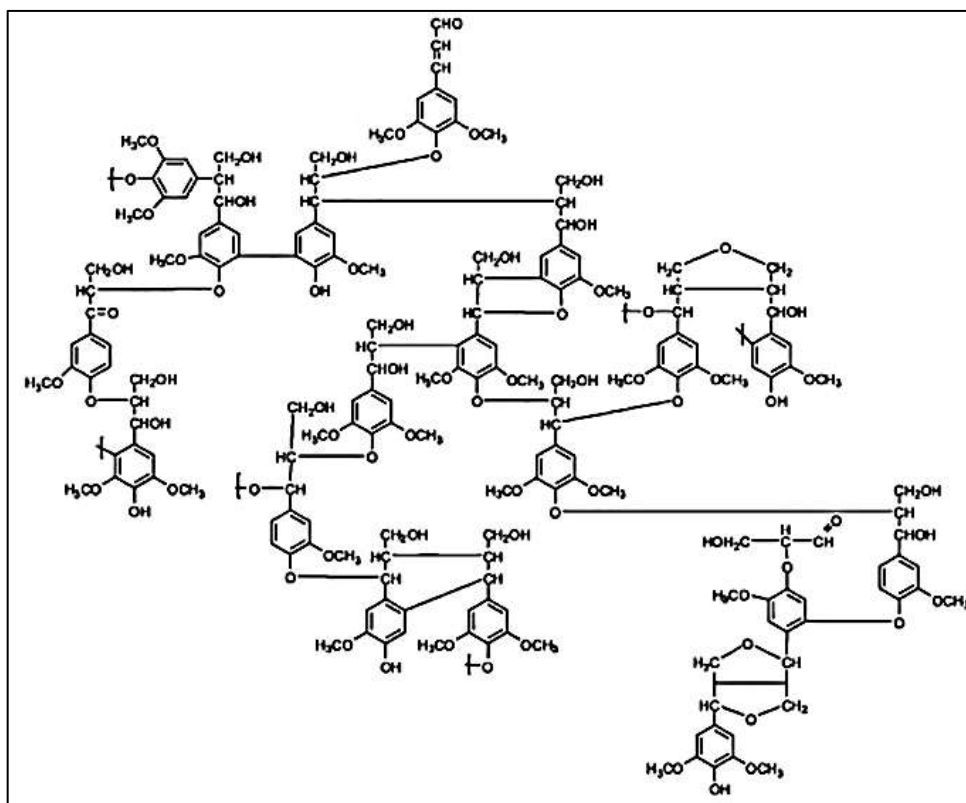


Figura 3.4 – Representação esquemática da molécula de lignina (SANTOS, 2012).

3.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática atua clivando as ligações das cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose por meio de enzimas, chamadas de celulasas e hemicelulasas, respectivamente. Muitos microrganismos apresentam um complexo sistema de enzimas capazes de degradar a hemicelulose, devido à estrutura heterogênea dos seus principais componentes: a xilose e a manose. Como a estrutura da hemicelulose é mais complexa que a estrutura da celulose, as enzimas que degradam a hemicelulose também são mais complexas. Desta forma, as hemicelulasas também são capazes de facilitar a degradação da celulose por meio da exposição das suas fibras, tornando-as mais vulneráveis ao ataque das celulasas. (BATTAN, 2007; GÍRIO *et al.*, 2010)

As celulasas (Figura 3.5) são enzimas capazes de atuar na quebra das ligações de celulose em unidades monoméricas de glicose. São divididas em três classes: as endoglucanases, que atuam nas regiões de baixa cristalinidade da celulose, clivando ligações beta;

as exoglucanases, que atuam removendo as moléculas de celobiose (dímero constituído por duas unidades de glicose, que pode inibir o processo de sacarificação), a partir das extremidades da cadeia de celulose; e as β -glucosidasases, que geram glicose a partir da celobiose e reduzem seu poder inibitório (BATTAN, 2007).

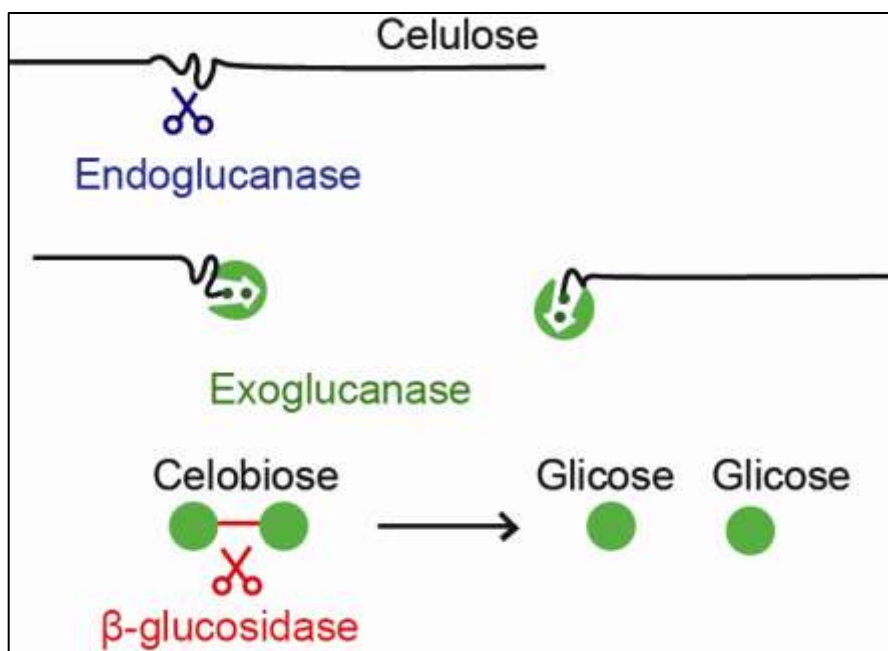


Figura 3.5 – Representação da ação das enzimas sobre a hidrólise da celulose. Adaptado de Tébéka, I. R. M. *et al.* (2009).

Dentre as enzimas mais utilizadas está a Celluclast, enzima formada por uma mistura de celulasas, produzida a partir do microrganismo *Trichoderma reesei*, que também é um produtor de hemicelulase (GIL *et al.*, 2007).

De acordo com Rocha *et al.* (2011) e Chu e Feng (2013), para que a hidrólise enzimática seja eficiente, é necessário que seja realizado um pré-tratamento do material lignocelulósico, com intuito de liberar a hemicelulose, permitindo assim uma atuação mais eficiente da enzima sobre a celulose. Tais pré-tratamentos podem ser químicos, físicos, físico-químicos, ou biológicos.

Os pré-tratamentos químicos incluem processos ácidos ou alcalinos. Esses tipos de pré-tratamento são responsáveis por agir na parede celular, modificando-a estrutural e quimicamente. Neste caso, a hemicelulose é hidrolisada, deixando a cadeia de celulose mais acessível às enzimas. A lignina é bastante resistente à hidrólise ácida, de modo que, embora o ácido seja capaz de hidrolisar as ligações éter da lignina, não é capaz de dissolvê-la sem a

presença de outros agentes químicos, como aqueles capazes de realizar a reação de sulfonação (KLOCK *et al.*, 2005 e GÁMEZ *et al.*, 2006).

O pré-tratamento químico realizado com ácidos, também conhecido como pré-hidrólise, geralmente é realizado com ácidos diluídos entre 1% e 10% em massa, sendo os mais utilizados o ácido sulfúrico, o ácido acético e o ácido clorídrico, uma vez que o objetivo do processo é tornar a celulose mais vulnerável ao ataque enzimático, não promover a total hidrólise da mesma (GÁMEZ *et al.*, 2006).

Além disso, a utilização de altas concentrações de ácido leva à corrosão dos materiais metálicos presentes nas estruturas industriais, tornando a prática economicamente inviável. O pré-tratamento ácido pode ainda gerar inibidores, como o ácido acético proveniente dos grupos acetil da hemicelulose e o furfural, cujas concentrações também aumentam com a concentração dos ácidos utilizados, bem como com o tempo da hidrólise (RABELO *et al.*, 2011; DUARTE, 1989; OGEDA e PETRI, 2010).

Rocha *et al.* (2011), estudaram a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar através da mistura de ácido sulfúrico e ácido acético, ambos a concentração de 1%. O método mostrou-se eficiente removendo mais de 90% da hemicelulose inicialmente presente. Rodríguez-Chong *et al.* (2004), estudaram o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar com ácido nítrico em concentrações que variavam de 2% a 8%. Obtendo máxima produção de xilose e baixa concentração de inibidores com a concentração de 2% de HNO₃.

Zhang *et al.* (2015) estudaram a influência do pré-tratamento químico comparando a utilização de ácido sulfúrico (1,5% m/m) e ácido acético (60% v/v), atingindo até 40% de conversão de celulose em glicose, em 90h de hidrólise. Qi *et al.* (2011) estudaram a hidrólise enzimática após pré-tratamento com ácido sulfúrico a 2% m/v, obtendo rendimento de 68%. Chu e Feng (2013) obtiveram rendimento de 82,2% ao submeter o material a pré-tratamento com ácido fosfórico, a 8 g/L, para papel de escritório.

Já em pré-tratamentos realizados com bases, a lignina é o componente removido e a hidrólise da hemicelulose precisa ser realizada com a utilização de hemicelulases. O pré-tratamento alcalino leva à solubilização da lignina por meio da formação de grupos fenólicos decorrentes do rompimento de ligações éter presentes entre as unidades de fenilpropano, permitindo que os carboidratos de menor peso molecular sejam removidos da parede celular do substrato (KLOCK, 2005; MARABEZI, 2009; OGEDA e PETRI, 2010; SZCZODRAK e FIEDUREK, 1996).

Os pré-tratamentos físicos consistem em aumentar a área superficial do material a ser hidrolisado por meio da redução do tamanho de suas partículas, tornando-as mais acessíveis às enzimas. Esse tipo de pré-tratamento pode ser realizado através de técnicas de moagem, que também é capaz, em alguns casos, de reduzir o índice de cristalinidade e o grau de polimerização da celulose. Os equipamentos mais utilizados são moinhos de facas e de esferas (SOUSA *et al.*, 2009; LENGOWSKI *et al.*, 2013).

Brummer *et al.* (2014) avaliaram a obtenção de açúcares provenientes de papel offset pré-tratado com moagem mecânica e lavagem com água destilada, obtendo rendimento de apenas 18,8%, após 96 h de hidrólise.

Há ainda os pré-tratamentos biológicos, realizados na presença de fungos e algumas bactérias (actinomicetos), e físico-químicos, como a explosão a vapor e o LHW (processo hidrotérmico de líquido com água quente), nos quais o material é alterado por meio de agentes químicos e físicos (CAMPOS *et al.*, 2013; OGEDA e PETRI, 2010).

Ramos *et al.* (2015), que estudaram a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por meio de explosão a vapor, com o material previamente impregnado com ácido fosfórico (9,5 mg/g de bagaço), obtiveram conversão de celulose em glicose de 69%, em presença de alta carga de sólidos e baixa carga enzimática.

Wang *et al.* (2012) estudaram a produção de açúcares a partir de papel de escritório agitado em água (15% m/m) durante 10 minutos e com ajuste de pH com ácido sulfúrico (1 M), obtendo conversão de celulose em glicose em torno de 50% e 60% para carga enzimática de 15 FPU/g e 30 FPU/g, respectivamente. Utilizando enzimas Celluclast 1,5L e Novozyme 188, na concentração de 13,26 g/L, Wang *et al.* (2012) obtiveram concentrações de glicose em torno de 60 g/L para 24 h de hidrólise.

3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento de experimentos é a área mais importante da estatística, podendo ser utilizados para triagem de variáveis a serem estudadas, avaliação da influência das variáveis ao longo dos experimentos, construção de modelos empíricos, otimização de processos e construção de modelos mecanísticos (BARROS NETO *et al.*, 2001).

Entre os objetivos do planejamento está caracterizar, de modo a otimizar, ou ainda investigar de maneira local, a relação entre uma ou mais respostas e dois ou mais fatores, cuja relação, conhecida ou não, pode gerar uma função entre si, de modo a aproximar tal relação de um modelo empírico, utiliza-se a metodologia de superfície de resposta (MSR).

Tal metodologia é dividida em duas etapas: a modelagem e o deslocamento, que são repetidas até que a região em torno do ótimo seja identificada e então explorada. A modelagem é realizada ajustando-se modelos lineares ou quadráticos às respostas obtidas por meio do planejamento, enquanto o deslocamento é realizado na direção que indica que a resposta varia de maneira a se aproximar do resultado almejado, o caminho da máxima inclinação (BARROS NETO *et al.*, 2001).

A MSR foi desenvolvida no início da década de 1950, sendo utilizada, inicialmente, em processos da indústria química. Hoje continua sendo largamente utilizada para os mais diversos processos (BARROS NETO *et al.*, 2001). Scheufele *et al.* (2012) estudaram, por meio de planejamento experimental 2^4 , a influência do tempo, da diluição enzimática, concentração de surfactante e proporção sólido-líquido. O tempo de hidrólise foi baseado na metodologia de determinação de atividade enzimática, descrito por Ghose (1987), cujo tempo de reação foi adotado como ponto central do planejamento. Enquanto a proporção entre sólido e líquido foi determinada de acordo com o fator limitante, a concentração máxima de sólido no meio líquido, que determina a eficiência do processo em função da consistência elevada para valores mais elevados que o nível superior utilizado.

Fleuri e Sato (2008), estudaram a influência do pH, da temperatura e da agitação na produção de enzimas β -1,3 glucanase. A escolha do pH foi realizada de acordo com o seu limite máximo, uma vez que um alto valor de pH poderia desestabilizar a enzima, enquanto a agitação e a temperatura foram determinadas de acordo com as condições ideais para o microrganismo *Cellulosimicrobium cellulans* 191, responsável pela produção das enzimas.

Ramos *et al.* (2015) aplicaram um planejamento fatorial 2^3 para investigar o efeito da intensidade da agitação, da carga de sólidos e da carga enzimática para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por meio de explosão a vapor.

Guerfali *et al.* (2014) buscaram a otimização da hidrólise enzimática de papel de escritório e papel de jornal, com objetivo de melhorar o grau de sacarificação dos materiais,

estudando a influência do tempo, do pré-tratamento com ácido fosfórico e da carga de sólidos na hidrólise. Chu e Feng (2013), com o mesmo objetivo, estudaram, além dos efeitos do tempo de hidrólise e do pré-tratamento com ácido fosfórico, a concentração de surfactante e a carga enzimática utilizadas no processo de hidrólise.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

Foi utilizado papel de escritório (sulfite, 75g/m²) descartado do Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LABBIO – Danti/UFPE).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DE ESCRITÓRIO

A caracterização foi realizada em triplicata com base na metodologia de Gouveia *et al.* (2009), no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE-USP).

4.2.1 *Preparo do material*

O papel de escritório foi moído em macro moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (Marconi MA 680), do Laboratório de Bioprocessos/Biocombustíveis, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (LABIO/CETENE), a 30 mesh (GOUVEIA *et al.*, 2009).

4.2.2 *Determinação da umidade*

Seguindo a metodologia de Gouveia *et al.* (2009), foram distribuídos 3g do papel em três béqueres, previamente secos e tarados. O conjunto foi fechado com papel alumínio, pesado e levado à estufa a 105°C até peso constante. O material foi transferido para

dessecador, para que houvesse perda de calor, e novamente pesado. O cálculo da umidade foi realizado de acordo com a Equação 4.1:

$$U = \left(1 - \frac{m_{seca}}{m_{úmida}}\right) * 100 \quad (4.1)$$

Onde U representa o percentual de umidade, m_{seca} é determinada pela diferença de massa entre o conjunto béquer + papel antes e depois da secagem e $m_{úmida}$ é a diferença entre o valor da massa do conjunto antes da secagem e a massa do béquer.

4.2.3 Determinação dos extrativos

Para determinação dos extrativos, seguiu-se a metodologia de Gouveia *et al.* (2009). Foram pesados 15 g de papel, base seca. O material foi colocado em um cartucho de papel de filtro quantitativo, previamente seco e tarado, e fechado com um pouco de algodão. O conjunto foi submetido ao processo de extração em aparelho Soxhlet (Figura 4.1), dividido em duas etapas: a primeira utilizando como solvente a mistura de ciclohexano e etanol (1:1), durante 8 horas, e a segunda utilizando água, durante o mesmo período. Após as duas etapas, o material foi seco em estufa a 105°C até que fosse atingido valor de massa constante.

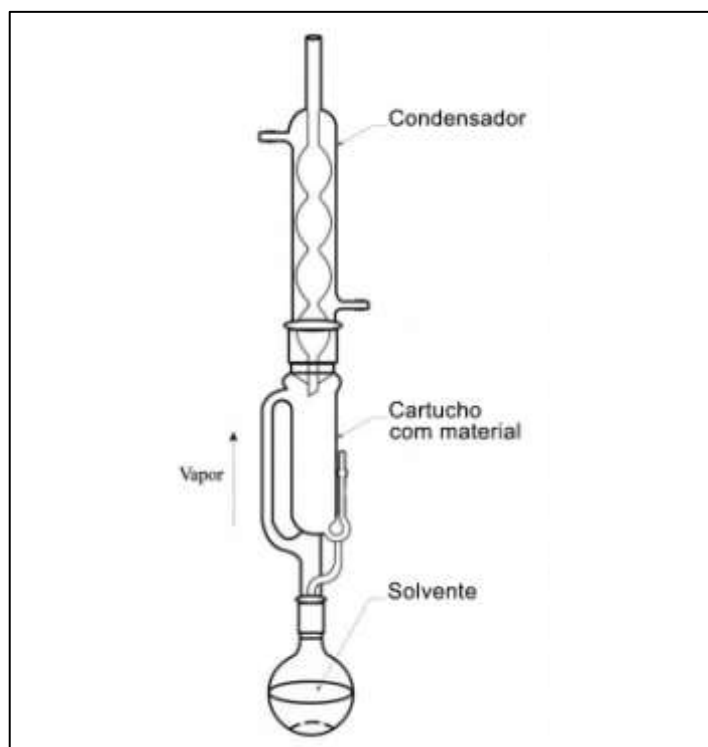


Figura 4.1 - Esquema de extração com aparelho de Soxhlet.

A porcentagem de extrativos foi calculada de acordo com a Equação 4.2:

$$E = \left(\frac{m_i - m_f}{m_f} \right) * 100 \quad (4.2)$$

Onde E representa o percentual de extrativos, m_i é a massa inicial do conjunto papel de filtro + papel antes da extração e m_f é o valor da massa do conjunto após a extração e secagem do mesmo.

4.2.4 Hidrólise com ácido sulfúrico

Uma porção de 2 g de papel, base seca, foi colocada em um béquer de 100 mL. O béquer, juntamente com um frasco com tampa contendo uma solução de ácido sulfúrico (72% v/v), foi colocado em banho-maria a 45°C durante 10 minutos. Após este período, 13 mL de ácido sulfúrico, contido no frasco com tampa, foram adicionados ao béquer contendo o papel. O sistema foi vigorosamente agitado e o papel macerado com bastão de vidro durante 7 minutos. Ao final do processo, a reação de hidrólise foi interrompida pela adição de 50 mL de água destilada. O material foi então transferido para um erlenmeyer de 500 mL, enquanto o béquer e o bastão de vidro foram lavados com 225 mL de água. Para completar a hidrólise, o erlenmeyer foi fechado com papel de alumínio e levado à autoclave, durante 30 minutos, a temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. O erlenmeyer foi então resfriado até a temperatura ambiente e o material filtrado em papel de filtro previamente seco e tarado (Quantitativo – preta; Ref. 41; retenção nominal de 20-25 micra). A porção líquida, hidrolisado, foi recolhida em balão volumétrico de 500 mL. O papel contido na porção sólida foi lavado com água destilada, com porções de 50 mL até que o menisco do balão seja atingido. A porção líquida foi armazenada em frasco com tampa, envolvido em papel alumínio, para análises posteriores (GOUVEIA *et al.*, 2009).

4.2.5 Determinação da lignina insolúvel e cinzas

A lignina e as cinzas foram determinadas de acordo com Gouveia *et al.*, (2009). O material retido no papel de filtro continuou sendo lavado com água destilada até que fosse atingida a isenção de sulfatos (aproximadamente 1500 mL). Terminada a lavagem, o material foi levado à estufa, a 105°C, até peso constante, em béquer previamente seco e tarado. Após a secagem o béquer foi novamente pesado para que se tornasse conhecida a massa do material composto por lignina insolúvel e cinzas.

Em seguida, o béquer foi vedado e levado à mufla, onde a amostra foi lentamente calcinada até 300°C e então submetida à temperatura de 800°C pelo período de 2 horas. Após o resfriamento, o material foi pesado. A determinação da massa de lignina insolúvel e da porcentagem de cinzas foi realizada por meio das Equações 4.3 e 4.4, respectivamente:

$$LI = m_e - m_c \quad \text{Equação 4.3}$$

$$C = \frac{m_c}{m_e} * 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

Onde L_I é o valor da massa da lignina insolúvel, determinado pela diferença entre a massa do material ao ser retirado da estufa (m_e) e a massa de cinzas (m_c), conhecida subtraindo o valor da massa do material após a mufla do valor da massa do béquer. C representa a porcentagem de cinzas.

4.2.6. Lignina solúvel

Em um balão volumétrico (100 mL) foram colocados 5 mL de hidrolisado, 50 mL de água destilada e 1,5 mL de NaOH (6 M). Após agitação, o volume foi completado com água destilada. A solução foi lida em espectrofotômetro a 280 nm. A determinação da concentração da lignina solúvel foi determinada de acordo com a Equação 4.5 (GOUVEIA *et al.*, 2009):

$$LS = 4,187 * 10^{-2} * (A_T - A_{pd}) - 3,279 * 10^{-4} \quad \text{Equação 4.5}$$

$$A_{pd} = c_1 \varepsilon_1 + c_2 \varepsilon_2 \quad \text{Equação 4.6}$$

Onde LS representa a concentração de lignina solúvel, A_T é a absorbância da solução, contendo lignina solúvel e os produtos de decomposição dos açúcares, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural, e A_{pd} é a absorbância dos produtos de decomposição, determinada pela Equação 4.6. Onde c_1 e c_2 são as concentrações de furfural e HMF, respectivamente, determinadas por CLAE, seguindo o procedimento do tópico 4.2.7, e ε_1 e ε_2 são as absorvidades de ambos e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 L.g⁻¹.cm⁻¹.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Neste trabalho foi utilizada a metodologia de superfície de resposta para planejamento 2⁴, cujos níveis foram determinados com base em Wang *et al.* (2012). As proporções de cada ensaio foram descritas na Tabela 4.1, onde x_1 é o tempo (T), x_2 é a carga enzimática da enzima comercial Celluclast (E), x_3 é a carga de sólidos (S) e x_4 é o pré-tratamento (PT). Os níveis inferiores são representados pelo sinal negativo, enquanto os superiores são representados pelo sinal positivo. No caso do fator 4, pré-tratamento, o nível inferior representa o pré-tratamento físico, enquanto o nível superior representa o processo com pré-tratamento químico. Como o quarto fator é qualitativo, o planejamento foi realizado sem ponto central.

Tabela 4.1 – Condições dos ensaios dos planejamentos fatoriais para os dois pré-tratamentos.

Ensaio	T (h)	E (FPU/g de substrato)	S (% m/V)	PT	T (h)	C(FPU/g de substrato)	S (%)	PT
1	24	15	4,5	Não	-	-	-	-
2	72	15	4,5	Não	+	-	-	-
3	24	30	4,5	Não	-	+	-	-
4	72	30	4,5	Não	+	+	-	-
5	24	15	7,5	Não	-	-	+	-
6	72	15	7,5	Não	+	-	+	-
7	24	30	7,5	Não	-	+	+	-
8	72	30	7,5	Não	+	+	+	-
9	24	15	4,5	Sim	-	-	-	+
10	72	15	4,5	Sim	+	-	-	+
11	24	30	4,5	Sim	-	+	-	+
12	72	30	4,5	Sim	+	+	-	+
13	24	15	7,5	Sim	-	-	+	+
14	72	15	7,5	Sim	+	-	+	+
15	24	30	7,5	Sim	-	+	+	+
16	72	30	7,5	Sim	+	+	+	+

T: tempo (h); E: carga enzimática (FPU/g de substrato); S: carga de sólidos (%); PT: pré-tratamento.

4.4 PRÉ-TRATAMENTO

Para o processo com pré-tratamento físico, foi utilizada a metodologia descrita por Rocha *et al.* (2014). O papel foi cortado em tiras de 2 cm de largura e em seguida moído. A moagem foi realizada no Laboratório de Bioprocessos/Biocombustíveis, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (LABIO/CETENE). O material foi processado em macro moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (Marconi MA 680), do Laboratório

de Bioprocessos/Biocombustíveis, do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (LABIO/CETENE), e selecionado em granulometria de 10 mesh.

No pré-tratamento químico, o material foi cortado em círculos de 5 mm de diâmetro, com o auxílio de um furador de papel, para os processos com pré-tratamento ácido. Em um erlenmeyer de 125 mL contendo o papel de escritório descartado, nas proporções descritas na Tabela 4.1, foram adicionados 50 mL de solução de ácido sulfúrico (1% v/v). Os sistemas foram mantidos em mesa incubadora rotativa por um período de 3 horas, a temperatura de 50°C, a 50 rpm. Após o pré-tratamento, a suspensão foi filtrada em papel de filtro faixa preta. A porção sólida foi reservada para os processos de sacarificação (ROCHA *et al.*, 2014).

4.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O papel, após pré-tratamento químico ou pré-tratamento físico, sofreram, individualmente, o processo de hidrólise enzimática adicionando-se a um Erlenmeyer de 125 mL, contendo o papel, 50 mL de solução tampão de citrato de sódio (pH 4,8), previamente estéreis. A todos os ensaios adicionou-se enzima beta-glucosidase na proporção de 1% do volume adicionado da enzima Celluclast. O sistema foi mantido em mesa incubadora rotativa a 50 °C e 150 rpm, por um período de acordo com as condições do planejamento (Tabela 4.1).

A Figura 4.2 apresenta o fluxograma geral do processo completo.

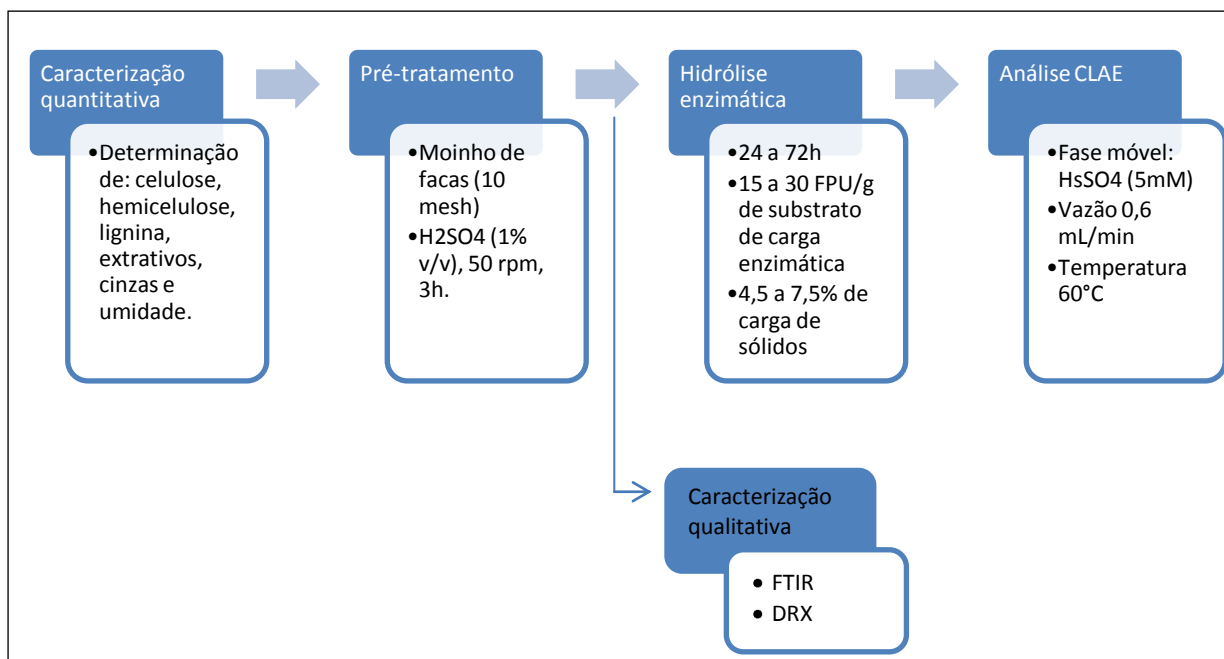


Figura 4.2 - Fluxograma geral dos pré-tratamentos físico e químico e das análises realizadas.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

As concentrações de celobiose e glicose foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Aminex HPX-87H⁺ (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) em um cromatógrafo da SHIMADZU (LC 20AD), a 60°C e detecção por índice de refração. Foram realizadas injeções de 20 µL, a vazão de 0,6 mL/min, utilizando como fase móvel H₂SO₄ a 5mM.

As alterações na estrutura química composicional do material após pré-tratamento físico e após pré-tratamento químico foram analisadas via espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transmission Infrared* – FTIR), em espectrofotômetro Burker (Vertex 70), seguindo a metodologia ATR (Reflexão Total Atenuada) com a utilização de um cristal de Germânio. Enquanto a alteração na cristalinidade proporcionada pelo pré-tratamento foi determinada por difração de raios X (DRX).

O índice de cristalinidade de cada amostra foi calculado através da Equação 4.7, que caracteriza o método *XRD height* (OUDIANI, 2011).

$$IC (\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} * 100 \quad \text{Equação 4.7}$$

Onde I_{002} é o valor da intensidade do pico 002, determinado pelo pico referente ao ângulo $2\theta = 22^\circ$; e I_{am} é a intensidade da massa amorfa, referente ao pico referente ao ângulo $2\theta = 18,5^\circ$.

Tanto as análises via espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transmission Infrared – FTIR*), quanto as análises de difração de raios X (DRX), foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.7 TRATAMENTO DOS DADOS

Utilizou-se o software Statistica 7.0 para analisar os efeitos dos fatores na concentração de glicose. Os resultados foram ajustados a um modelo polinomial linear como exibido na Equação 4.8, na qual β representa os valores dos efeitos de cada fator, enquanto o y refere-se à concentração de glicose obtida no ensaio.

$$Y(\%) = \frac{C * V}{m} * 100\% \quad \text{Equação 4.8}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO

A composição do material anterior aos processos de pré-tratamento pode ser visualizada na Tabela 5.1, que mostra também a semelhança dos resultados com as análises realizadas no estudo de Wang *et al.* (2012) e Wu *et al.* (2001).

Tabela 5.1 – Composição percentual de papel de escritório descartado.

Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas	Fonte
63,11	14,38	2,08	2,20	9,96	Presente trabalho
58,64	14,65	6,09	1,97	7,97	Wang <i>et al.</i> (2012)
66,3	13	0,93	n.i.	n.i.	Wu <i>et al.</i> (2001)

n.i. – não informado.

Após o processo de pré-tratamento físico e de pré-tratamento químico, foram realizadas análises qualitativas para identificar quais alterações ocorreram nas cadeias dos principais componentes do material: celulose, hemicelulose e lignina. A técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é bastante utilizada para a investigação de materiais lignocelulósicos, por fornecer resultados rápidos e precisos a respeito da identificação de alterações nos grupos funcionais e ligações dos componentes de maneira não destrutiva (ABIDI *et al.*, 2014; RONI MARYANA, 2014; WAN *et al.*, 2015).

As Figuras 5.1 a 5.4 mostram os espectros de FTIR para o material com pré-tratamento físico e com pré-tratamento químico com carga de sólidos igual a 4,5; 6; e 7,5% m/V, respectivamente. As alterações no espectro foram observadas em nove picos nas quatro amostras. Na Figura 5.5, onde se pode visualizar a alteração das absorbâncias dos picos entre as quatro amostras, observa-se que a variação carga de sólidos no pré-tratamento químico foi de baixa influência para o processo. Já a diferença de intensidade entre os materiais com pré-tratamento químico (Figuras 5.2 a 5.4) e com pré-tratamento físico (Figura 5.1) destaca-se para os picos 2 e 6, referentes ao estiramento assimétrico das ligações C – O – C, da celulose e da hemicelulose e ao estiramento das ligações O – H da lignina, respectivamente (XU *et al.*, 2013; WAN *et al.*, 2015).

Segundo Campos *et al.* (2013), tais alterações ocorrem porque, no pré-tratamento ácido, é verificada a desidratação da molécula de celulose, permitindo a solubilização da hemicelulose no ácido e desestabilizando assim a fibra celulósica. Tais resultados levam à conclusão de que o pré-tratamento foi eficiente tanto na desestruturação das cadeias de celulose e hemicelulose, quanto na redução da concentração da lignina.

Alterações menos acentuadas são observadas para o pico 3, referente à flexão C – H da celulose cristalina, para o pico 4, que indica variação do grupo CH₂, presente na celulose e na hemicelulose, para os picos 5, 8 e 9, que indicam deformação de C – H, estiramento C – H e O – H da lignina, e para o pico 7, que indica a liberação de ésteres presentes na molécula de hemicelulose (XU *et al.*, 2013).

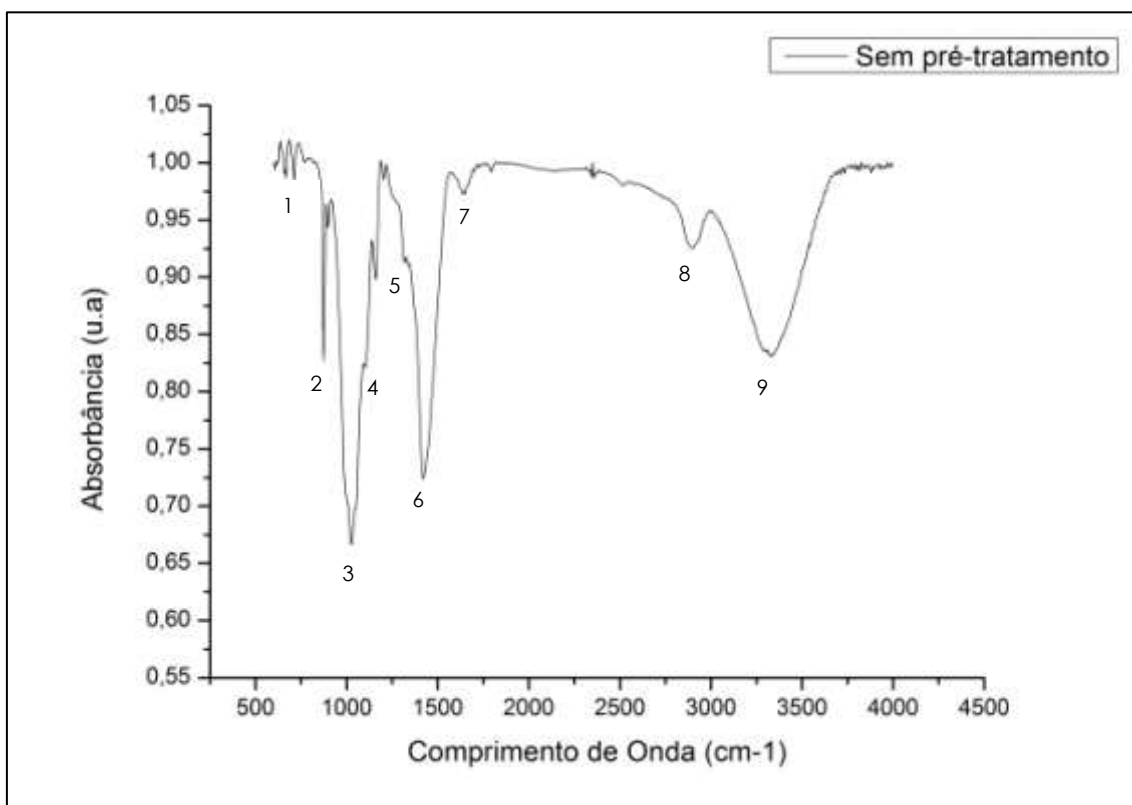


Figura 5.1 – Espectro de FTIR para papel com pré-tratamento físico.

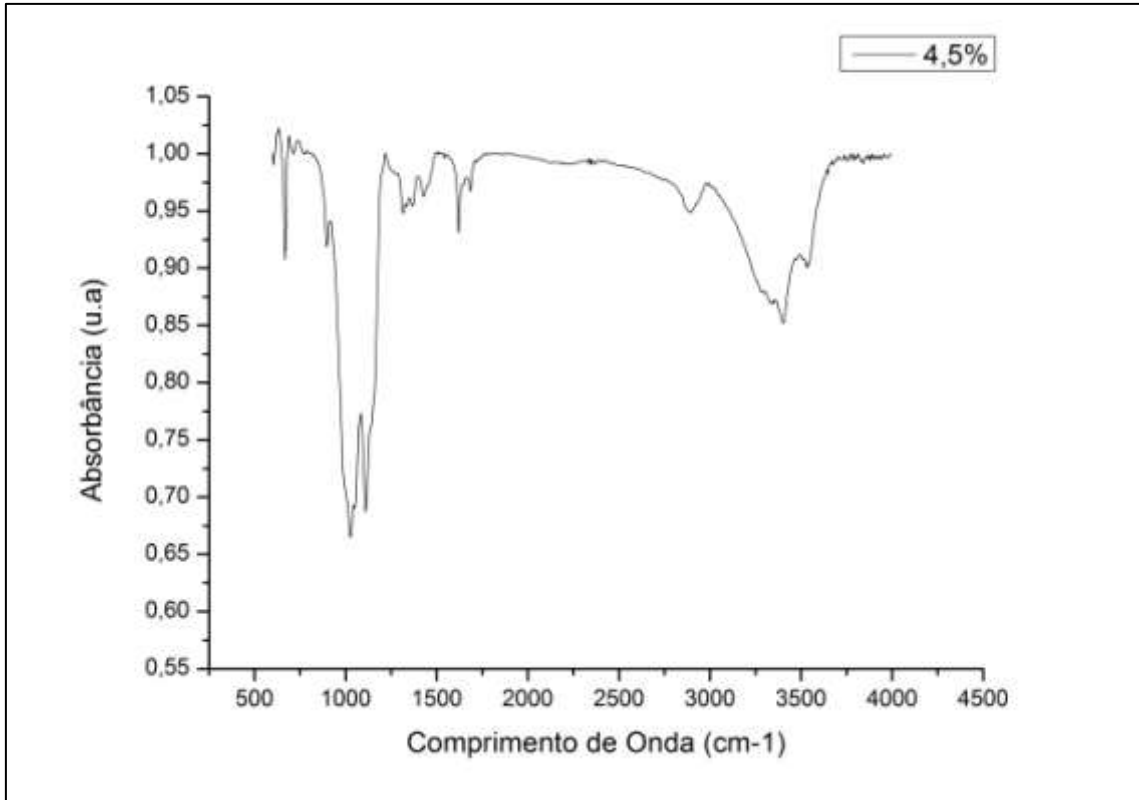


Figura 5.2 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 4,5% m/V.

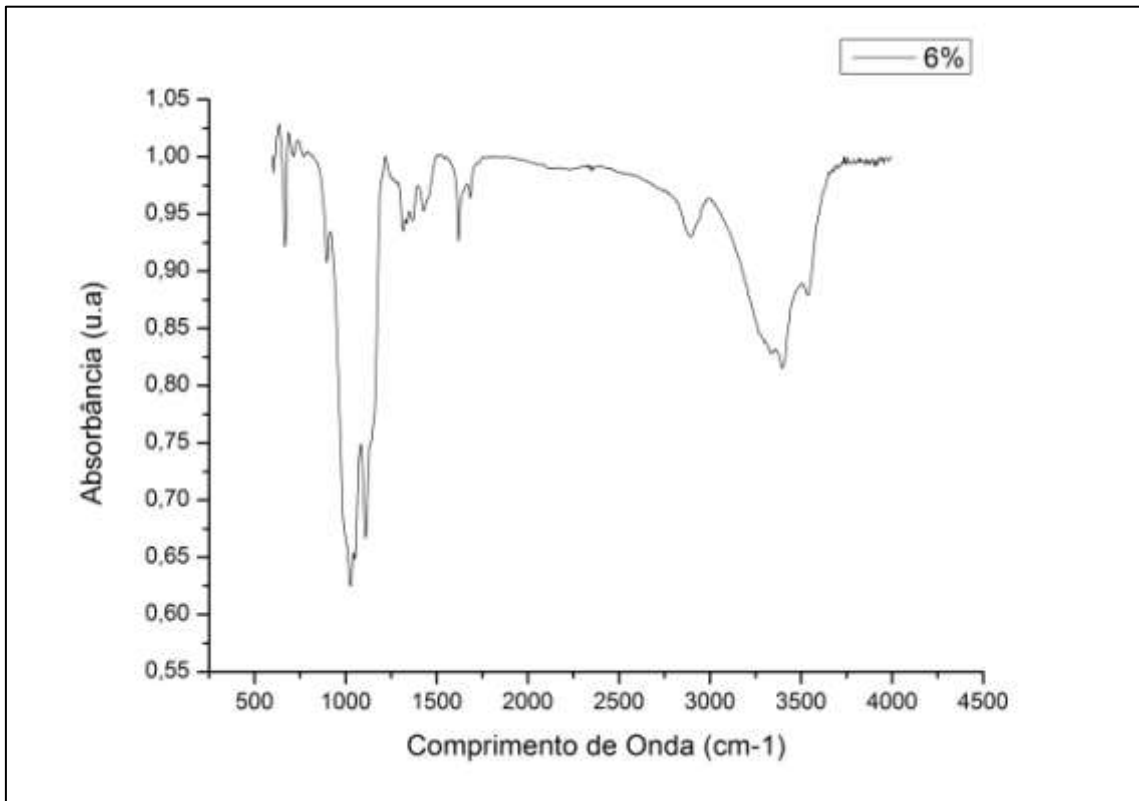


Figura 5.3 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 6% m/V.

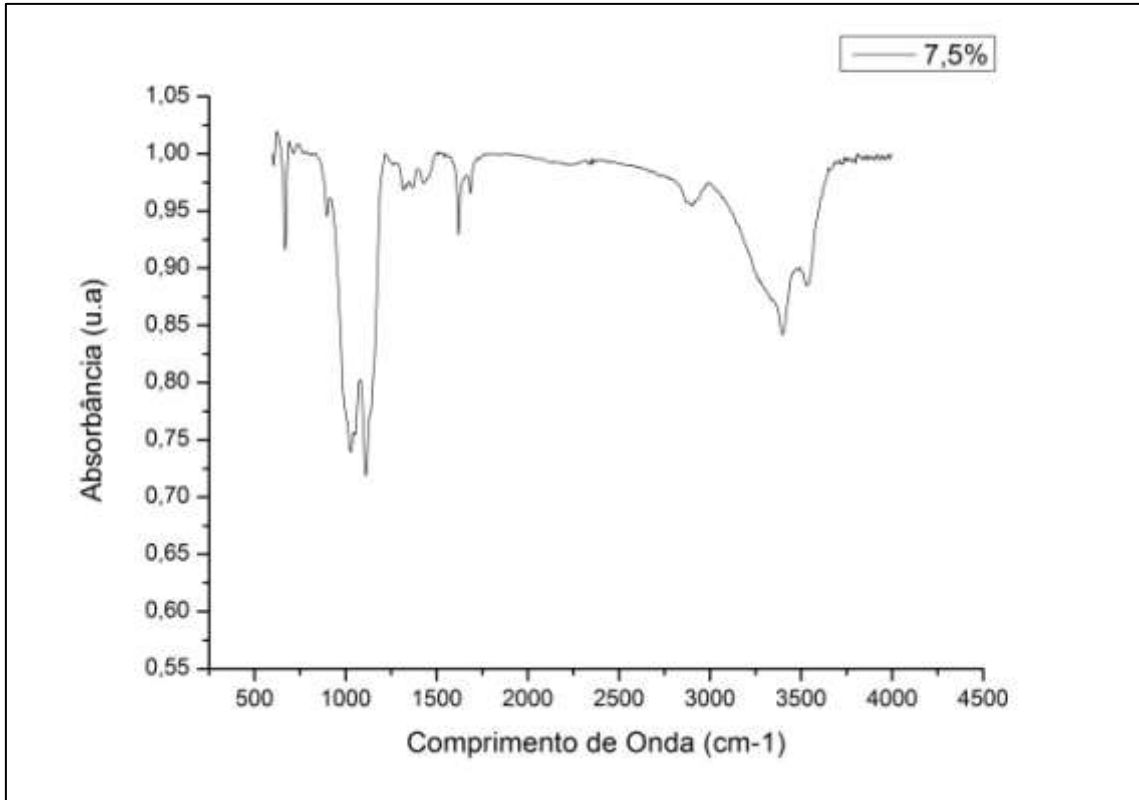


Figura 5.4 – Espectro de FTIR para papel pré-tratado com carga de sólidos de 7,5% m/V.

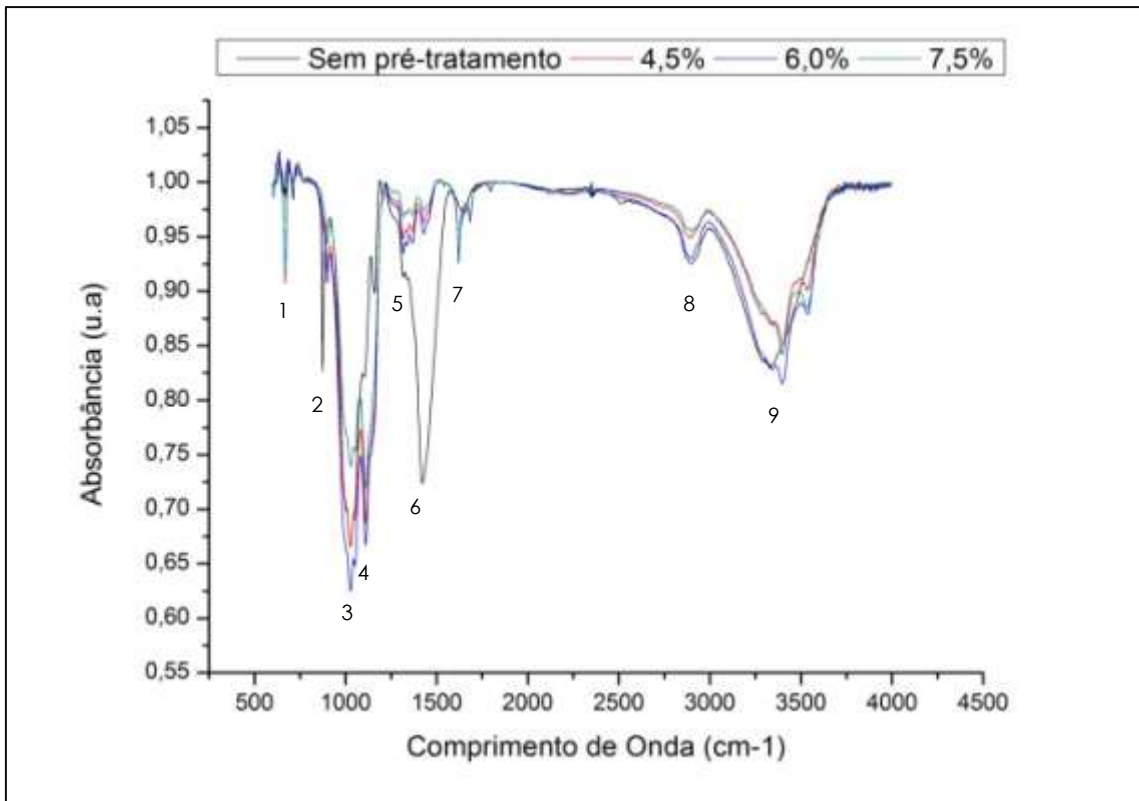


Figura 5.5 – Comparação de espectros de FTIR para papel não pré-tratado e papeis pré-tratados com diferentes cargas de sólidos.

As Figuras 5.6 a 5.9 mostram os espectros de difração de raios-x para a amostra com pré-tratamento físico e para as amostras pré-tratadas em diferentes proporções de massa de papel para volume de ácido sulfúrico diluído. Por meio dos gráficos é possível calcular o índice de cristalinidade de cada amostra.

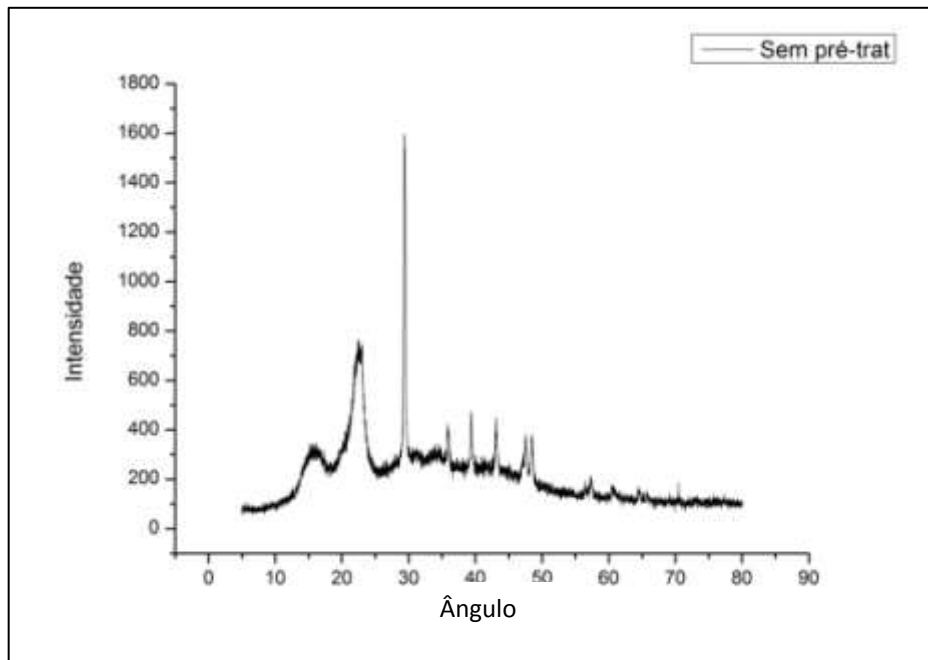


Figura 5.6 – Espectro de DRX para papel com pré-tratamento físico.

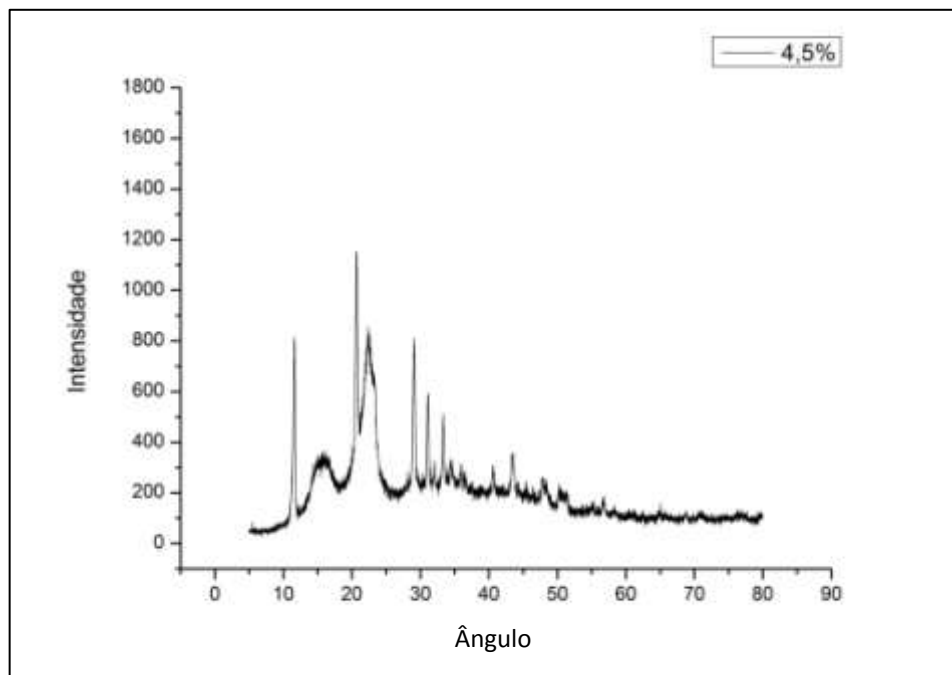


Figura 5.7 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 4,5%.

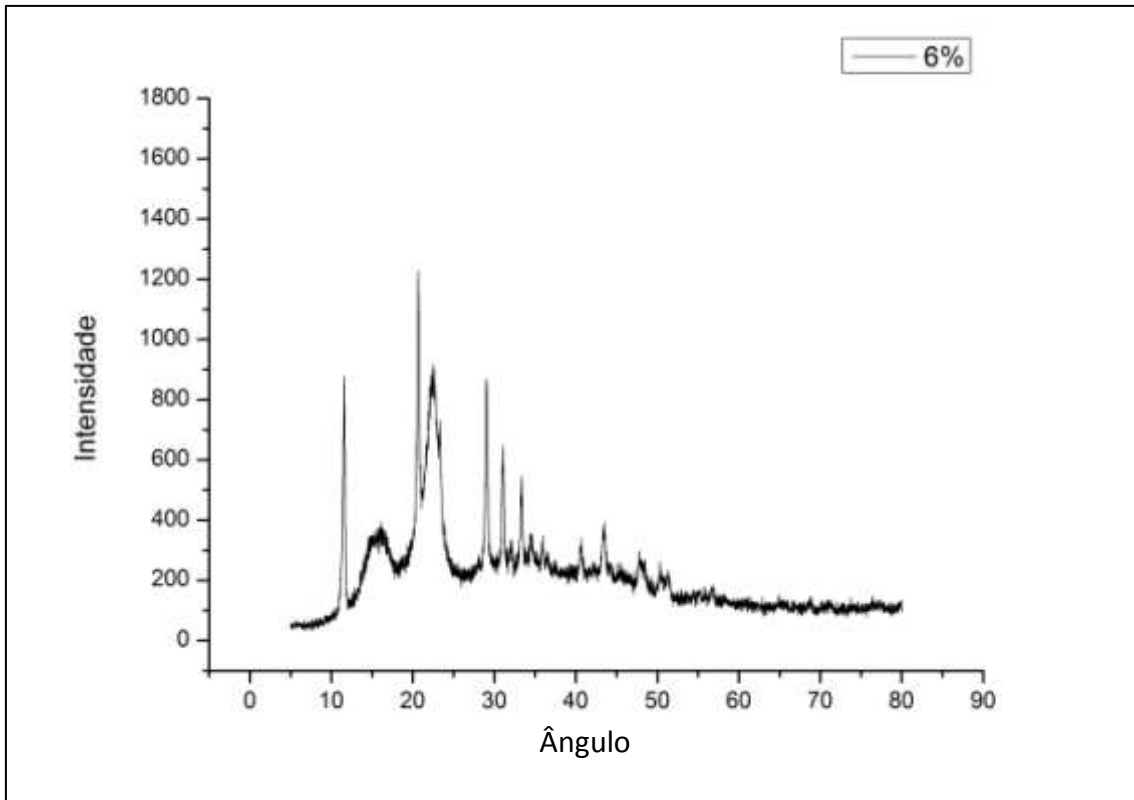


Figura 5.8 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 6%.

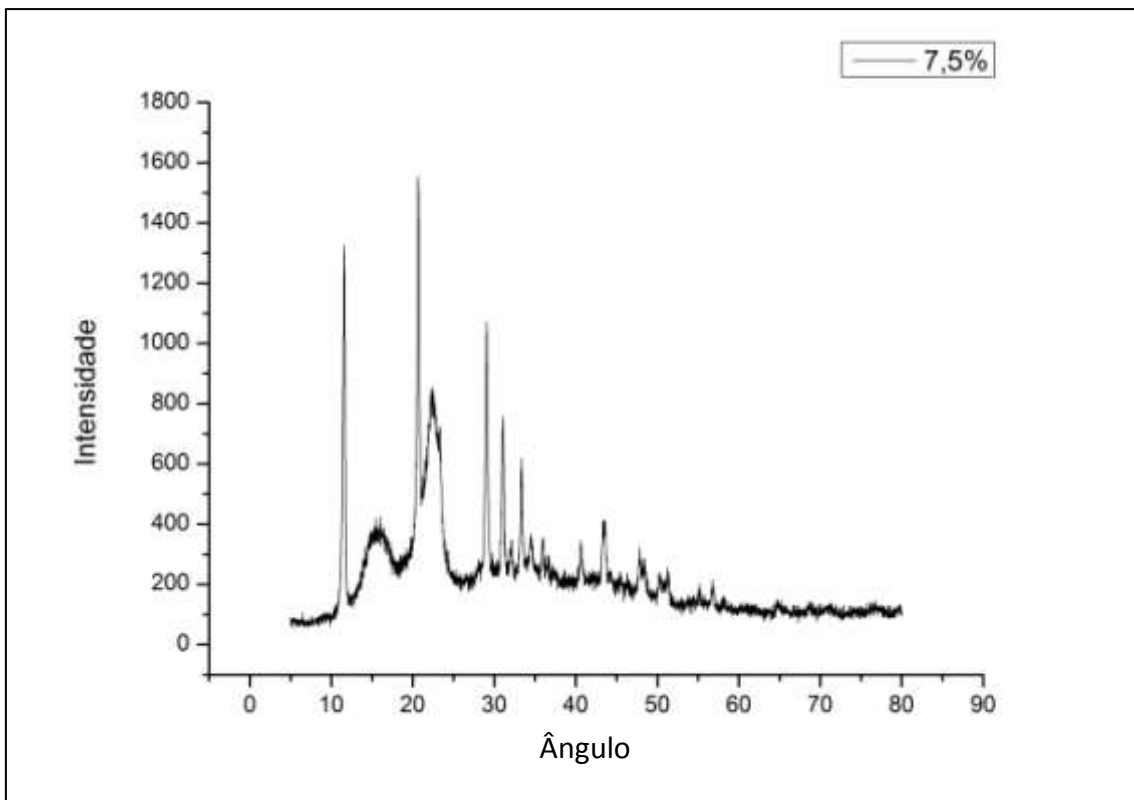


Figura 5.9 – Espectro de DRX para papel pré-tratado com carga de sólidos de 7,5%.

A Tabela 5.2 mostra o valor resultante do índice de cristalinidade das mesmas. Verifica-se aumento do índice de cristalinidade à medida que a carga de sólidos no processo aumenta, porém, a variação é muito pequena a partir de 6%, como também pode ser visualizado na Figura 5.10.

Tabela 5.2. Cristalinidade do material.

Amostra	Cristalinidade
Pré-tratamento físico (A)	66,37
4,50% m/V (B)	65,74
6,00% m/V (C)	67,61
7,50% m/V (D)	67,71

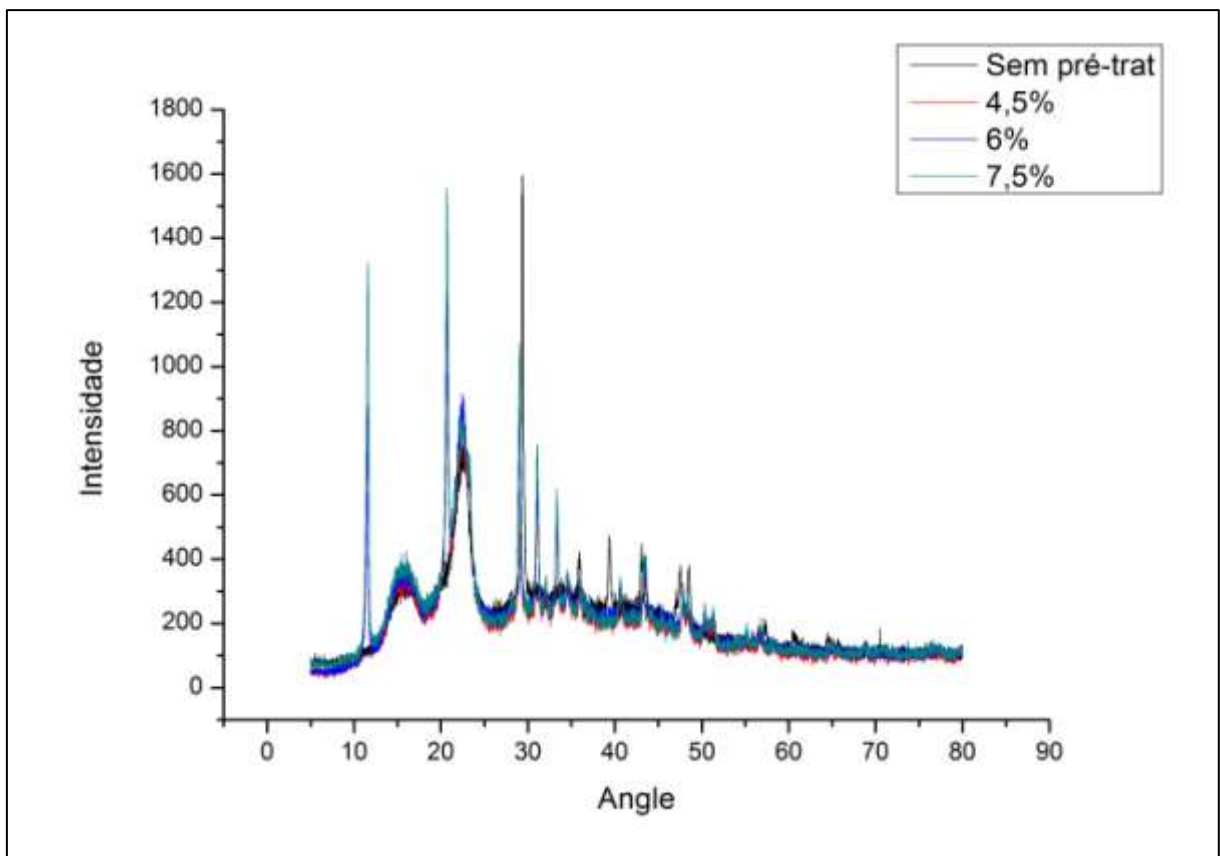


Figura 5.10 – Comparação dos espectros de DRX para amostras com pré-tratamento físico e pré-tratamento químico.

Já após o pré-tratamento com carga de 4,5%, verifica-se redução da cristalinidade em relação ao material não pré-tratado, o que pode significar que, a baixas cargas de sólido, o material fica mais vulnerável à degradação parcial da estrutura cristalina. Enquanto o aumento

no índice de cristalinidade indica redução na concentração de compostos amorfos, como a lignina, e das regiões não cristalinas da celulose (MARIANO, 2013).

Os índices de cristalinidade foram analisados no Origin 6.0 para análise de significância. As análises comparativas foram realizadas simultaneamente para as quatro amostras; entre as amostras A e B; A e C; A e D; B e C; B e D; e C e D. Para nível de confiança igual a 0,05, todas as análises demonstraram variância significativa entre si.

De acordo com os resultados de ambas as análises, conclui-se que o pré-tratamento químico agiu com maior eficiência na alteração da estrutura do material, o que pode significar um melhor desempenho das amostras pré-tratadas com ácido sulfúrico no processo de hidrólise enzimática, em relação às amostras pré-tratadas apenas por meio de pré-tratamento físico.

A literatura mostra que o pré-tratamento físico por meio da moagem do material é eficiente quando aliada a pré-tratamentos que possam complementá-lo, ou ainda quando o processo é realizado durante longo período, o que pode torna-lo economicamente inviável. Lengowski *et al.* (2013), estudaram a redução do índice de cristalinidade da celulose após o tratamento de celulose Kraft de *Eucalyptus* spp. em moinho de bolas de zircônia e de cerâmica. Verificou-se que após 48h de moagem, houve redução de 60% da cristalinidade da celulose. Por outro lado, o pré-tratamento com ácido sulfúrico concentrado a 35% v/v foi capaz de reduzir 89% da cristalinidade em apenas 5h.

Por outro lado, Wang *et al.* (2012), estudando a hidrólise enzimática de papel não pré-tratado e pré-tratado apenas por meio da agitação do mesmo em água, durante 10 minutos, obtiveram resultados satisfatórios na obtenção de açúcares. Logo, embora fosse esperada maior eficiência dos processos com pré-tratamento químico, foi dada a continuidade dos experimentos para ambos os casos.

5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A Tabela 5.3 mostra os valores das respostas de cada ensaio, em forma de concentração (C) de glicose e celobiose. Para o planejamento com pré-tratamento físico –

ensaios 1 a 8 – obteve-se maior concentração de glicose para os ensaios 3 e 7 (0,45 g/L), enquanto no ensaios com pré-tratamento ácido – ensaios 9 a 16 –, o experimento 13 apresentou a maior concentração de glicose, 23,21 g/L.

Tabela 5.3 – Ensaios do planejamento.

Ensaios	Fatores				C (g/L)	
	T (h)	E(FPU/g de substrato)	S (%)	PT	Glicose	Celobiose
1	24	15	4,5	Não	0,15	0
2	72	15	4,5	Não	0,16	0
3	24	30	4,5	Não	0,45	0
4	72	30	4,5	Não	0,24	0
5	24	15	7,5	Não	0,24	0
6	72	15	7,5	Não	0,24	0
7	24	30	7,5	Não	0,46	0,16
8	72	30	7,5	Não	0,42	0,23
9	24	15	4,5	Sim	7,60	0
10	72	15	4,5	Sim	8,69	0
11	24	30	4,5	Sim	13,37	0,18
12	72	30	4,5	Sim	16,88	0
13	24	15	7,5	Sim	23,21	0,69
14	72	15	7,5	Sim	22,39	0
15	24	30	7,5	Sim	14,54	0
16	72	30	7,5	Sim	13,91	0

T: tempo (h); E: carga enzimática (FPU/g de substrato); S: carga de sólidos (%);

PT: pré-tratamento.

Comparando-se os ensaios com pré-tratamento físico (1 a 8) e os ensaios com pré-tratamento químico (9 a 16), os últimos apresentaram os melhores resultados, tanto em termos de concentração de glicose, quanto de celobiose. Os experimentos com pré-tratamento físico apresentaram concentrações de no máximo 0,46 g/L para a concentração de glicose, demonstrando, quando comparados aos ensaios com pré-tratamento químico, que este pré-tratamento foi essencial para tornar a molécula de celulose acessível às enzimas, resultado de acordo com as análises de FTIR e DRX. Os baixos valores de concentração de celobiose

demonstram que a carga de β -glucosidase utilizada foi satisfatória para a conversão de celobiose a glicose.

Fixando-se os níveis de carga enzimática e de sólidos, além do método utilizado para pré-tratamento químico, verifica-se que o prolongamento do tempo de hidrólise, de 24 para 72h, forneceu baixa elevação da concentração da glicose nos ensaios com baixa carga de sólidos (ensaios 9 e 10 e ensaios 11 e 12), enquanto nos ensaios com alta carga de sólidos, a concentração de glicose não sofreu alteração (ensaios 13 e 14 e ensaios 15 e 16). Chu e Feng (2013) e Guerfali *et al.* (2014) estudaram o efeito do tempo de hidrólise enzimática de papel de escritório e de jornal, variando de 4 a 20h e de 20 a 40h, respectivamente, e obtiveram variação positiva da sacarificação dos dois tipos de papel.

O aumento da carga enzimática, de 15 a 30 FPU/g de substrato, ao fixar os níveis de tempo, carga de sólidos e pré-tratamento químico, também elevou a concentração de glicose nos ensaios 9 a 12, correspondendo ao esperado de acordo com a literatura. Wang *et al.* (2012) também verificaram aumento da concentração de glicose variando a carga enzimática de 5 a 30 FPU/g, tanto para processo sem pré-tratamento, quanto para processo com pré-tratamento em água. Dússan *et al.* (2014) estudaram a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico (1% m/v), que também resultou em favorecimento do processo devido ao aumento da carga enzimática.

Ao aumentar a massa de papel, como nos experimentos 9 e 13 e nos experimentos 10 e 14, quando fixados os níveis de enzima, tempo e pré-tratamento químico, a concentração de glicose foi favorecida, uma vez que, uma maior quantidade de papel fornece, conseqüentemente, uma maior concentração de celulose. Já nos ensaios 11 e 15 e nos ensaios 12 e 16, a concentração de glicose permaneceu praticamente inalterada diante do aumento da carga de sólidos.

Rocha *et al.* (2014), estudando diferentes concentrações de papel durante a hidrólise enzimática, evidenciaram aumento da concentração de glicose juntamente com a elevação da carga enzimática, porém com diminuição do rendimento de glicose, que reduziu cerca de 50% ao elevar a concentração de papel de escritório de 2% para 10% e manter a concentração enzimática a 2% para Celluclast 1,5L e 1% para Novozyme 188. Já nos ensaios 1 a 8 (com pré-tratamento físico) a concentração não apresentou variação significativa, visto que a

enzima não foi eficiente na ausência de pré-tratamento nem mesmo nos casos com baixa carga de sólidos.

Com intuito de confirmar as observações realizadas por meio dos resultados da Tabela 5.4, realizaram-se o tratamento de dados estatísticos para o planejamento.

A Figura 5.11, onde p confirma as deduções realizadas de acordo com a Tabela 5.3 para os ensaios, enquanto a Tabela 5.4 mostra os valores dos efeitos dos fatores e seus coeficientes de regressão. A concentração de glicose é beneficiada pelo aumento da carga de papel (x3, efeito igual a 3,48) e, em menor proporção, pelo aumento de tempo (x1, efeito igual a 0,36). Por outro lado, o aumento da concentração de enzimas (x2, efeito igual a -0,30) desfavorece levemente a produção de glicose. Entretanto, apenas o fator pré-tratamento (x4, efeito igual a 14,78) apresentou efeito significativo, como esperado diante da elevada variação de concentração previamente visualizada na Tabela 5.3.

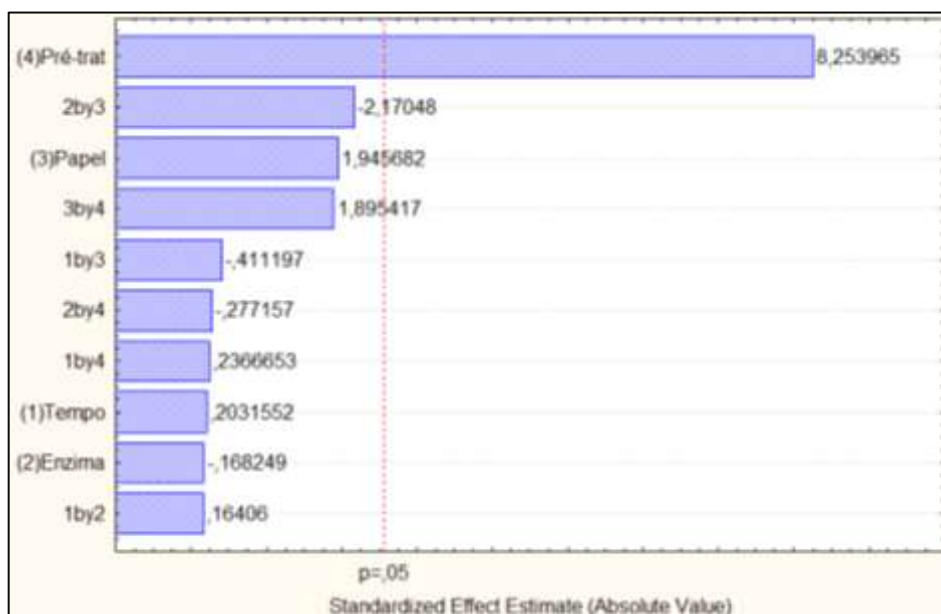


Figura 5.11 – Diagrama de Pareto para planejamento experimental 2^4 .

Tabela 5.4 – Efeitos dos fatores, coeficientes de regressão e erros padrão do modelo.

Fator	Efeitos dos Fatores	Coefficientes de Regressão	Erro Padrão	t	p
Média	7,68	7,68	0,89	8,58	<0,01
Tempo (1)	0,36	0,18	1,79	0,20	0,85
Enzima (2)	-0,30	-0,15	1,79	-0,17	0,87
Carga de sólidos (3)	3,48	1,74	1,79	1,94	0,11
Pré-tratamento (4)	14,78	7,39	1,79	8,25	<0,01

Como apenas os ensaios com pré-tratamento resultaram em respostas satisfatórias, deu-se prosseguimento apenas para o tratamento de dados estatísticos dos ensaios 9 a 16 acrescidos do ponto central em triplicata apresentado na Tabela 5.5, tendo sido os níveis destes definidos pela média entre os níveis superior e inferior, como resultado de um planejamento 2^3 .

Tabela 5.5 – Ensaios do ponto central do planejamento.

Ensaio	Fatores						C (g/L)	
	T(h)	E (FPU/g de substrato)	S(%)	x1	x2	x3	Glicose	Celobiose
17	48	22,5	6	0	0	0	16,63	0,14
18	48	22,5	6	0	0	0	14,35	0,25
19	48	22,5	6	0	0	0	16,60	0,14

T: tempo (h); E: carga enzimática (FPU/g de substrato); S: carga de sólidos (%); PT: pré-tratamento.

A Figura 5.12 mostra o diagrama de Pareto para o planejamento 2^3 com ponto central, indicando significância para a carga de sólidos e para a interação da mesma com a carga enzimática. A Tabela 5.6 indica os efeitos e coeficientes obtidos para as concentrações de glicose do mesmo, no qual o papel e a interação entre papel e enzima foram os fatores significativos.

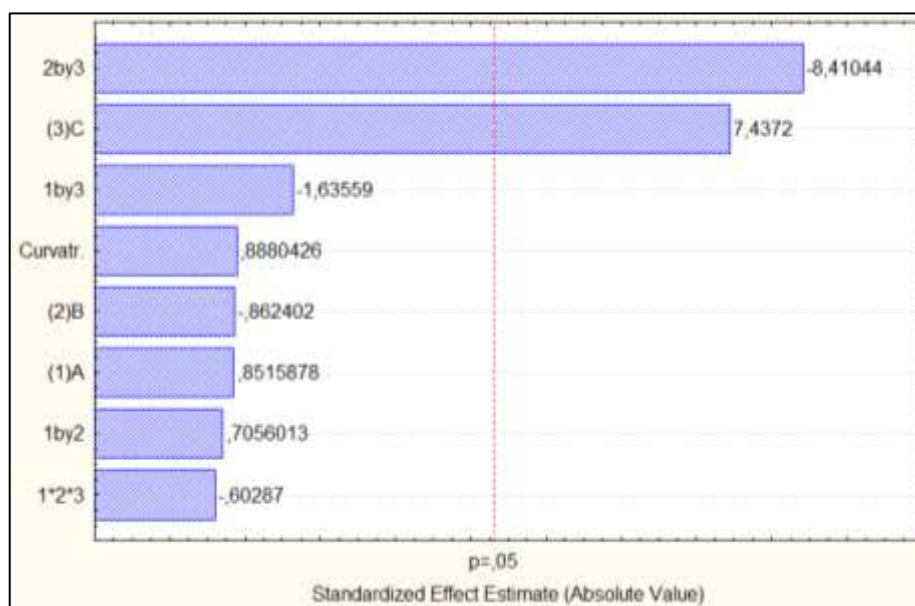


Figura 5.12 – Diagrama de Pareto para planejamento experimental 2^3 .

Tabela 5.6 – Efeitos dos fatores e coeficientes de regressão do modelo.

Fator	Efeitos dos fatores	Coeficientes de regressão	Erro Padrão	t	p
Curvatura	1,57	0,79	0,46	32,60	<0,01
Média	15,07	15,74	1,77	0,89	0,47
Tempo (1)	0,79	0,39	0,92	0,85	0,48
Enzima (2)	-0,79	-0,39	0,92	-0,86	0,48
Papel (3)	6,88	3,44	0,92	7,44	0,02
1 e 2	0,65	0,33	0,92	0,70	0,55
1 e 3	-1,51	-0,76	0,92	-1,63	0,24
2 e 3	-7,78	-3,89	0,92	-8,41	0,01

1: tempo (h); 2: carga enzimática (FPU/g de substrato); 3: carga de sólidos (%); 4: pré-tratamento.

As Figuras 5.13 a 5.15 ilustram as respostas para o planejamento, que demonstram estar de acordo com as observações realizadas com a Tabela 5.3: baixa influência do tempo tanto na presença de alta, quanto de baixa carga enzimática (Figura 5.13) e carga de sólidos (Figura 5.14); baixa influência da carga enzimática em relação ao tempo (Figura 5.13); alta influência da carga de sólidos, independente do tempo de hidrólise (Figura 5.14); e alta influência da carga enzimática (Figuras 5.14 e 5.15), sendo a mesma positiva para baixa carga de sólidos e negativa na presença de alta carga de sólidos, confirmando a significância da interação das duas variáveis, carga de sólidos e carga enzimática.

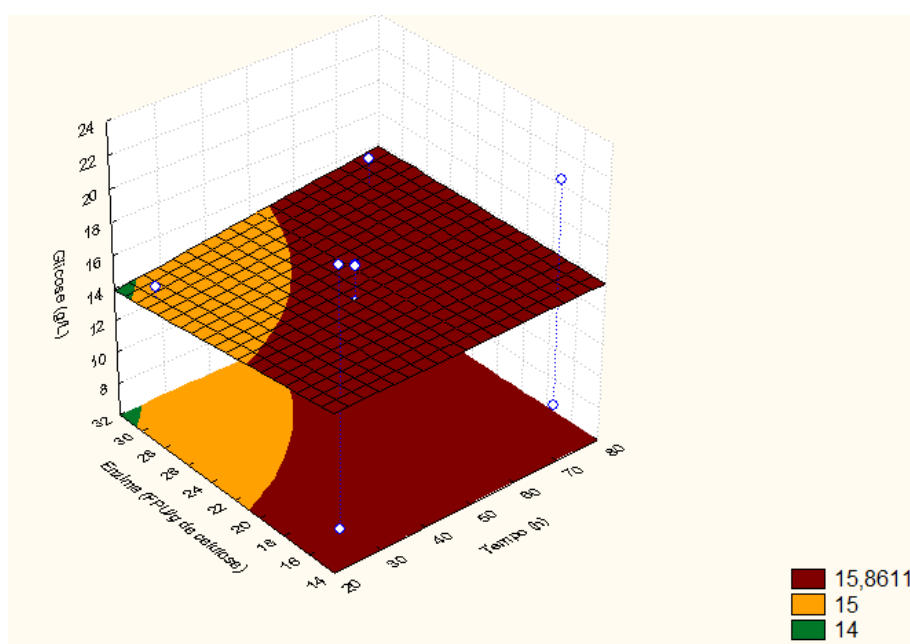


Figura 5.13 – Superfície de resposta para influência do tempo e da carga enzimática na concentração de glicose.

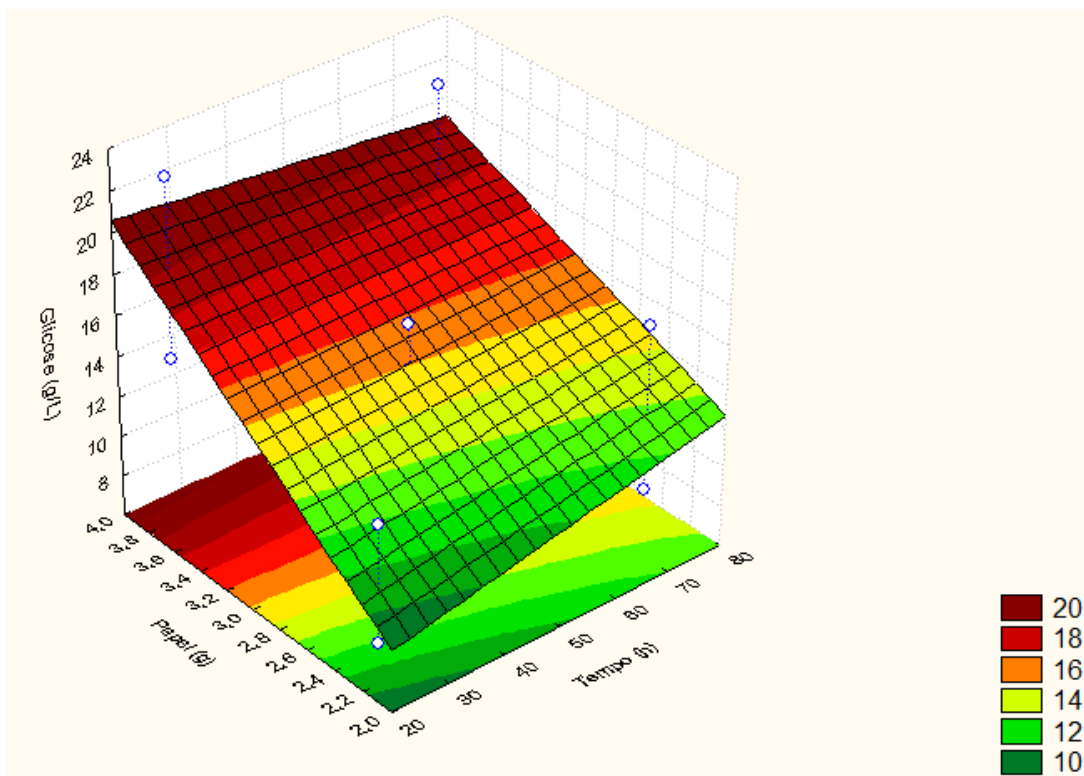


Figura 5.14 – Superfície de resposta para influência do tempo e da carga de sólidos na concentração de glicose.

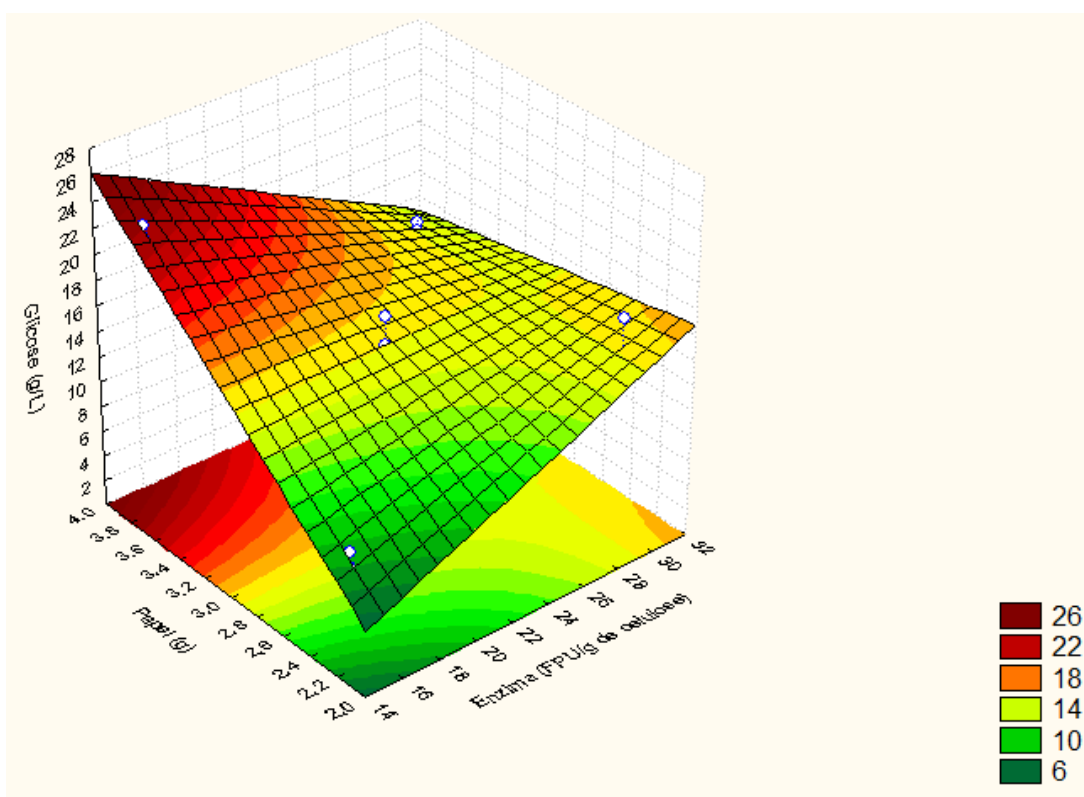


Figura 5.15 – Superfície de resposta para influência da carga enzimática e da carga de sólidos na concentração de glicose.

O valor do coeficiente de determinação, R^2 , foi de 0,9851, o que indica que 98,51% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, e, portanto, o ajuste do modelo linear aproxima-se do adequado, uma vez que o valor do coeficiente não está distante do seu máximo. A Equação 5.1 representa o modelo do planejamento estudado, onde o y representa a resposta, concentração de glicose (g/L), e x_1 , x_2 e x_3 representam o tempo, a carga enzimática e a carga de sólidos, respectivamente.

$$y = 15,07 + 0,39x_1 - 0,39x_2 + 3,44x_3 + 2,93x_1x_2 + 0,77x_1x_3 - 5,49x_2x_3$$

Equação 5.1

5.3 ENSAIOS NA DIREÇÃO DE MÁXIMA INCLINAÇÃO

Visto que o gráfico de superfície não está alocado em torno do ponto ótimo, foram realizados novos ensaios direcionados de acordo com o modelo da Equação 5.1, que leva ao aumento do tempo de hidrólise (x_1), à redução de carga enzimática (x_2) e ao aumento da carga de sólidos (x_3) partindo do ponto central, com objetivo de encontrar o ponto central ideal para um novo planejamento.

Considerando os coeficientes dispostos na Tabela 5.4, foram realizados cálculos para deslocar o planejamento, seguindo o caminho da máxima inclinação, determinado pelos efeitos na proporção x_2/x_3 , igual a -0,11, e x_1/x_3 , igual a 0,11 (BARROS NETO *et al.*, 2001).

Os parâmetros dos ensaios referentes ao deslocamento, bem como suas respostas, foram dispostos na Tabela 5.7 e podem ser visualmente analisados por meio das Figuras 5.16 a 5.18. Verifica-se que as respostas aumentam até o ensaio 5', onde a concentração de glicose é máxima para os deslocamentos, e diminuem em seguida, indicando que o ponto ótimo está próximo das condições determinadas para o ensaio 5'.

Tabela 5.7 – Redirecionamento do planejamento com pré-tratamento químico.

Ensaio	x1	x2	x3	T (h)	E(FPU/g)	S(%)	Glicose (g/L)
1'	0,11	-0,11	1	50,7	21,6	7,5	12,39
2'	0,14	-0,14	1,25	51,4	21,4	7,875	13,94
3'	0,17	-0,17	1,5	52,1	21,2	8,25	14,52
4'	0,20	-0,20	1,75	52,8	21,0	8,625	16,31
5'	0,23	-0,23	2	53,5	20,8	9	25,08
6'	0,34	-0,35	3	56,2	19,9	10,5	21,33
7'	0,46	-0,46	4	59,0	19,0	12	17,9

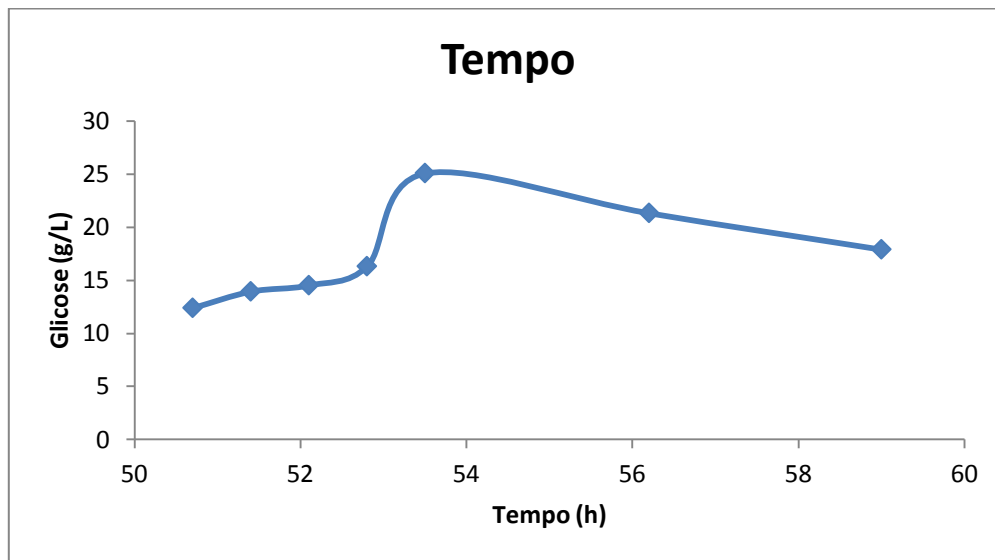


Figura 5.16 – Influência do tempo ao longo do caminho de máxima inclinação.

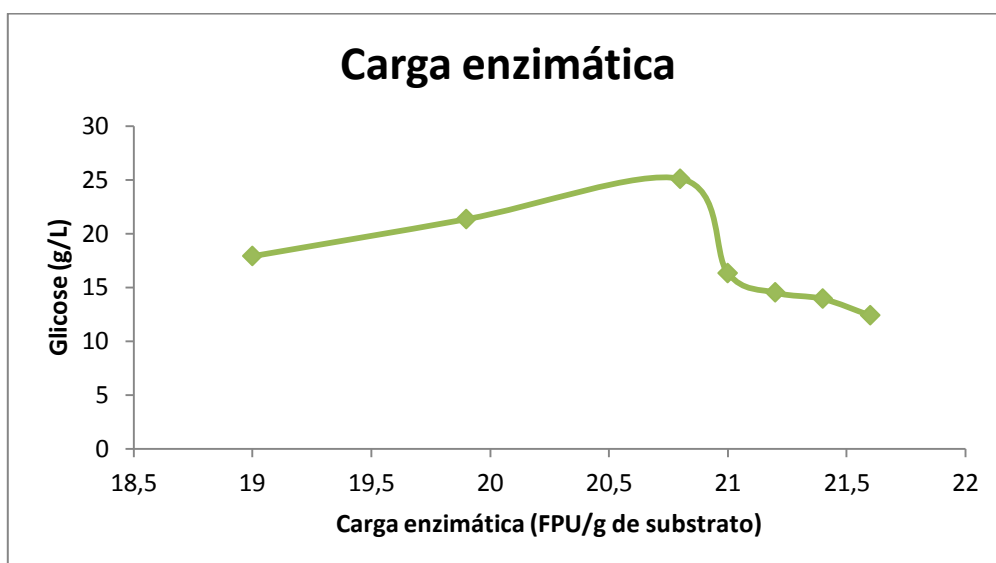


Figura 5.17 – Influência da carga enzimática ao longo do caminho de máxima inclinação.

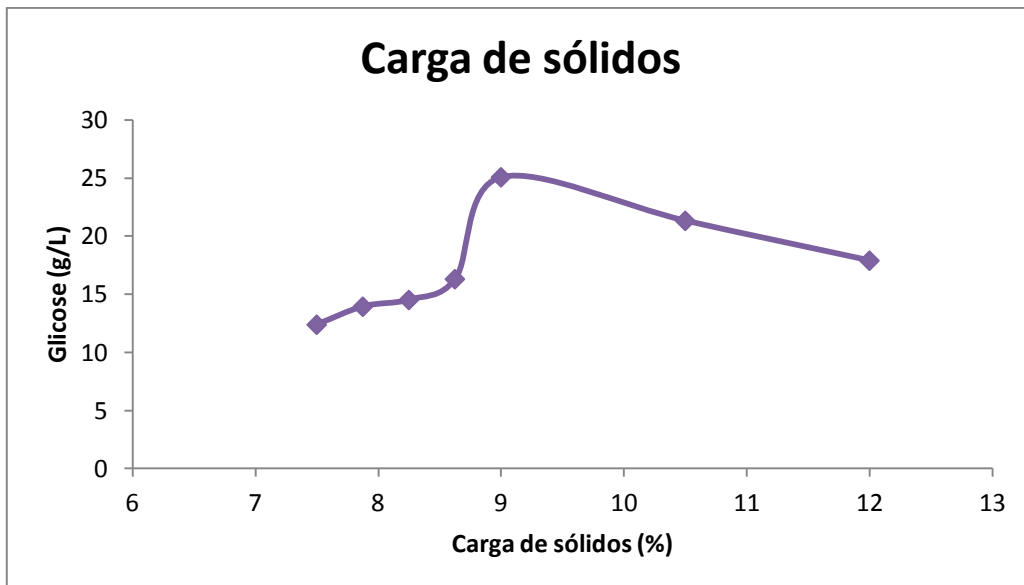


Figura 5.18 – Influência da carga de sólidos ao longo do caminho de máxima inclinação.

Os resultados indicam que um novo planejamento experimental 2^3 completo, desta vez com seus fatores tempo, carga enzimática e carga de sólidos centrados em 53,5 h, 20,8 FPU/g de substrato e 9%, respectivamente, geraria uma superfície de resposta com ponto central próximo ao ponto ótimo do planejamento, além de fornecer estimativas mais precisas acerca das variáveis estudadas. No entanto, diante de resultados mais satisfatórios na literatura, no qual outras faixas dos mesmos fatores foram estudadas, é interessante adicionar a análise de algumas variáveis ao processo, como agitação (ROCHA *et al.*, 2014) e uso de surfactante, que podem reduzir ainda mais a carga enzimática requerida pelo processo (CHU e FENG, 2013).

6 CONCLUSÕES

Os estudos mostraram que o pré-tratamento químico com ácido sulfúrico (1% v/v) foi essencial para os processos de hidrólise enzimática estudados. Com os dados obtidos nas análises é possível afirmar que a carga enzimática e a carga de sólidos são inversamente proporcionais, sendo o aumento da carga de sólidos o fator que favorece o experimento com maior intensidade em termos de concentração de glicose. Apesar do ponto ótimo não ter sido atingido na primeira área investigada, o deslocamento ao longo da superfície, na direção do caminho da máxima inclinação foi satisfatório para encontrar as condições ótimas das variáveis estudadas, produzindo 25,08 g/L de glicose ao utilizar 20,8 FPU/g de substrato, durante 53,5 horas em proporção sólido/líquido de 9%.

7 REFERÊNCIAS

ABIDI, N., CABRALES, L., HAIGLER, C. H. Changes in the cell wall and cellulose content of developing cotton fibers investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**. v. 100: p. 9-16, 2014.

AMBIENTE BRASIL. **Estatísticas de Reciclagem – Lixo**. Agosto, 2013. Disponível em: <[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/estatisticas de reciclagem/estatisticas de r eciclagem _ _lixo.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/estatisticas%20de%20reciclagem/estatisticas%20de%20reciclagem_-_lixo.html)>. Acessado em: 29/04/2014.

ANAP. **Relatório Anual 2013 – 2014**. Disponível em: <<http://www.anap.org.br/anuario-anap-2013/anap-relatorio-anual-2013-2014-v3/>> Acessado em: 12/02/2015.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965 p.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, J.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos**. 2ª ed. Campinas, São Paulo: Editora Unicamp, 2001. 401p.

BATTAN, B., SHARMA, J., DHIMAN, S., KUHAD, R. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41: p. 733-739, 2007.

BRACELPA. **Dados do Setor**. Março, 2012. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>. Acessado em: 15/04/2014.

_____. **Reciclagem de papel**. 2013. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/?q=node/172>>. Acessado em: 15/04/2014.

_____. **Dados do setor**. 2014. Disponível em: <<http://www.bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>>. Acessado em: 15/03/2015.

BRUMMER, V., JURENA T., HLAVACEK, V., OMELKOVA, J. BEBAR, L., GABRIEL, P., SETHLIK, P. Enzymatic hydrolysis of pretreated waste paper – Source of raw material for production of liquid biofuels. **Bioresource Technologic**., v. 152, p. 543–547, jan. 2014.

CAMPOS, L.M.A.; PONTES, L.A.M.; CARVALHO, L.S.; CHEMMÉS, C.S.; GARRIDO, C.V.S.; SILVA, F.C.; SANTOS, J.M.G.M.; LEAL, S.C.S.; MERCANDELLI, S.S.; SILVA, V.L. **Avaliação de Pré-tratamento do Bagaço de Cana-de-Açúcar com Ácido Diluído para Produção de Etanol de Segunda Geração**. 53º Congresso Brasileiro de Química. Rio de Janeiro, out. de 2013.

CARVALHO, E. A. e ALMEIDA, S. L. M. **Caulim e carbonato de cálcio: competição na indústria de papel**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, 1998. n. 1. 29 p.

CHU, K. H.; FENG, X. Enzymatic conversion of newspaper and office paper to fermentable sugars. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, p. 123–130, jan-mar. 2013.

DUARTE, H. C. – **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, 1989.

DUBEY, A.K.; GUPTA, P.K.; GARG, N.; NAITHANI, S. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 3. Abr. 2012. p. 825-829.

Dussan, K.J. ; SILVA, D. D. V. ; MORAES, E. J. C. ; ARRUDA, P. V. ; FELIPE, M. G. A. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose from sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38: p. 433-438, 2014.

EL-MANSI, E. M. T.; BRYCE, C. F. A.; DEMAIN, A. L.; ALLMAN, A. R. (Ed.). Fermentation microbiology and biotechnology. 2nd ed. Boca Raton: **CRC: Taylor & Francis**, 2007. 544 p.

ELLISTON, A., COLLINS, S., WILSON, D., ROBERTS, I., WALDRON, K. High concentrations of cellulosic ethanol achieved by fed batch semi simultaneous saccharification and fermentation of waste-paper. **Bioresource Technology**, v. 134: p. 117-126, 2013.

FLEURI, F. L., SATO, H. H. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.28, n. 2: p. 299-310, abr.-jun. 2008.

G1. **Vendas de gasolina sobem 7,1% no Brasil em 2014, diz ANP**. 2015. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/noticia/2015/02/vendas-de-gasolina-sobem-71-no-brasil-em-2014-diz-anp.html>>. Acessado em: 20/03/2015

GÁMEZ, S., GONZÁLES-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Study of the hydrolysis sugarcane bagasse using phosphoric acid at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v.74: p. 78-88, 2006.

GIL, N., GIL, C., AMARAL, M.E., COSTA, A.P. E DUARTE, A.P. Biorefinação – uso de enzimas no melhoramento da refinação de uma pasta kraft branqueada de *Eucalyptus globulus*. Encontro Nacional da TECNICELPA, Tomar, Portugal, 135-141, out. 2007.

GÍRIO, F. M., FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S., BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13: p. 4775-4800, 2010

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R. T., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, 2009.

GUERFALI, M., SAIDI, A., GARGOURI, A., BELGHITH, H. Enhanced Enzymatic hydrolysis of waste paper for ethanol production using separate saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 175, n. 1: p. 25-42, 2014.

GUTIERREZ, L.E.; ANNICCHINO, A.V.K.O.; LUCATTI, L. Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos. **An. Esc. Super. Agric. Luiz de Queiroz**, Piracicaba, v. 47, n. 2, 1990

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied microbial and cell physiology**. v. 94, n. 1: p. 205–214, 2012.

IBÁ. **Cenários Ibá**: Estatísticas da Indústria Brasileira de Árvores. Jan. 2015. Disponível em: <http://www.iba.org/shared/destaque/cenarios_janeiro_imprensa2015.pdf>. Acessado em: 05/03/2015.

INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA (IPEA). **Brasil perde R\$ 8 bilhões anualmente por não reciclar**. 2010. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=1170>. Acessado em: 17/04/2014.

KASAVI, C., FINORE, I., LAMA, L., NICOLAUS, B., OLIVER, S. G., TOKSOY, O. KIRDAR, B. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**. v. 45: p. 230-238, oct. 2012.

KLOCK, U., MUÑIZ, G. I. B., HERNANDEZ, J. A., ANDRADE, A. S. **Química da Madeira**, 3ª ed., Curitiba, 2005: Universidade Federal do Paraná.

LAGHI, I. **Cellulose with hydrogen bonds**. 2007. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cellulose-2D-skeletal_bonds.jpg. Acessado em: 01/08/2014.

LENGOWSKI, E.C., MUNIZ, G.I.B., NISGOSKI, S., MAGALHÃES, W.L.E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. **Scientia Forestalis**, v. 41: p. 185-194, 2013.

LONG, T. M.; SU, YI-KAL; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle- associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 78: p. 5492-5500, 2012.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARQUES, L., ALVES, L., ROSEIRO, J. C. e GÍRIO, F. M. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF andSSF using *Pichiastipites*. **Biomass and bioenergy**. V. 32, 2008. p. 400 – 406

MARIANO, M. **Obtenção, caracterização e aplicação de nanocristais de celulose obtidos a partir do sisal**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

O ESTADO DE SÃO PAULO. **Reciclar papel pode ter impacto negativo para o meio ambiente** – Estudo mostra que produção do papel reciclado pode gerar até seis vezes mais efluentes que a do papel branco. 07 de maio de 2008.

OGEDA, T. L.e PETRI, D. F. S.. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.7: p. 1549-1558, 2010.

O PAPEL. Nordeste atrai novos investimentos em celulose. Ano LXXI nº3, mar. 2010.

_____. Biorrefinaria Industrial. Ano LXXII nº3, mar. 2011.

OUDIANI, A. El; CHAABOUNI, Y.; MSAHLI, S. e SAKLI, F. Crystal transition from cellulose I to cellulose II in NaOH treated Agave americana L. fibre. **Carbohydrate Polymers** v. 86: 1221–1229, 2011

Painel Florestal. **Panorama Mundial do Setor de Celulose, Papel e Papelão**. 2014. Disponível em: <<http://www.painelflorestal.com.br/noticias/artigos/panorama-mundial-do-setor-de-celulose-papel-e-papelao#sthash.Iy4q9U2w.dpuf>>. Acessado em: 13/03/2015.

Portal Brasil. **Dilma inaugura fábrica de celulose em Imperatriz (MA)**. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2014/03/dilma-participa-da-inauguracao-de-fabrica-de-celulose>>. Acessado em: 05/03/2015.

PROMPT, A. H. **Análise da fermentação de glicose e xilose por leveduras *Spathaspora isoladas de madeira em decomposição***. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Sana Catarina, 2012.

PVINENKO, K., ERIKSSON, E., ASTRUP, T. F. Waste paper for recycling: Overview and identification of potentially critical substances. **Waste Management**. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X15001312>>. Acessado em: 16/03/2015.

QI, B.; CHEN, X., SU, Y. and WAN, Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. **Bioresource Technology** v. 102, n. 3: p. 2881-2889, 2011.

RABELO, S.C., AMEZQUITA, N.A.F., ANDRADE, R.R., MACIEL FILHO, R., COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and bioenergy**. v. 35: p. 2600-2607, 2011.

RAMOS, L. P., SILVA, L., BALLEM, A. C., PITARELO, A. P., CHIARELLO, L. M., SILVEIRA, M. H. L. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technology**. v. 175: 195-202, 2015.

RECORET, J., GUTIÉRREZ, A. e RÍO, J. C. Chemical composition of different eucalyptus wood species used for paper pulp manufacturing. Seville, Spain. 2010.

ROCHA, G. J. M., MARTIN, C., SOARES, I. B., MAIOR, A. M. S., BAUDEL, H. M. e ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy** v. 35, n. 1: p. 663-670, jan. 2011.

ROCHA, J. M. T. S., ALENCAR, B. R. A., MOTA, H. G. e GOUVEIA, E. R. **Produção de bioetanol de papel de escritório descartado por *Spathaspora passalidarum* HMD 14.2 utilizando hidrólise e enzimática.** Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, 2014.

RODRIGUES, R. C. L. B., ROCHA, G. J. M., RODRIGUES, D. JR., FILHO, H. J. I., FELIPEA, M. G. A., PESSOA, A. JR. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**; v. 101: p. 1247-1253, 2010.

RODRÍGUEZ-CHONG, A., RAMÍREZ, J. A., GARROTE, G., VÁSQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**. v. 61, n. 2: p. 143-152, 2013

ROMERO, I., RUIZ, E., CASTRO, E. e MOYA, M. Acid hydrolysis of olive tree biomass. **Chemical Engineering Research And Design**. Jaén, Spain. v. 88, n. 5: p. 633-640, 2010.

RONI MARYANA, MA'RIFATUN, D., WHENI I., A., SATRIYO, K. W., RIZAL, W. A. Alkaline Pretreatment on Sugarcane Bagasse for Bioethanol Production. **Energy Procedia**. v. 47: p. 250-254, 2014.

ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composities**. 2^a ed. Boca Raton, Italy: CRC Press, *Taylor and Francis Group*, LCC, 2013.

SANTOS, J. R. A., GUSMÃO, N. B. e GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces Cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1: p.75-80, 2010.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M. e REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**. v. 35, n.5: p. 1004-1010, 2012.

SCHEUFELE, F. B., BUTZKE, A., MARRA, I., HASAN, S., FIORESE, M. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**: UFF, v. 14: p. 310-321, 2012.

SOUSA, L. C.; CHUNDAWAT, S. P. S.; BALAN, V.; DALE, B. E. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion Biotechnology**. v 20, n. 3: p. 339-347. 2009

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry**: fundamentals and applications, 2ª ed. San Diego, California, Academic Press, 1993.

SPIRIDON, I. e POPA, V.I. **Hemicelluloses**: structure and properties, in Polysaccharides- Structural Diversity and Functional Versatility, 2ª ed. Marcel Dekker, New York, p. 475, 2005.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5/6, 1996.

TÉBÉKA, I. R. M.; SILVA, A. G. L.; PETRI, D. F. S.; Hydrolytic Activity of Free and Immobilized Cellulase. **Langmuir**, v. 25: p. 1582, 2009.

VALOR ECONÔMICO. **Consumo de combustíveis no Brasil cresce 5% em 2013, diz ANP**. 2014. Disponível em: <<http://www.valor.com.br/brasil/3476260/consumo-de-combustiveis-no-brasil-cresce-5-em-2013-diz-anp>> Acessado em: 15/04/2014.

_____. **Pöyry: Ásia puxará consumo e produção de papel até 2025**. 2012 Disponível em: <<http://www.valor.com.br/empresas/2861260/poeyry-asia-puxara-consumo-e-producao-de-papel-ate-2025#ixzz2zMA36gJq>>. Acessado em: 15/04/2013.

VUÁUROVIÄ, V. M., RAZMOVSKI, R. N., POPOV, S. D. Ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilised on corn stem ground tissue. Novi Sad, Republic of Serbia. v. 116: p. 315-322, 2009

WAN, J., LIAN, J., WANG, Y., MA, Y. Investigation of cellulose supramolecular structure changes during conversion of waste paper in near-critical water on producing 5-hydroxymethyl furfural. **Renewable Energy**, v. 80: p. 132-139, 2015.

WANG, L.; TEMPLER, R.; MURPHY, J. High-solids loading enzymatic hydrolysis of waste papers for biofuel production. **Applied Energy**, v. 99: p. 23-31, 2012.

_____. Bioethanol production from various waste papers: Economic feasibility and sensitivity analysis. **Applied Energy**, v. 111: p. 1172-1182, 2013.

WAYMAN, M.; CHEN, S.; DOAN, K. Bioconversion of waste paper to ethanol. **Process Biochemistry**. v. 27, n. 4: p. 239-245, 1992.

WERTZ, J-L., BÉDUÉ, O., MERCIER JP. **Cellulose science and technology**. Boca Raton, Italy. CRC Press, *Taylor and Francis Group*, LCC, 2010. 364 p.

WU, B., TAYLOR, C. M., KNAPPE, D. R., NANNY, M. A., BARLAZ, M. A. Factors controlling alkylbenzene sorption to municipal solid waste. **Environ Sci Technol**. v. 35: n. 22, p. 4569-76. 2001

WYMAN, C. E.; DECKER, S. R.; HIMMEL, M. E.; BRADY, J. W.; SKOPEC, C. E.; VIKARI, L. **EM Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**; Dumitriu, S., 2nd ed.; Dekker: New York, CRC Press, cap. 43, 2005.

XU, F., YU, J., TESSO, T., DOWELL, F. and WANG, D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. **Applied Energy**. v. 104: p. 801–809, 2013.

ZHANG, J., HOU, Q., CHEN, J., XU, N., JI, F. Effects of different pre-extractions combining with chemi-thermomechanical treatments on the enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Bioresource Technology**. v. 175: p. 75-81, 2015.