

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA  
BACHARELADO EM QUÍMICA TECNOLÓGICA COM ÊNFASE AMBIENTAL**

**LUCAS BLITZKOW SCREMIN**

**CONTROLE ANALÍTICO DAS PERDAS LIGNO(HEMI)CELULÓSICAS DURANTE  
A DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**CURITIBA**

**2014**

**LUCAS BLITZKOW SCREMIN**

**CONTROLE ANALÍTICO DAS PERDAS LIGNO(HEMI)CELULÓSICAS DURANTE  
A DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Bacharelado em Química Tecnológica com ênfase Ambiental / Licenciatura em Química do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Ecoville, como requisito parcial para colação de grau.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. José Domingos Fontana  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Regina Rocha Martins

**CURITIBA**

**2014**

# TERMO DE APROVAÇÃO

LUCAS BLITZKOW SCREMIN

## CONTROLE ANALÍTICO DAS PERDAS LIGNO(HEMI)CELULÓSICAS DURANTE A DERIVATIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA do Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR e **APROVADO** pela seguinte banca:

**Membro 1** – Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valma Martins Barbosa

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Membro 2** – Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlene Soares

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Orientador** - Prof. Dr. José Domingos Fontana

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Co-Orientadora** - Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Regina Rocha Martins

Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)

**Coordenadora de Curso** - Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Caroline Schnitzler (UTFPR)

Curitiba, 10 de março de 2014.

*“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”*

Dedico este trabalho a minha família, Luiz, Jucélia e Luizinho.  
Por todo o carinho, incentivo e paciência durante estes anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu pai Luiz e à minha mãe Jucélia por todo o amor, carinho, esforço e investimento para me proporcionar a melhor educação possível, permitindo que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao Professor Doutor José Domingos Fontana pela orientação e incentivo ao longo do projeto, e à Professora Doutora Lucia Regina Rocha Martins pelas sugestões, sobretudo na fase inicial do projeto.

Agradeço ao Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa (LQBB) e a UTFPR por proporcionar o uso da estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Agradeço as colegas de laboratório pelo incentivo, orientação e ensinamentos durante a realização deste trabalho. Adelia, Marcela e Gizele que me aconselharam a ler, escrever e reescrever este trabalho tantas vezes para que eu aprendesse a elaborar um trabalho científico e isto me fazia feliz ao vê-lo cada vez melhor.

Aos meus amigos, obrigado por todos os momentos em que fomos estudiosos, ou não, atletas, músicos e cúmplices. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

## RESUMO

SCREMIN, Lucas B.; Controle analítico das perdas ligno(hemi)celulósicas durante a derivatização química do bagaço de cana. 2014. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado/Licenciatura em Química Tecnológica com ênfase ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

O bagaço de cana-de-açúcar proveniente das usinas sucroalcooleiras vem sendo utilizado para geração de energia elétrica através da queima e geração de vapor, sendo que em um futuro próximo estará também direcionado para a produção de etanol celulósico. Resumidamente o bagaço é constituído de celulose (50%), hemicelulose (30%) e lignina (20%). Com o intuito de aplicar este subproduto para outros fins como a remoção de contaminantes ambientais, se propõe a derivatização parcial e comparativa do bagaço a fim de se obter um complexo bpolissacarídico-aromático éter-interligado com epicloridrina (*cross-linked cane bagasse* – CLCB). O alvo no substrato nativo são os grupos alcoólicos ou fenólicos fartamente disponíveis, sendo que esta reação é conduzida em meio fortemente alcalino. Salvo por uma ínfima fração, a celulose é insolúvel em álcali enquanto a lignina o é em boa parte e a hemicelulose (heteroxilana) o é quase que completamente, dependendo da cinética reacional (concentração alcalina, temperatura e tempo). Logo, perdas do bagaço nativo são inevitáveis, mas podem ser minimizadas. O objetivo deste trabalho foi monitorar tais perdas através de determinação de carboidratos totais e lignina álcali-solúvel na fração solubilizável pela reação em meio alcalino, bem como o monitoramento da resistência à hidrólise enzimática. Mediante planejamentos fatoriais no que diz respeito à concentração e volume de álcali, temperatura, gramatura do bagaço e tempo reacional, se pode eleger os fatores que mais influenciaram nessas perdas processuais e as condições mais apropriadas tanto para a etapa preliminar de mercerização quanto à subsequente de derivatização do bagaço mercerizado com o agente de interligação covalente, a epicloridrina. Os resultados indicaram que para a etapa de mercerização, a concentração de NaOH foi a variável mais significativa para o aumento das perdas processuais e menor resistência à hidrólise enzimática. Já para a etapa de interligamento com epicloridrina, a temperatura foi a variável mais significativa para a redução das perdas processuais e aumento da resistência à hidrólise enzimática, indicando que em condições com temperaturas entre 20 e 40 °C a pretendida reação de interligação covalente ou *cross-linking* deve ter acontecido com maior intensidade. Embora bem explorado o uso de bagaço de cana para aplicações semelhantes na literatura, a questão das perdas processuais aqui exploradas não esta relatada, assumindo tais autores trabalharem com bagaço integral quando de fato deveriam referir-se a celulose residual.

Palavras-chave: Mercerização. Ligações cruzadas. Perdas processuais. Tratamento de Efluentes.

## ABSTRACT

SCREMIN, Lucas B.; Analytical control of ligno(hemi)cellulosic losses for chemical derivatization of sugarcane bagasse. 2014. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado/Licenciatura em Química Tecnológica com ênfase ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

The cane sugar bagasse from the sugarcane mills has been used to generate electricity by burning and steam generation, and in the near future it will also be directed to the production of cellulosic ethanol. The bagasse is mainly composed of cellulose (50%), hemicellulose (30%) and lignin (20 %). In order to apply this byproduct for other purposes such as the removal of environmental contaminants, it is proposed a comparative partial derivatization of the bagasse in order to obtain a dipolysaccharide-aromatic ether-linked complex with epichlorohydrin ("cross-linked cane bagasse " - CLCB). The target in the native substrate are the alcoholic or phenolic groups plenty available and this reaction is carried out in a strongly alkaline medium. Except for a tiny fraction, cellulose is insoluble in alkali while the lignin is largely and hemicellulose (heteroxylan) is almost completely, depending on the reaction kinetics (alkali concentration, temperature and time). Thus, loss of native bagasse are unavoidable but can be minimized. The goal of this work was then monitor such losses by determination of total carbohydrates and alkali- soluble lignin fraction being solubilized under the drastic alkaline conditions, and monitoring of resistance to enzymatic hydrolysis. Exploring factorial design with respect to the volume and concentration of alkali, temperature, bagasse grammature and reaction time, we were able selecting the most important factors influencing these procedural losses and the variables and the more appropriate conditions for both the preliminary step of mercerization as well as the subsequent one derivatization of the mercerized bagasse with covalently linking agent, epichlorohydrin. The results indicated that for the mercerization step, the NaOH concentration was the most significant variable for increased procedural losses and less resistance to enzymatic hydrolysis. As for the step of cross-linking with epichlorohydrin, the temperature was most significant for the reduction of procedural losses and increased resistance to enzymatic hydrolysis variable, indicating that in temperatures between 20 and 40 °C the desired reaction of cross-linking must have occurred with greater intensity. Although well explored the use of bagasse for similar applications in the literature, the issue of procedural losses explored here is not reported, assuming such authors work with full bagasse when in fact they should refer to residual cellulose.

Key-word: Mercerization. Cross-linking. Procedural losses. Waste water treatment.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA DA ESTRUTURA DE UMA BIOMASSA LIGNO(HEMI)CELULÓSICA .....	12
FIGURA 2 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CELULOSE, CELOBIOSE E LIGAÇÃO B-GLICOSÍDICA.....	13
FIGURA 3 – ESTRUTURA REPRESENTATIVA DE L-ARABINO-(4-O-METIL-D-GLUCURONO)-D-XILANA: 1-XILOPIRANOSE; 2-L-ARABINOFURANOSE; 3-ÁCIDO 4-O-METIL-GLUCURÔNICO; 4-GRUPO ACETIL.....	14
FIGURA 4 – ESTRUTURA DOS ÁLCOOIS PRECURSORES DA LIGNINA.....	15
FIGURA 5 - FRAÇÕES TAMISADAS DO BAGAÇO DE CANA .....	17
FIGURA 6 - REAÇÃO DE <i>CROSSLINKING</i> DO BAGAÇO DE CANA COM O EMPREGO DE EPICLORIDRINA .....	20
FIGURA 7 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS PELO MÉTODO FENOL SULFÚRICO.....	23
FIGURA 8 - ESQUEMA DE REAÇÃO DE REDUÇÃO DO ÁCIDO 3,5-DINITROSALICILICO FORMANDO COMPOSTO COLORIDO .....	25
FIGURA 9 - QUANTIDADE DE AÇÚCAR REMOVIDO PELAS LAVAGENS CONSECUTIVAS DAS FRAÇÕES DO BC COM ÁGUA.....	27
FIGURA 10 - ASPECTO FÍSICO FINAL DO BC APÓS TRATAMENTO DE MERCERIZAÇÃO.....	29
FIGURA 11 - ESTIMATIVA DE FLUXO EM COLUNAS PREENCHIDAS COM OS MATERIAIS .....	30
FIGURA 12 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA O FLUXO DE COLUNA ( $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) DO BAGAÇO DE CANA MERCERIZADO.....	31
FIGURA 13 – QUANTIDADE DE LIGNINA E HEMICELULOSE REMOVIDAS DURANTE O PROCESSO DE MERCERIZAÇÃO DO BC .....	32
FIGURA 15 - GRÁFICO DAS MÉDIAS DE HEMICELULOSE REMOVIDA NA MERCERIZAÇÃO DO BC .....	35
FIGURA 16 - BIODEGRADABILIDADE ACELERADA DOS MATERIAIS EM % DE HIDRÓLISE .....	36
FIGURA 17 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA TESTE DE DEGRADABILIDADE ACELERADA (% HIDRÓLISE) PARA O BAGAÇO DE CANA MERCERIZADO.....	38
FIGURA 18 - GRÁFICO DAS MÉDIAS DE PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE NO TESTE DE DEGRADABILIDADE ACELERADA DAS AMOSTRAS DE BAGAÇO DE CANA MERCERIZADO.....	39
FIGURA 19 - ASPECTO FÍSICO DO BC APÓS PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO PRIMÁRIA .....	40
FIGURA 20 - ESTIMATIVA DE FLUXO COLUNAR APÓS DERIVATIZAÇÃO PRIMÁRIA DO BC.....	41

FIGURA 21 - LIGNINA SOLÚVEL REMOVIDA DURANTE A DERIVATIZAÇÃO PRIMÁRIA DO BC EM % (m/m) .....	42
FIGURA 22 - AÇÚCARES TOTAIS REMOVIDOS DURANTE A DERIVATIZAÇÃO PRIMÁRIA DO BC.....	43
FIGURA 23 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A REDUÇÃO NA LIBERAÇÃO DE HEMICELULOSE PARA O CLCB .....	45
FIGURA 24 - GRÁFICO DAS MÉDIAS DE HEMICELULOSE REMOVIDA NA DERIVATIZAÇÃO PRIMÁRIA DO BC .....	46
FIGURA 25 - GRÁFICO DE CONTOURNO PARA A REDUÇÃO NA REMOÇÃO DE HEMICELULOSE .....	47
FIGURA 26 - TESTE DE DEGRADABILIDADE ENZIMÁTICA DOS MATERIAIS EM PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE .....	48
FIGURA 27 - DEGRADABILIDADE ENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS EM PORCENTAGEM DE HIDRÓLISE APÓS 72 HORAS DE INCUBAÇÃO ..	49
FIGURA 28 - ESTIMATIVA DOS EFEITOS PARA A REDUÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO CLCB .....	50
FIGURA 29 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A REDUÇÃO DA HIDRÓLISE APÓS DERIVATIZAÇÃO DO BC .....	51
FIGURA 30 - ESPECTRO DE FTIR DO CLCB 5.2, CONTROLE 5.2 E BC NATIVO	52
FIGURA 31 - ESPECTRO DE FTIR DO CLCB 3, CONTROLE 3 E BC NATIVO.....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO FRACIONÁRIA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR APÓS TAMISAÇÃO .....	18
TABELA 2 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O EXPERIMENTO DE MERCERIZAÇÃO DO BAGAÇO .....	19
TABELA 3 - PLANEJAMENTO FATORIAL PARA O EXPERIMENTO DE DERIVATIZAÇÃO DO BAGAÇO .....	20
TABELA 4 - COMPOSIÇÃO DO REAGENTE DINITROSALICÍLICO (DNS).....	25
TABELA 5 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO EXPERIMENTAL PARA A MERCERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA.....	28
TABELA 6 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO $3^{3-1}$ PARA A MERCERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA NA RESPOSTA DE FLUXO COLUNAR .....	30
TABELA 7 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO $3^{3-1}$ PARA A MERCERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA NA RESPOSTA DE REMOÇÃO DE HEMICELULOSE .....	33
TABELA 8 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO $3^{3-1}$ PARA A MERCERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA NA RESPOSTA DE DEGRADAÇÃO ACELERADA POR ENZIMAS CELULOLÍTICAS .....	37
TABELA 9 - PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO EXPERIMENTAL PARA A DERIVATIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA.....	40
TABELA 10 - ANOVA PARA AJUSTE LINEAR DO PLANEJAMENTO $3^{3-1}$ PARA A DERIVATIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA NA RESPOSTA DE REDUÇÃO NA REMOÇÃO DE HEMICELULOSE .....	44
TABELA 11 - ANOVA PARA AJUSTE QUADRÁTICO DO PLANEJAMENTO $3^{3-1}$ PARA A DERIVATIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA NA RESPOSTA DE REDUÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E ACRÔNIMOS

AGEITEC – Agência Embrapa de Informação Tecnológica

ANOVA – Análise de Variância

BC – Bagaço de cana-de-açúcar

CLCB - *Cross-Linked Cane Bagasse*

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DNS - Ácido 3,5 dinitrosalicílico

FTIR - Infravermelho com transformada de Fourier

g – gramas

G.L.- Grau de Liberdade

HMF - Hidroximetilfurfural

L - Litro

LQBB – Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassas

MQ – Média dos quadrados

nm – nanômetros

pH – Potencial Hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SQ – Soma dos Quadrados

UV-VIS – Espectrofotometria de Ultravioleta-visível

°C – graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>10</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
<b>3</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO</b>	<b>11</b>
3.1	MATERIAIS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS	11
3.1.1	Celulose	12
3.1.2	Hemicelulose	13
3.1.3	Lignina	14
3.2	BAGAÇO DE CANA	15
3.3	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR DERIVATIZADO	16
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>17</b>
4.1	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	17
4.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MERCERIZAÇÃO	19
4.3	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO	20
4.4	AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE MERCERIZAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO	21
4.4.1	Determinação de Fluxo de Coluna	21
4.4.2	Remoção de Lignina	22
4.4.3	Remoção de Hemicelulose	22
4.4.4	Teste de Resistência à Depolimerização Enzimática	24
4.4.5	Monitoramento da Eficiência da Derivatização	26
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
5.1	PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA	27
5.1.1	Remoção da Sacarose Residual	27
5.2	AVALIAÇÃO DAS PERDAS DURANTE A MERCERIZAÇÃO	28
5.2.1	Determinação de Fluxo de Coluna	29
5.2.2	Remoção de Lignina e Hemicelulose	31
5.2.3	Teste de Resistência à Depolimerização Enzimática	35
5.3	AVALIAÇÃO DAS PERDAS DURANTE A DERIVATIZAÇÃO	39
5.3.1	Determinação de Fluxo de Coluna	41
5.3.2	Remoção de Lignina e Hemicelulose	42
5.3.3	Teste de Resistência à Hidrólise Enzimática	47
5.3.4	Monitoramento da eficiência da derivatização	51
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>54</b>
<b>7</b>	<b>SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>56</b>
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICES	61
	ANEXOS	64

## 1 INTRODUÇÃO

Historicamente a cana de açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Do seu processo de industrialização obtém-se como produtos o açúcar e o álcool (anidro e hidratado), além dos subprodutos, vinhoto e o bagaço.

Estima-se que a produção brasileira de cana-de-açúcar para a safra 2013/2014 atinja a marca de 654 milhões de toneladas, produzindo assim aproximadamente 183 milhões de toneladas de bagaço (50% de umidade), considerado o maior resíduo agrícola do país (CONAB, 2013). Esse bagaço vem sendo utilizado principalmente para a geração de energia elétrica e em menor grau para ração animal. Contudo, várias pesquisas têm buscado outras formas de aproveitamento desta fitobiomassa secundária.

Uma forma de aproveitamento para o bagaço que vem sendo bastante pesquisada é seu uso como um substrato barato para produção de trocadores iônicos ou adsorventes utilizados na remoção de metais pesados, corantes, entre outros compostos de efluentes industriais (LASZLO, ŠIMKOVIC, 1997; NADA, HASSAM, 2006; GURGEL, GIL, 2012; KAMEL et al., 2012; TAHIR et al., 2012).

Como a capacidade natural do bagaço para realizar esses processos não é muito elevada, são realizadas derivatizações químicas inserindo diferentes grupos funcionais em sua estrutura, o que aumenta sua capacidade de troca iônica e de adsorção. Para tanto é necessário o fortalecimento da estabilidade mecânica do material ligno(hemi)celulósico promovendo o interligamento (*cross-linking*) de seus componentes: celulose > hemicelulose > lignina (LASZLO, 1998; NADA, HASSAM, 2006).

O processo de interligamento representa, portanto, uma importante etapa para utilização desse bagaço. Para facilitar o acesso aos grupos hidroxilas disponíveis no material tem-se feito um pré-tratamento alcalino das fibras (dito como “mercerização” ou conversão dos grupos alcoólicos a alcoóxidos:  $R-OH + NaOH \rightarrow R-O^-Na^+ + H_2O$ ) para posterior derivatização química. Contudo, pouca atenção tem sido dada à perda dos constituintes do material original durante esse processo. E estas perdas, dada a maior estabilidade oferecida pelo componente majoritário – a celulose – se restringem aos outros dois componentes: hemicelulose (hetero-xilana

ou L-arabino-4-O-metil-glucurono-D-xilana parcialmente O-acetilada no caso de uma gramínea, o bagaço de cana) e lignina, um componente diferenciado e aromático. Portanto, o enfoque deste trabalho foi monitorar e quantificar tais perdas por conta do efeito solubilizador do álcali forte (no caso NaOH) sobre a composição nativa e não hidrossolúvel do bagaço de cana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o controle analítico das perdas ligno(hemi)celulósicas durante a derivatização do bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) com epícloridrina em meio reacional fortemente alcalino.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Processar o bagaço de cana a fim de obter frações com diferentes tamanhos de partículas através de separação por tamisação;
- Remover a sacarose residual do bagaço de cana através lavagens sequenciais com água;
- Definir os fatores que mais influenciam a etapa de mercerização, variando a gramatura do bagaço, o volume e a concentração de hidróxido de sódio, por meio de planejamento fatorial utilizando como respostas monitoramento do fluxo colunar, as perdas processuais de lignina e hemicelulose e a resistência à hidrólise enzimática;
- Definir os fatores mais relevantes na redução das perdas processuais e no aumento da resistência à hidrólise enzimática durante a derivatização do bagaço integral, tratado com álcali, a fim de obter um complexo bopolissacarídico-aromático interligado com epícloridrina, utilizando planejamento fatorial variando a concentração de hidróxido de sódio, o tempo e temperatura de reação;
- Avaliar as diferenças estruturais do bagaço integral, tratado com álcali e derivatizados através de técnicas espectrométricas como infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

### 3 CONTEXTUALIZAÇÃO DO ASSUNTO

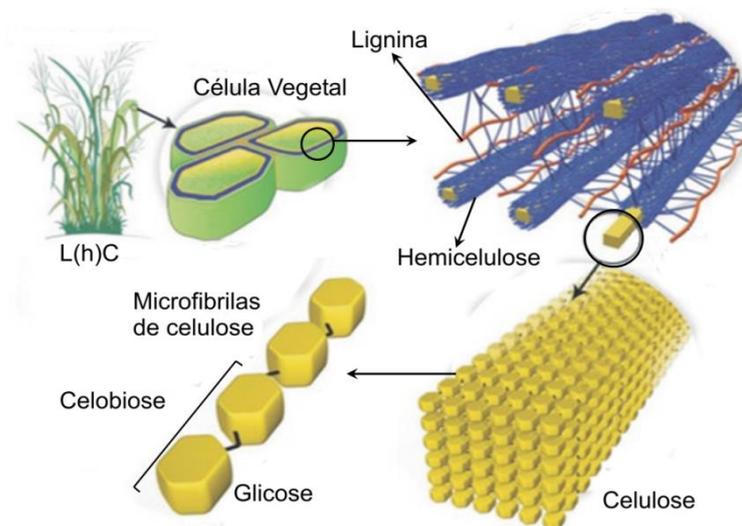
#### 3.1 MATERIAIS LIGNO(HEMI)CELULÓSICOS

Os materiais ligno(hemi)celulósicos são uma das maiores fontes de carbono e energia renovável do planeta (FONSECA, 2009). Os termos “estrutura” ou “material ligno(hemi)celulósico” são usados para referir-se aos constituintes principais da parede celular vegetal, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina (OGEDA, PETRI, 2010). É de interesse global o desenvolvimento de processos eficazes que possam aproveitar essa biomassa de forma integral, transformando seus constituintes em produtos úteis, seja para produção de produtos químicos, combustíveis alternativos ou até mesmo remediação ambiental (LAN, LIU, SUN, 2011).

Dentre os materiais ligno(hemi)celulósicos destaca-se no Brasil o bagaço de cana-de-açúcar, principal resíduo gerado pela indústria sucro-alcooleira, do qual grande parte é utilizada para produção de energia elétrica, além de perspectivas próximas para a produção do etanol celulósico, como é o caso da primeira usina GranBio, no município de São Miguel dos Campos, em Alagoas que está em fase final de construção (FONSECA, 2009; NOVACANA, 2014).

O bagaço de cana exibe uma boa capacidade de hidratação e ausência de solubilização aquosa de quaisquer de seus componentes primários poliméricos (FONTANA et al., 1990): celulose (50%), hemicelulose (30%) e lignina (20%) (ROUSSEU, FERRELL, REARDON, 1984; FONSECA, 2009; BRIENZO, 2010). O comprometimento químico entre os componentes do bagaço integral via ligações covalentes, se dá exclusivamente entre a hemicelulose e parte da fração lignina, enquanto a total insolubilidade da celulose em água se deve ao máximo estabelecimento de ligações de hidrogênio dos tipos intra- e inter-cadeias poliméricas exclusivamente baseadas em unidades de anidroglicose glicosídica e linearmente ligadas por  $\beta$ -1,4 (O’SULLIVAN, 1997).

Na figura 1 está representado um esquema da estrutura da biomassa ligno(hemi)celulósica.

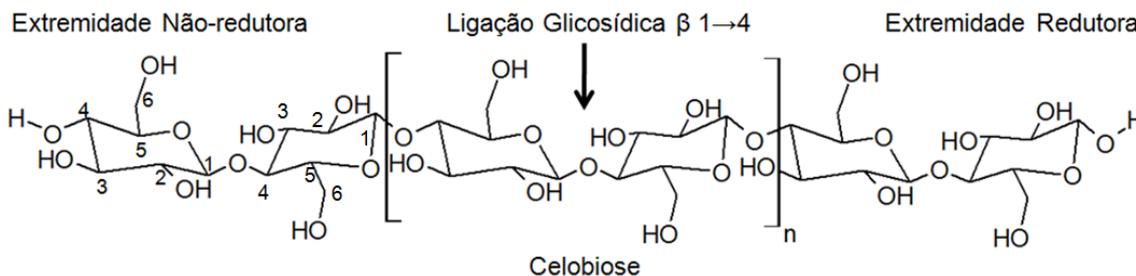


**Figura 1 – Esquema da estrutura de uma biomassa ligno(hemi)celulósica**  
**Fonte: Adaptado de SANTOS et al. (2012)**

### 3.1.1 Celulose

A celulose é o material orgânico mais abundante na terra (SILVA et al., 2009). É um polímero linear formado por até 15.000 unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. Cada resíduo de glucose tem uma orientação de  $180^\circ$  em relação ao resíduo adjacente, acomodando desta forma os ângulos de ligação preferidos pelos grupos acetais em ligações de hidrogênio, formando assim a celobiose, representada na figura 2. Esta unidade repetitiva contém grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular. A realização destas interações intermoleculares proporcionam a formação de fibrilas, estruturas altamente organizadas que associam-se formando as fibras de celulose (BON, pag. 255, 2008).

Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência da celulose formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos (SILVA et al., 2009).



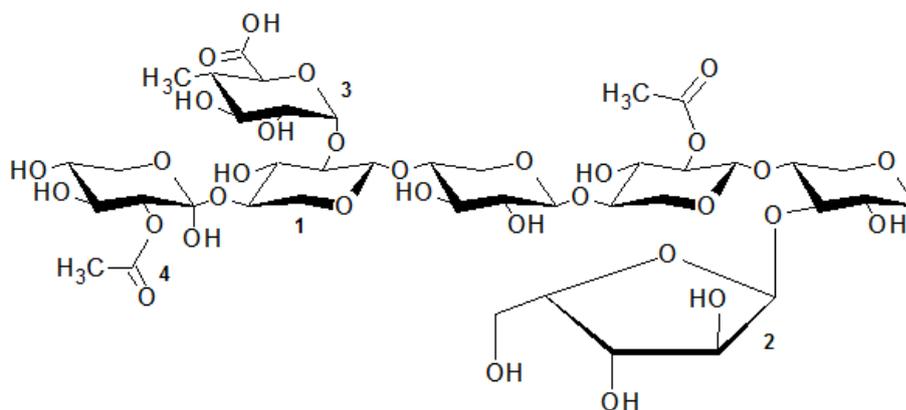
**Figura 2 - Estrutura molecular da celulose, celobiose e ligação  $\beta$ -glicosídica**  
**NOTA: Resíduos de anidroglicose da extremidade não-redutora com os carbonos numerados.**  
**Fonte: TIBONI, (2011).**

### 3.1.2 Hemicelulose

O termo hemicelulose é usado para os polissacarídeos que ocorrem normalmente associados à celulose, em paredes celulares (SILVA, 2009). Consiste de cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e, em muito menor quantidade, aldohexoses, como glucose, manose, e galactose. Contem também, substituintes O-acetil bem como L-arabinofuranosil, ácido D-glucurônico e ácido  $\alpha$ -D-4-O-metilglucurônico, nas ramificações (BRIENZO, 2010).

A composição deste heteropolímero pode variar enormemente, dependendo da espécie considerada (OGEDA; PETRI; 2010), podendo preencher até 35% do material da parede celular da fibra vegetal atuando como substância de reserva e sustentação (SAHA et al., 2005).

A hemicelulose mais encontrada no bagaço de cana-de-açúcar é a xilana, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza. A xilana do bagaço apresenta uma cadeia linear constituída de unidades D-xilopiranosil com ligações  $\beta$ -D-(1,4), podendo ser substituída com  $\alpha$ -L-arabinofuranosil no carbono 2 e 3, sendo que outros grupos funcionais (O-acetil e 4-O-metil-glucuronil) competem por estas mesmas duas hidroxilas secundárias (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003). A figura 3 mostra uma representação esquemática de uma hemicelulose com suas ramificações (BRIENZO, 2010). Outra particularidade, muito variável com a fonte de gramínea ou madeira dura, é a ocorrência de ácidos fenol-carboxílicos (e.g., p-coumárico ou ferúlico) esterificando a L-arabinofuranose.



**Figura 3 – Estrutura representativa de L-arabino-(4-O-metil-D-glucurono)-D-xilana: 1-Xilopiranosose; 2-L-arabinofuranose; 3-ácido 4-O-metil-glucurônico; 4- grupo acetil**  
**Fonte: adaptado de BRIENZO, (2010)**

### 3.1.3 Lignina

A lignina, juntamente com a hemicelulose, preenche os espaços entre as fibras de celulose, além de atuar como material ligante entre os componentes da parede celular. Sua estrutura é altamente complexa e não-uniforme, sendo um material hidrofóbico com estrutura tridimensional, altamente ramificada, podendo ser classificada como um polifenol (SILVA et al., 2009).

A lignina é um biopolímero formado pela polimerização de três diferentes precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que se caracterizam por possuírem um anel aromático com diferentes substituintes, estes precursores estão representados na figura 4. A lignina possui interação parcial covalente com a hemicelulose e interação física com a celulose (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).



**Figura 4 – Estrutura dos álcoois precursores da lignina**

### 3.2 BAGAÇO DE CANA

A estimativa brasileira da produção de cana na safra 2013/2014 é de 653 milhões de toneladas (CONAB, 2013). Segundo a agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGEITEC), a quantidade de bagaço produzido depende do teor de fibra da cana, resultando em média 280 kg por tonelada de cana processada. Para a safra corrente, representa em base seca, cerca de 183 milhões de toneladas do resíduo anidro Silva, Gomes e Alsina (2007) consideram que o bagaço de cana de açúcar representa o maior resíduo agroindustrial do país.

Um dos destinos desses resíduos tem sido a queima para a geração de energia elétrica. Sendo esta uma alternativa para atender o gasto energético das usinas sucroalcooleiras na produção de etanol combustível (hidratado direto ou anidro adicionado à gasolina) (MARTINELLI, FILOSO, 2008; FONSECA, 2009; FONTANA, 2011). Em um futuro próximo poderá, ainda, conciliar a coprodução do agora dito bioetanol celulósico, ou seja, etanol gerado por conta da pré-hidrólise da celulose residual do bagaço com uso de enzimas industriais do grupo das celulasas de última geração (e.g., “Accelerase(s)” da Genencor e “Cellic(s)” da Novozymes).

Outra alternativa para o bagaço de cana de açúcar é a nutrição animal. Porém, o bagaço possui altos teores de fibra sendo pobre em proteínas e minerais (PIRES et al., 2004). Devido à natureza da sua fibra, possui baixa densidade energética sendo considerado de “baixo potencial de uso na alimentação animal” (MEDINA, NATEL, 2013).

### 3.3 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR DERIVATIZADO

Como a composição ternária do bagaço é celulose, hemicelulose e lignina, as quais são ricas em grupos hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ), estas unidades são passíveis da formação do *cross-linking* ou intercruzamento covalente. Para Nada e Hassan (2006), a etapa de *cross-linking* evita a perda dos constituintes carboxilados dos materiais ligno(hemi)celulósicos, ou seja, a hemicelulose glucuronilada e portanto menos insolúvel em água. Em seu trabalho com quitosanas, Chiou, Ho e Li (2004) afirmaram que as ligações cruzadas entre seus componentes são importantes não apenas para torná-las insolúveis, mas também melhora suas propriedades mecânicas.

Um agente de interligação comumente utilizado é a epícloridrina, ela estabiliza eficientemente resíduos agrícolas para preparação de trocadores iônicos (NADA, HASSAM, 2006), e de acordo com Laszlo (1998) a derivatização química do bagaço promovendo *cross-linking* com a epícloridrina diminui sua biodegradabilidade. Além disso, o bagaço interligado foi mais eficiente nas etapas de derivatização posteriores onde foram inseridos grupos aminos para formação de trocadores iônicos. Segundo este autor a etapa de *cross-linking* é necessária por produzir ligações éteres estáveis em uma ampla escala de pH.

Diversas pesquisas têm buscado, através de modificações químicas inserindo diferentes grupos funcionais, o uso do bagaço de cana-de-açúcar como um substrato barato para produção de trocadores iônicos que podem ser utilizados para variados tipos de tratamento de efluentes como remoção de corantes, fenol e metais (ŠIMKOVIC, 1997; NADA, HASSAM, 2006; LASZLO, GURGEL, GIL, 2012; KAMEL et al., 2012; TAHIR et al., 2012).

Alguns desses estudos com a derivatização do bagaço utilizam o pré-tratamento alcalino de mercerização segundo Gurgel e Gil (2012) esse processo é uma forma de aumentar a área de superfície da fibra. Durante a mercerização o bagaço incha e as cadeias polissacarídicas são rearranjadas alterando suas estruturas, cristalinidade e modificando propriedades de adsorção das fibras, o aumento da área superficial facilita o acesso aos grupos hidroxila, facilitando a derivatização (JIANG et al., 2012).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana (BC), fruto da moagem extratora do caldo, foi doado pela cooperativa COCAMAR de Maringá através do Sr. Wagner Spirandelli, da CLASPAR. O BC foi dividido em diversas frações com diferentes tamanhos de partícula. Esta separação foi realizada utilizando-se um conjunto de seis tamises de abertura de poros que variavam de 4,76 mm a 0,42 mm conectadas sucessivamente em peneirador eletromagnético (Contenco). Alíquotas de 50 g de bagaço foram colocadas no tamis de maior abertura e agitadas por 10 min com vibração de 80%.

Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 5 e apresentados na tabela 1.



Figura 5 - Frações tamisadas do bagaço de cana

**Tabela 1 - Composição fracionária do bagaço de cana de açúcar após tamisação**

Fração	Especificação	Tamanho de partícula (mm)	Peso (g)	%
1	retido mesh 4	> 4,76	13,38±4,37	26,64±7,91
2	retido mesh 9	4,76 > x ≥ 2,00	5,31±1,05	10,60±2,87
3	retido mesh 14	2,00 > x ≥ 1,19	3,92±1,17	7,80±1,88
4	retido mesh 20	1,19 > x ≥ 0,84	4,33±0,38	8,62±0,60
5	retido mesh 28	0,84 > x ≥ 0,59	5,23±0,17	10,42±0,35
6	retido mesh 35	0,59 > x ≥ 0,42	6,38±1,11	12,73±1,98
7	passou mesh 35	< 0,42	11,63±3,16	23,19±5,31

As frações 1 e 7 representam pouco menos de 50% do bagaço de cana, contudo apresentaram algumas dificuldades para a realização do experimento. A fração 1 apresentou partículas muito grandes o que pode dificultar a realização da reação de interligamento, por apresentar menor superfície de contato com os reagentes, já a fração 7 apresentou partículas extremamente finas, não sendo interessantes para o trabalho, pois podem apresentar fluxo reduzido e poderem provocar entupimento nas colunas.

Em vista disso optou-se por trabalhar com as frações intermediárias (2 a 6) que representam aproximadamente 51% do volume total do BC e apresentam características mais adequadas ao trabalho. Tendo em vista um processo produtivo os 49% de material não utilizado nesse estudo poderiam ser destinados a outros fins como por exemplo a geração de energia pela queima.

As frações obtidas a partir do BC foram submetidas a sucessivas lavagens com água para a remoção da sacarose residual que está na ordem de 3% (GURGEL; FREITAS; GIL, 2008). Realizou-se teste com 5 g de cada fração a fim de determinar a quantidade de lavagens necessárias, utilizou-se uma proporção de 20 mL de água por grama de BC. Após cada lavagem foram recolhidas alíquotas para determinação da quantidade de sacarose removida pela técnica para açúcares totais com os reagentes fenol / ácido sulfúrico, conforme item 4.4.3 (remoção de hemicelulose), utilizando uma curva analítica de sacarose.

A secagem subsequente foi realizada em estufa a 70 °C com circulação de ar (Nova Ética – Modelo 400-4ND) por 24 horas.

## 4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MERCERIZAÇÃO

O tratamento com álcali foi realizado a partir de BC seguindo um planejamento fatorial  $3^{3-1}$  com ponto central em triplicata, onde a gramatura do bagaço, o volume de hidróxido de sódio e sua concentração foram fatores avaliados, conforme mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2 - Planejamento fatorial para o experimento de mercerização do bagaço**

Níveis dos fatores	Tamanho de partícula (intervalo em mm)	NaOH (% m/m)	Volume de NaOH (mL)
-1	2 ( $4,76 > x \geq 2,00$ )	1	20
0	4 ( $1,19 > x \geq 0,84$ )	5,5	60
+1	6 ( $0,59 > x \geq 0,42$ )	10	100

A mercerização foi avaliada em termos de fluxo colunar (4.4.1), lignina solúvel liberada (4.4.2), hemicelulose removida (4.4.3), e a resistência à hidrólise enzimática das amostras (4.4.4). Adicionalmente, foi realizada uma amostra controle utilizando o BC com tamanho de partícula intermediário (fração 4), sem adição de álcali e com volume de 60 mL de água.

Os experimentos foram conduzidos em erlenmeyers (125 mL) utilizando 2 g de BC que foram mercerizados durante 2 horas em diferentes concentrações e volumes de NaOH (tabela 2). Todo o procedimento foi realizado a 25 °C sob agitação de 160 rpm em agitador incubador (Gyrotory Water Bath Shaker, modelo G76). As amostras foram então filtradas por lã de vidro e posteriormente à vácuo com funil de placa porosa nº 2 (40 a 100  $\mu\text{m}$ ). O BC foi lavado com água de osmose reversa até a neutralidade do pH e em seguida liofilizado (Labconco, modelo FreeZone<sup>1</sup>).

A análise estatística dos dados foi realizada conforme descrito no item 4.5.

### 4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE DERIVATIZAÇÃO

A derivatização do BC consiste na execução da reação de interligamento (*cross-linking*) entre os grupos alcoólicos e fenólicos amplamente disponíveis em sua estrutura, a fim de se obter um complexo bipolissacarídico-aromático éter-interligado com epiclorigidrina (“cross-linked cane bagasse” – CLCB) representado na figura 5.

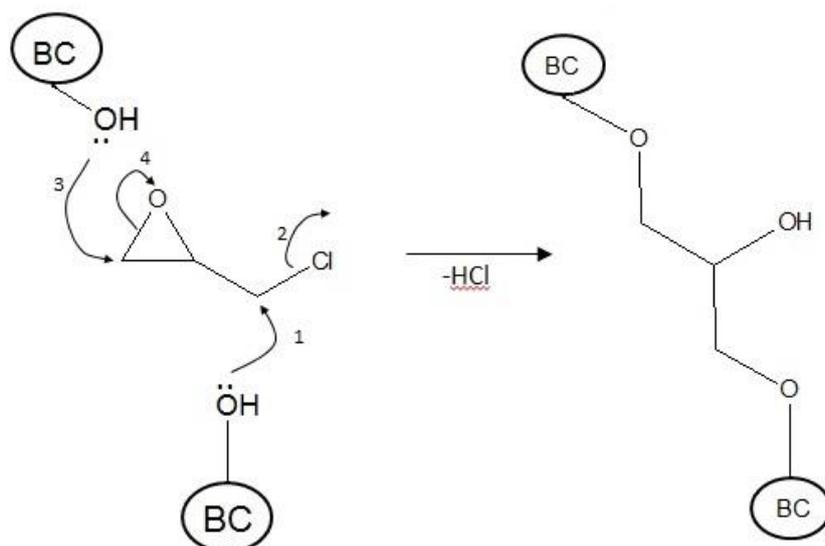


Figura 6 - Reação de *crosslinking* do bagaço de cana com o emprego de epiclorigidrina

O experimento seguiu um planejamento fatorial  $3^{3-1}$  em que as variáveis avaliadas foram a concentração de NaOH, o tempo e a temperatura de reação, conforme apresentado na Tabela 3. As respostas avaliadas também foram: fluxo colunar (4.4.1), lignina liberada (4.4.2), hemicelulose removida (4.4.3) e a resistência das amostras à depolimerização enzimática (4.4.4).

**Tabela 3 - Planejamento fatorial para o experimento de derivatização do bagaço**

Níveis dos fatores	NaOH (% m/m)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
-1	1	6	20
0	5,5	15	40
+1	10	24	60

Para a realização dos experimentos foram utilizados erlenmeyers (125 mL) e 2 g de uma mistura de BC (excluindo as gramaturas extremas). Foram mercerizados utilizando 60 mL de NaOH em diferentes concentrações durante 30 minutos. Após este período, foram adicionados 3 mL de epicloridrina, este volume de reagente foi calculado para que houvesse estequiometricamente reação em um terço das hidroxilas disponíveis em uma unidade de glucose. Adicionalmente foram realizados controles de todos os pontos experimentais sem a adição da epicloridrina.

Todo o procedimento foi realizado sob agitação de 160 rpm em agitador incubador (*Gyrotory Water Bath Shaker*, modelo G76) em diferentes temperaturas e tempos de reação. As amostras foram então filtradas por lã de vidro e posteriormente à vácuo com funil de placa porosa nº 2 (40 a 100  $\mu\text{m}$ ). O CLCB resultante foi lavado com água de osmose reversa até a neutralidade do pH e em seguida liofilizado (Labconco, modelo FreeZone).

Como a utilização da epicloridrina durante o experimento requer cuidados e atenção especiais, no anexo A está a ficha de informação de segurança de produtos químicos fornecida pelo fabricante (Sigma-Aldrich®) para este reagente.

A análise estatística dos dados foi realizada conforme descrito no item 4.5.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE MERCERIZAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO

##### 4.4.1 Determinação de Fluxo de Coluna

Para a avaliação do fluxo colunar foram utilizadas colunas de polipropileno com medidas de 1,5 cm de diâmetro e 12,5 cm de altura (ponteiras de 5 mL) e estas foram preenchidas com 300 mg do BC ou do CLCB. A coluna foi umedecida com água deionizada e posteriormente aferiu-se, com o auxílio de um cronômetro, o tempo necessário para que 5 mL de água escoassem pela coluna. Este teste foi realizado em quintuplicata, sendo excluídos o maior e menor tempo obtido.

#### 4.4.2 Remoção de Lignina

A determinação do teor de lignina presente no sobrenadante dos processos de mercerização e da derivatização primária do BC foi realizada pela leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu – Modelo UV-1650PC).

Foi executada a varredura completa do espectro além da medida da intensidade de absorção no comprimento de onda de 280 nm que indica a presença de lignina liberada (BON, pág. 219, 2008).

Para o cálculo da lignina solúvel seguiu-se a equação 1, utilizada por Rocha (2012) em seu trabalho sobre o pré-tratamento de explosão de vapor e deslignificação alcalina do bagaço de cana de açúcar para produção de bioetanol.

$$C_{lig} = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (1)$$

Onde:

$C_{lig}$  - concentração de lignina solúvel (em g/L)

$A_T$  - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm

$A_{pd} = C_1 \varepsilon_1 + C_2 \varepsilon_2$  = absorvância, em 280 nm, dos produtos de degradação dos açúcares em furfural e HMF, sendo  $C_1$  e  $C_2$  suas concentrações e  $\varepsilon_1$  e  $\varepsilon_2$  são as absorvâncias que valem 146,85 e 114,00 g.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> respectivamente.

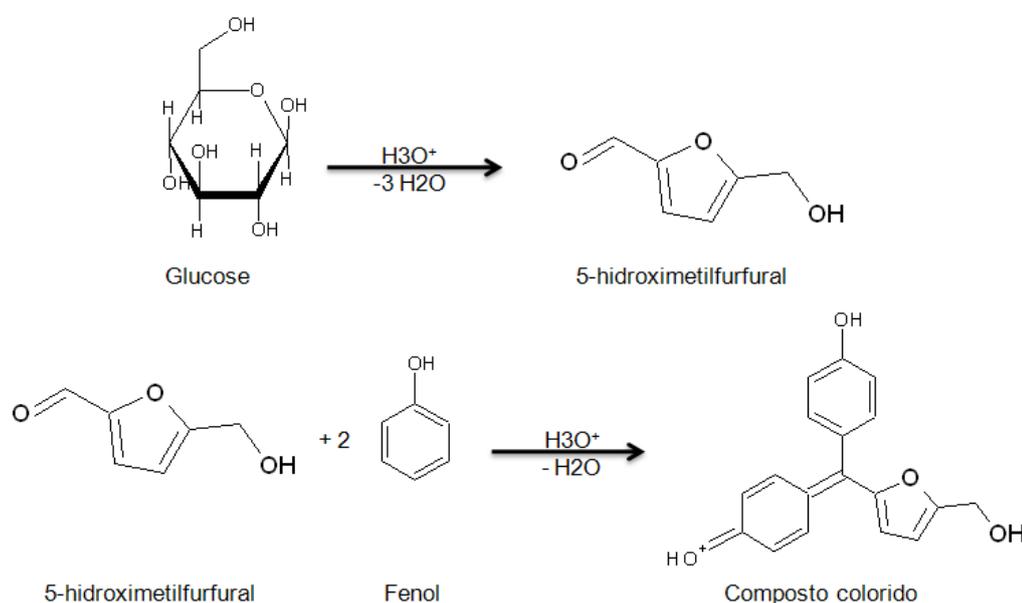
Diferentemente de uma hidrólise ou pré-tratamento ácido, a mercerização não gera coprodutos de desidratação dos açúcares e, portanto, na determinação de lignina não há interferência de cromóforos absorvedores de luz UV tais como furfural e HMF, e esta variável não foi considerada.

#### 4.4.3 Remoção de Hemicelulose

A avaliação da remoção de hemicelulose nos processos de mercerização e derivatização foi realizada através da determinação de açúcares totais, no filtrado

(sobrenadante) através do método colorimétrico Fenol Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

Este método baseia-se na desidratação de açúcares simples, polissacarídeos e derivados, pelo ácido sulfúrico produzindo um aldeído (pentoses são desidratadas até furfural e hexoses até 5-hidroxiacetilfurfural), que são capazes de se condensar a duas moléculas de fenol resultando em um composto de cor amarelo-laranja, conforme ilustrado na Figura 6.



**Figura 7 - Esquema de reação de determinação de açúcares totais pelo método fenol sulfúrico**

O ensaio propriamente dito foi realizado em tubos de ensaio de vidro bem limpos para que ocorresse a remoção de quaisquer resíduos, evitando possíveis interferentes no teste. As amostras foram analisadas em triplicata contendo de 0,1 a 60 µg de açúcar que foram adicionadas em água q.s.p 0,625 mL. Adicionou-se a mistura, 0,4 mL de solução fenol 5% (0,53 mol.L<sup>-1</sup>). Em seguida, adicionou-se de forma rápida e direta, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de homogeneização e repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. A seguir, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC), no comprimento de onda de leitura mais apropriado para as pentoses, que é 480 nm. A calibração do equipamento (branco) foi realizada com uma amostra contendo água e os demais reagentes, processada da mesma maneira.

O cálculo das quantidades de açúcar total ( $\mu\text{g}/\text{ensaio}$ ) foi realizado através de uma curva analítica obtida, com auxílio do *software* Excel, a partir de 5 diluições de uma solução-estoque a 0,2 % (m/v) de D-xilose ou sacarose (no caso das lavagens aquosas iniciais).

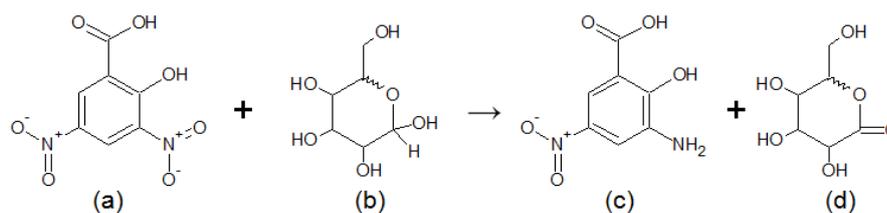
#### 4.4.4 Teste de Resistência à Depolimerização Enzimática

Este teste equivale a uma biodegradabilidade acelerada do BC mercerizado ou derivatizado frente a enzimas comerciais celulolíticas ou hemicelulolíticas. As incubações foram feitas com as enzimas celulase (Cellic CTec2), hemicelulases (Cellic HTec2) e  $\beta$ -glucosidade (NS 50010), fornecidas pela empresa Novozymes Latin America Ltda, de Araucária/PR, seguindo a metodologia descrita por Tiboni et al. (2012).

As hidrólises foram realizadas com 100 mg de amostra (controles e experimentos) em solução de citrato sódico (50 mM pH 5,0) q.s.p 4 mL em frasco de vidro com tampa (capacidade para 20 mL), em agitador-incubador na velocidade 4, ou seja, 160 rpm (*Gyrotory Water Bath Shaker – G76*) a 50 °C por até 72 h (conforme tempo recomendado pelo fornecedor das enzimas) utilizando 2  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  de solução enzimática. Foram realizadas coletas de 500  $\mu\text{L}$  nos tempos de 2, 24, 48 e 72h para a realização das análises dos açúcares redutores liberados.

A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959) e os resultados foram expressos em porcentagens de sacarificação.

Nesta metodologia os açúcares reduzem o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) na presença de hidróxido de sódio, para o composto 3-amino-5-nitrosalicílico, um produto de cor laranja-avermelhado, que pode ser facilmente mensurado em 540 nm, como pode ser visto na Figura 7. O teste tem uma faixa de detecção de 0,05 – 0,8 mg de açúcar redutor por amostra. A redução do reagente DNS ocorre a quente (MILLER, 1959).



**Figura 8 - Esquema de reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico formando composto colorido**

**NOTA: (a) ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarela); (b) açúcar redutor genérico; (c) ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (cor laranja-avermelhada) e (d) açúcar oxidado.**

Para a realização do ensaio foi necessário preparar o reagente de DNS, conforme consta na Tabela 4. As frações A e B foram levadas ao aquecimento separadamente até completa solubilização dos sais. Após a solubilização, as duas frações foram homogeneizadas e o volume acertado com água destilada para 500 mL de solução final.

**Tabela 4 - Composição do Reagente Dinitrosalicílico (DNS)**

A	Ác. 3,5-Dinitrosalicílico	5 g
	Solução NaOH 2 mol.L <sup>-1</sup>	100 mL
B	Tartarato duplo de Sódio e Potássio	150 mL
	H <sub>2</sub> O destilada	300 mL

NOTA: O volume final deve ser completado para 500 mL

As amostras foram preparadas em triplicatas contendo de 0,05 - 0,80 mg de açúcar redutor em água destilada q.s.p 750 µL. A seguir, foram adicionados 500 µL do reagente DNS e levados a fervera em banho-maria durante 5 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados 3,75 mL de água destilada e após o resfriamento, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1650 PC) em 540 nm. O equipamento foi calibrado (branco) com uma amostra contendo apenas água e reagente DNS, processada da mesma forma que as demais amostras.

Os cálculos das quantidades de açúcar redutor (mg/amostra) foram realizados a partir de uma curva analítica, em triplicata, contendo cinco pontos utilizando de maneira interpolada três soluções preparadas a partir do padrão de glucose 1 mg/mL, utilizando o *software* Excel.

#### 4.4.5 Monitoramento da Eficiência da Derivatização

O monitoramento e comprovação da eficiência da derivatização primária foram realizados no Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná através da técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), em espectrômetro Varian 640-IR com acessório MIRacle ATR (PIKE Technologies) e detector seleneto de zinco (ZnSe), na faixa de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e 52 scans por amostra.

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

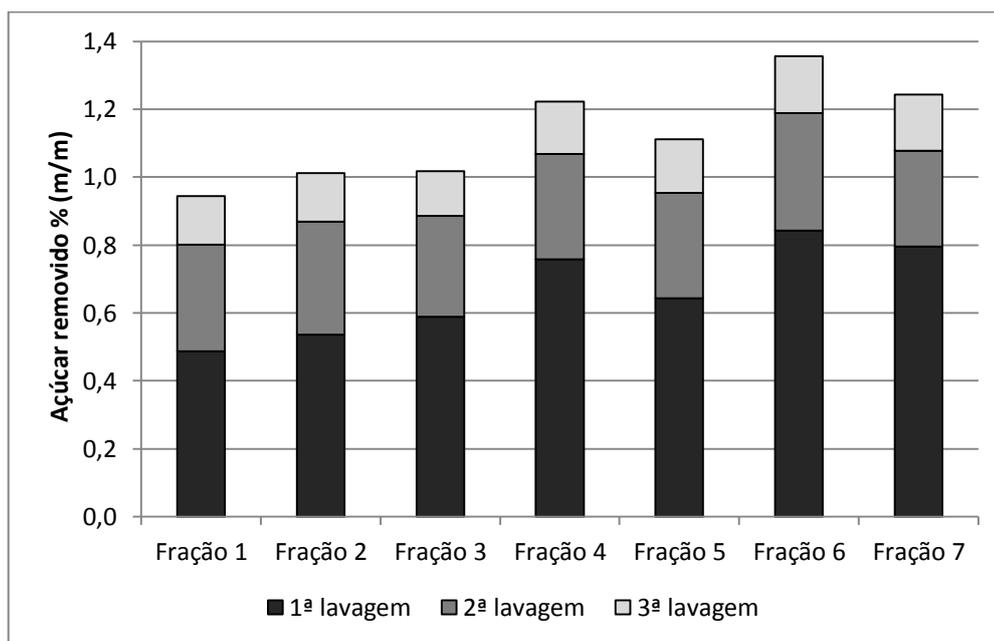
Os parâmetros estudados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a fim de avaliar a normalidade da distribuição dos dados, que estão apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças foram testadas pelos testes t de Student bicaudal, ANOVA e teste de Tukey. A associação linear das variáveis foi avaliada pelo teste de correlação de Pearson. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todos os dados foram analisados utilizando o programa Statistica (Statsoft Inc. USA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PROCESSAMENTO DO BAGAÇO DE CANA

#### 5.1.1 Remoção da Sacarose Residual

As frações obtidas a partir do BC foram submetidas a sucessivas lavagens com água para a remoção da sacarose residual, os resultados obtidos estão representados na Figura 9.



**Figura 9 - Quantidade de açúcar removido pelas lavagens consecutivas das frações do BC com água**

Observa-se que a remoção do açúcar foi mais significativa na primeira lavagem, com valores que variam de 0,5 a 0,8 %. Nas lavagens subsequentes a quantidade de açúcar removido foi consideravelmente inferior, sendo que na terceira lavagem a quantidade de açúcar removido foi praticamente a mesma, independente

da fração de BC, como essa quantidade é relativamente pequena, próximo de 0,15%, conclui-se que uma quarta lavagem não se fazia necessária.

A média total de remoção nas três lavagens foi de 1,1%, atingindo um valor máximo de 1,3% para a fração 6, um pouco inferior aos dados da literatura, onde a sacarose residual no bagaço de cana está na ordem de 3% (Gurgel 2008).

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS PERDAS DURANTE A MERCERIZAÇÃO

Para a análise do planejamento fatorial, descrito na Tabela 5, dos experimentos de mercerização do bagaço de cana de açúcar foram analisadas as respostas: remoção de lignina e hemicelulose, fluxo de coluna e ainda o ensaio de resistência à hidrólise através de enzimas celulolíticas / hemicelulolíticas.

**Tabela 5 - Planejamento fatorial fracionário experimental para a mercerização do bagaço de cana**

#	Tamanho de partícula (fração)		NaOH (% m/m)		NaOH (mL)	
BC 1	2	(-)	1,0	(-)	20	(-)
BC 2	2	(-)	5,5	0	100	(+)
BC 3	2	(-)	10,0	(+)	60	0
BC 4	4	0	1,0	(-)	100	(+)
BC 5.1	4	0	5,5	0	60	0
BC 5.2	4	0	5,5	0	60	0
BC 5.3	4	0	5,5	0	60	0
BC 6	4	0	10,0	(+)	20	(-)
BC 7	6	(+)	1,0	(-)	60	0
BC 8	6	(+)	5,5	0	20	(-)
BC 9	6	(+)	10,0	(+)	100	(+)

Na figura 10 estão apresentados os aspectos físicos finais do BC antes e após o tratamento de mercerização, para cada um dos pontos do planejamento experimental. Percebe-se que a medida que ocorre um aumento na concentração do álcali, há uma mudança visual no aspecto físico das amostras, com uma aparente compactação das amostras e aumento na superfície de contato das mesmas.

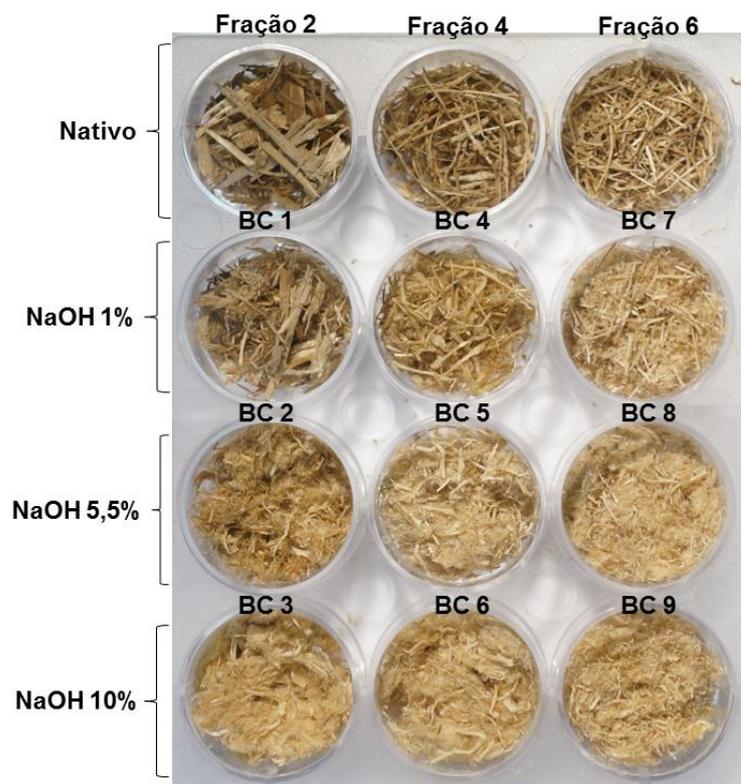
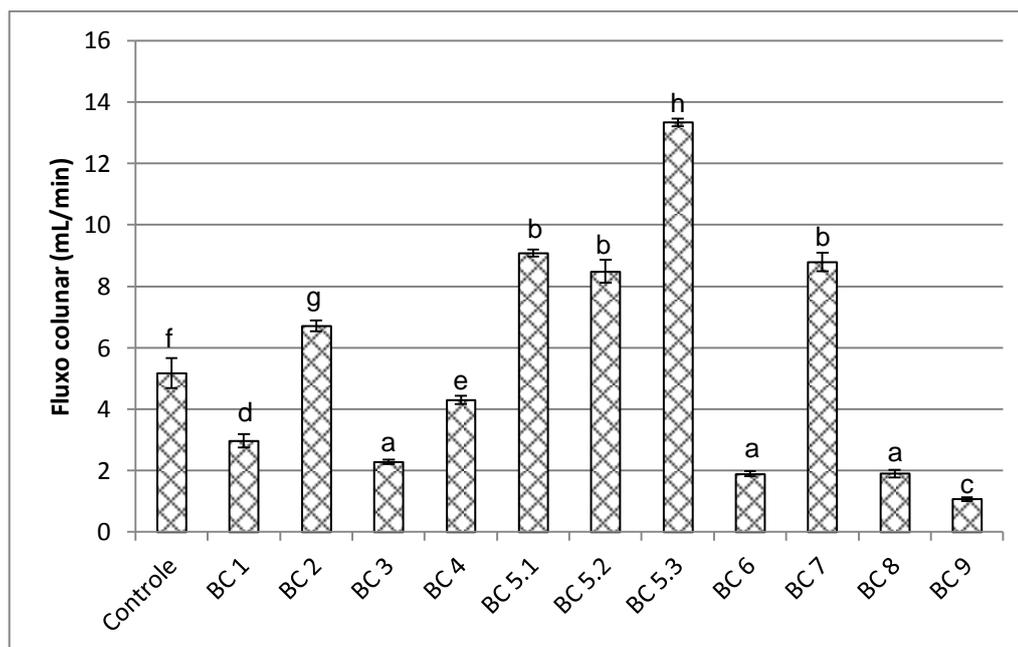


Figura 10 - Aspecto físico final do BC após tratamento de mercerização

### 5.2.1 Determinação de Fluxo de Coluna

O fluxo de coluna foi calculado segundo o procedimento descrito no item 4.4.1 para todos os pontos do planejamento e para o controle que não sofreu ação de mercerização do álcali, as respostas obtidas estão apresentadas na figura 11.



**Figura 11 - Estimativa de fluxo em colunas preenchidas com os materiais**  
**NOTA: As letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey para o fluxo colunar**

A diferença observada entre a repetição do ponto central pode ser explicada pela forma manual de montagem das colunas, podendo então apresentar diferentes graus de compactação.

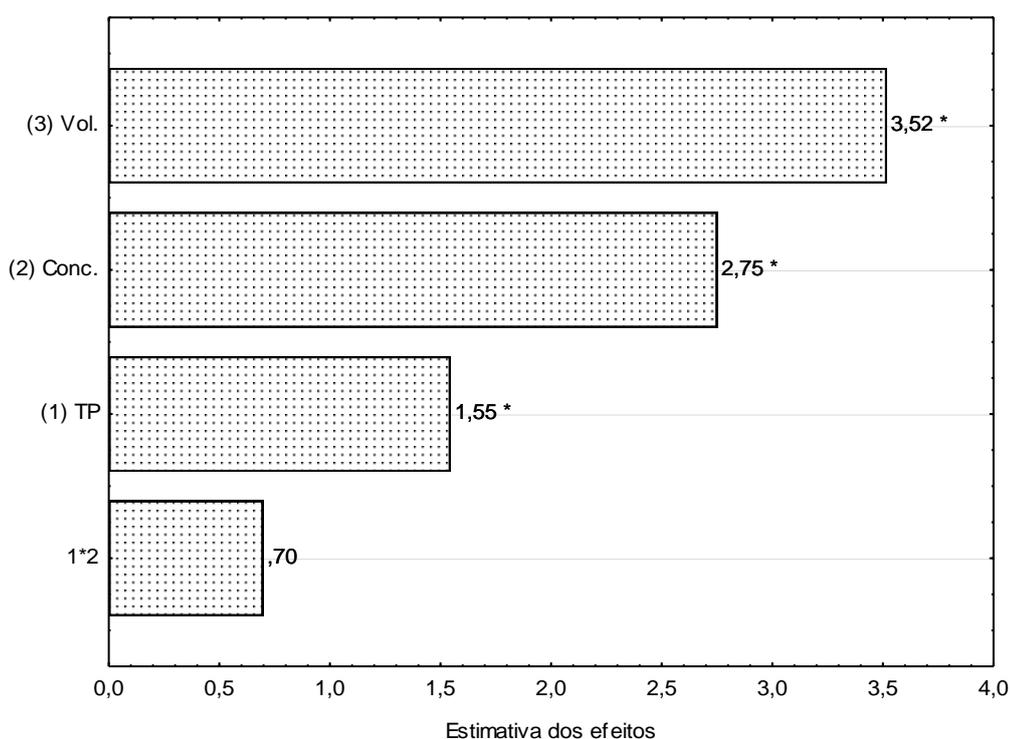
A partir da análise do planejamento fatorial da resposta de fluxo de coluna foi possível observar uma correlação quadrática de  $R^2 = 0,68$  e  $R\text{-Ajustado} = 0,63$ . Conforme mostrado na Tabela 6, a ANOVA não foi significativa apenas para a interação secundária entre o tamanho de partícula e a concentração de NaOH (1\*2).

Para as demais variáveis a significância foi confirmada com valores de  $F_{1,24} > 5,72$  e  $p < 0,05$ . Ressaltando que a variável concentração de NaOH foi a mais significativa, com o valor de F foi bem acima do tabelado e valor de  $p \leq 0,0001$ , indicando grande influência na resposta do fluxo colunar.

**Tabela 6 - ANOVA para ajuste quadrático do planejamento  $3^{3-1}$  para a mercerização do bagaço de cana na resposta de fluxo colunar**

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Tamanho de partícula	16,83	1	16,83	9,46	0,0052
(2) Conc. NaOH (% m/m)	53,33	1	53,33	29,96	0,0000
(3) Vol. NaOH (mL)	37,13	1	37,13	20,86	0,0001
1*2	1,52	1	1,52	0,86	0,3638
Falta de Ajuste	112,43	4	28,11	15,79	0,0000
Erro Puro	42,71	24	1,78		
Total SQ	478,31	32			

A significância dos efeitos, calculada a partir do erro padrão, de primeira (0,50) e de segunda ordem (0,75) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,24} = 2,064$  resulta em 1,03 e 1,55 mL.min<sup>-1</sup> de fluxo, respectivamente. A partir disto observa-se na Figura 12 que o efeito mais importante para o aumento do fluxo de coluna foi o volume de NaOH (mL), seguido da concentração de NaOH (% m/m) e tamanho de partícula, enquanto o efeito da interação secundária entre a primeira e a segunda variável não foi significativa.



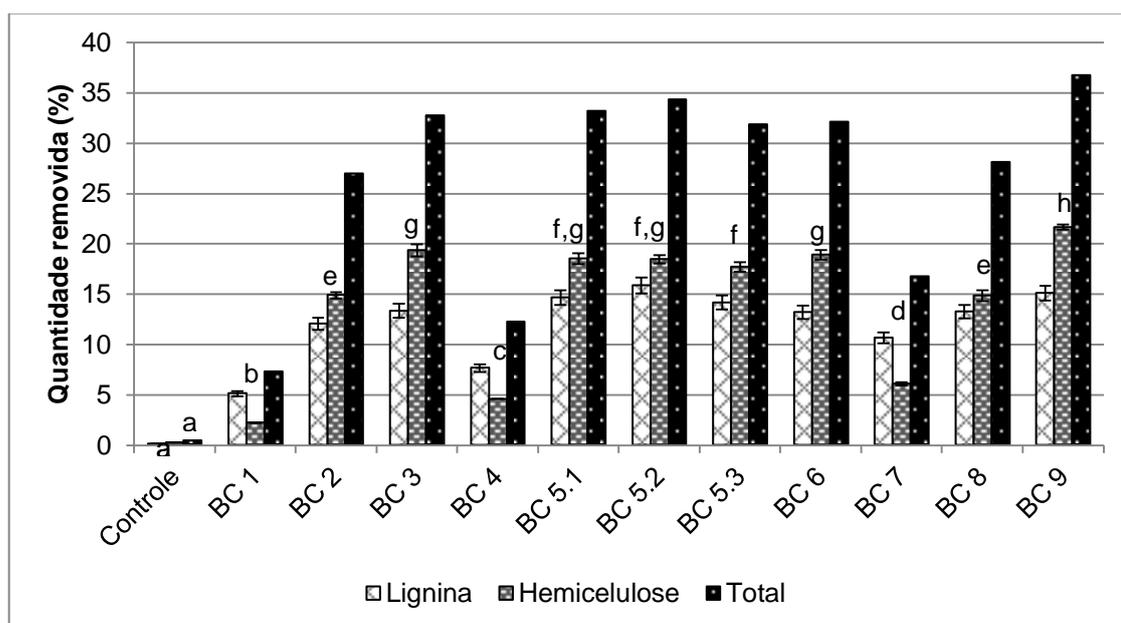
**Figura 12 - Estimativa dos efeitos para o fluxo de coluna (mL.min<sup>-1</sup>) do bagaço de cana mercerizado**

**NOTA: Valores significativos representados pelo asterisco e acima de 1,03 e 1,55 mL.min<sup>-1</sup> para os efeitos primários e secundários, respectivamente.**

### 5.2.2 Remoção de Lignina e Hemicelulose

A quantidade removida de lignina e hemicelulose pelo processo de mercerização foi avaliada para todos os pontos do planejamento experimental e também para uma amostra controle (fração de BC intermediária e sem a presença do álcali), as respostas obtidas estão apresentadas na figura 13. Observa-se nos

experimentos que receberam soluções de 5,5 e 10 % de NaOH (BC 2, BC 3, BC 5, BC 6, BC 8 e BC 9) tiveram uma liberação de lignina maior, em torno de 13,97 %, do que aqueles que receberam a solução menos concentrada de 1 % (BC 1, BC 4 e BC 7), em que a liberação foi na ordem de 7,82 %. Com relação a liberação de hemicelulose, a amostra BC 9 (menor tamanho de partícula e níveis máximos de concentração e volume de NaOH) apresentou perda de 21,67 %, enquanto a amostra com os menores níveis apresentou perda de apenas 2,22 %, ou seja 9,8 vezes mais liberação de hemicelulose. Estas cifras parcializadas ou somadas devem ser confrontadas com o *totum* teórico de hemicelulose + lignina (30 + 20 =), portanto em torno de 50% da biomassa seca original, sendo que esta amostra BC 9 apresentou um total de perdas de 37%.



**Figura 13 – Quantidade de lignina e hemicelulose removidas durante o processo de mercerização do BC**

**NOTA: As letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey para a remoção de hemicelulose.**

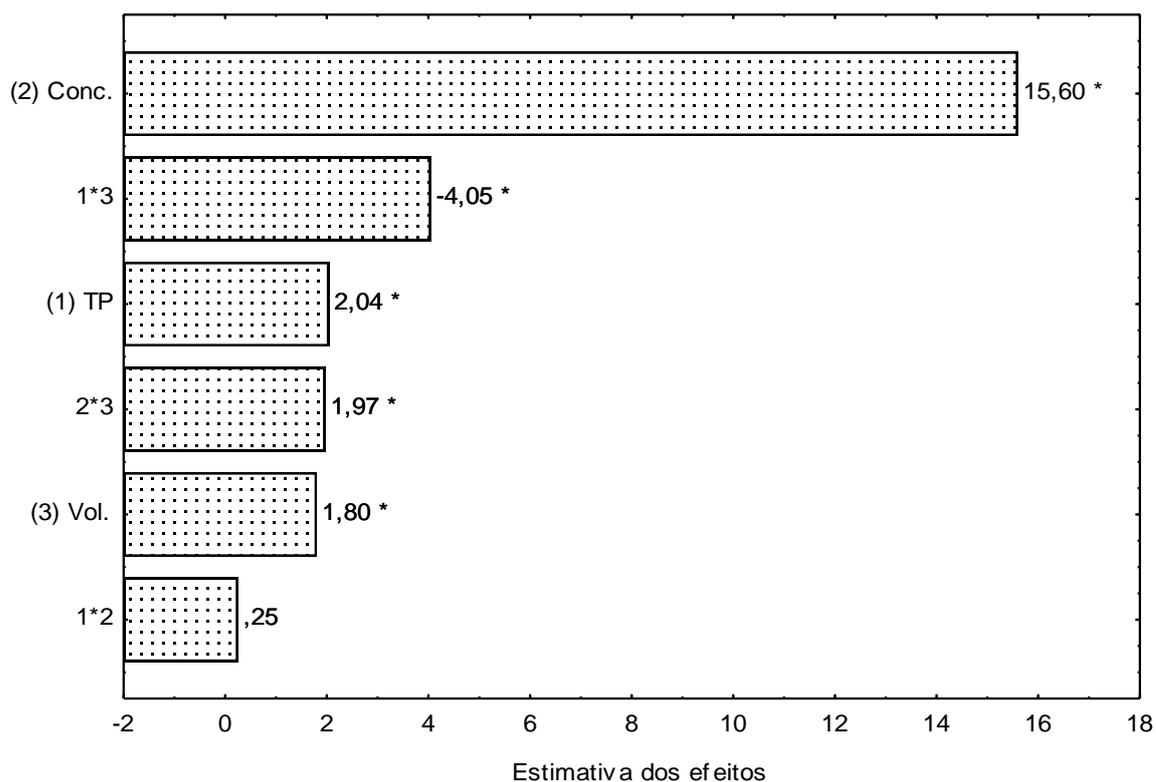
A partir da análise do planejamento fatorial da resposta de liberação de hemicelulose foi possível observar uma correlação linear de  $R^2 = 0,86$  e  $R\text{-Ajustado} = 0,82$ . Conforme mostrado na Tabela 7, a ANOVA não foi significativa apenas para a interação secundária entre o tamanho de partícula e a concentração de NaOH (1\*2). Para as demais variáveis a significância foi confirmada com valores de  $F_{1,24} >$

5,72 e  $p < 0,05$ , ou seja, para as interações secundárias entre o tamanho de partícula e o volume de NaOH (1\*3) e entre a concentração e o volume de NaOH (2\*3), além das variáveis isoladas. Ressaltando que a variável concentração de NaOH foi a mais significativa, com o valor de F foi bem acima do tabelado e valor de  $p \leq 0,0001$ , indicando grande influência na resposta de liberação de hemicelulose.

**Tabela 7 - ANOVA para ajuste linear do planejamento  $3^{3-1}$  para a mercerização do bagaço de cana na resposta de remoção de hemicelulose**

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Tamanho de partícula	18,80	1	18,80	88,15	0,0000
(2) Conc. NaOH (% m/m)	1095,35	1	1095,35	5136,52	0,0000
(3) Volume NaOH (mL)	14,66	1	14,66	68,73	0,0000
1*2	0,13	1	0,13	0,59	0,4498
1*3	32,79	1	32,79	153,77	0,0000
2*3	7,77	1	7,77	36,45	0,0000
Falta de Ajuste	189,46	2	94,73	444,22	0,0000
Erro Puro	5,12	24	0,21		
Total SQ	1358,91	32			

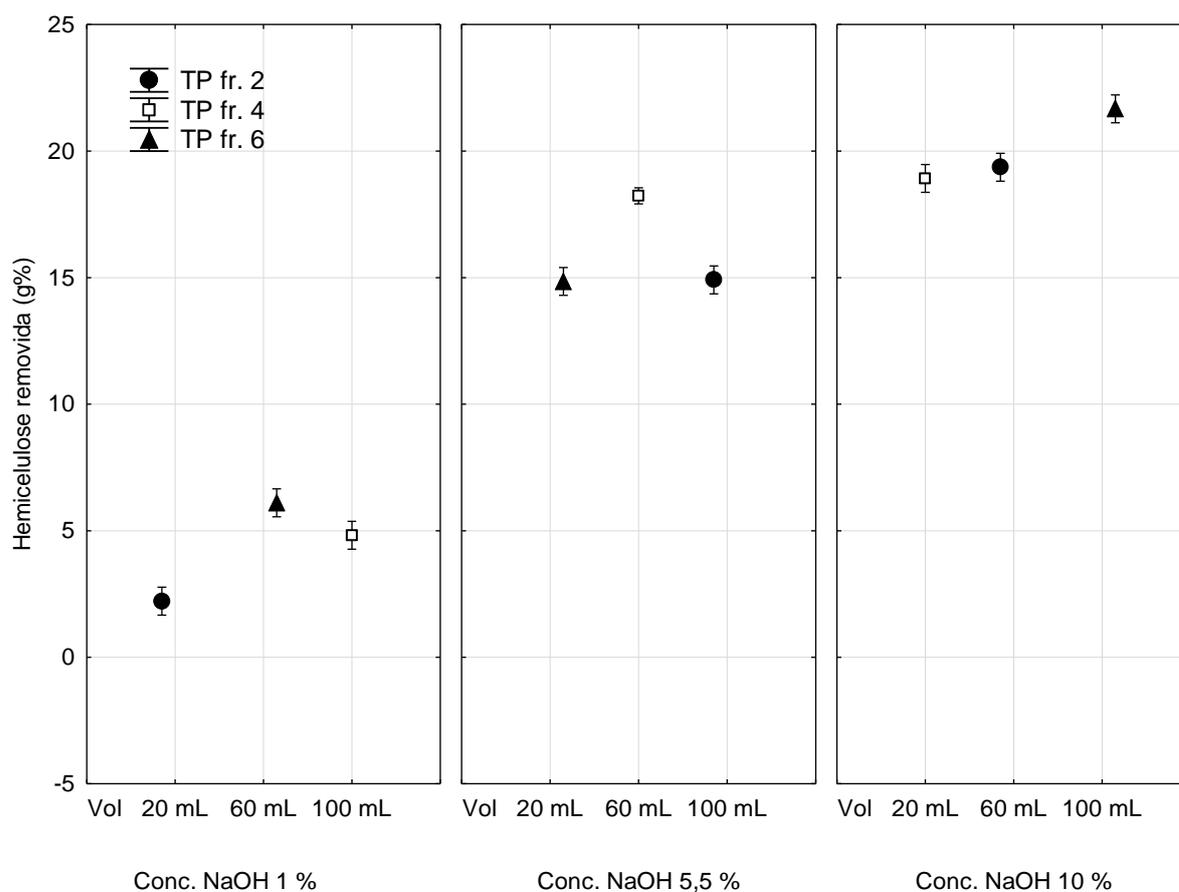
A significância dos efeitos, calculada a partir do erro padrão, de primeira (0,22) e de segunda ordem (0,33) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,24} = 2,064$  resulta em 0,45 e 0,68 % de remoção de hemicelulose, respectivamente. A partir destes valores observa-se na Figura 14 mais claramente que o efeito mais importante para o aumento da remoção de hemicelulose foi a concentração de NaOH (% m/m), quando eleva-se a concentração do menor para o maior valor a liberação de hemicelulose aumenta em 15,6%. Já para a redução da remoção de hemicelulose, o efeito observado foi na interação entre o tamanho de partícula e o volume de NaOH (1\*3).



**Figura 14 - Estimativa dos efeitos para a remoção de hemicelulose (%) na mercerização do bagaço de cana**

**NOTA: Valores significativos representados pelo asterisco e acima de 0,45 e 0,68 % para os efeitos primários e secundários, respectivamente.**

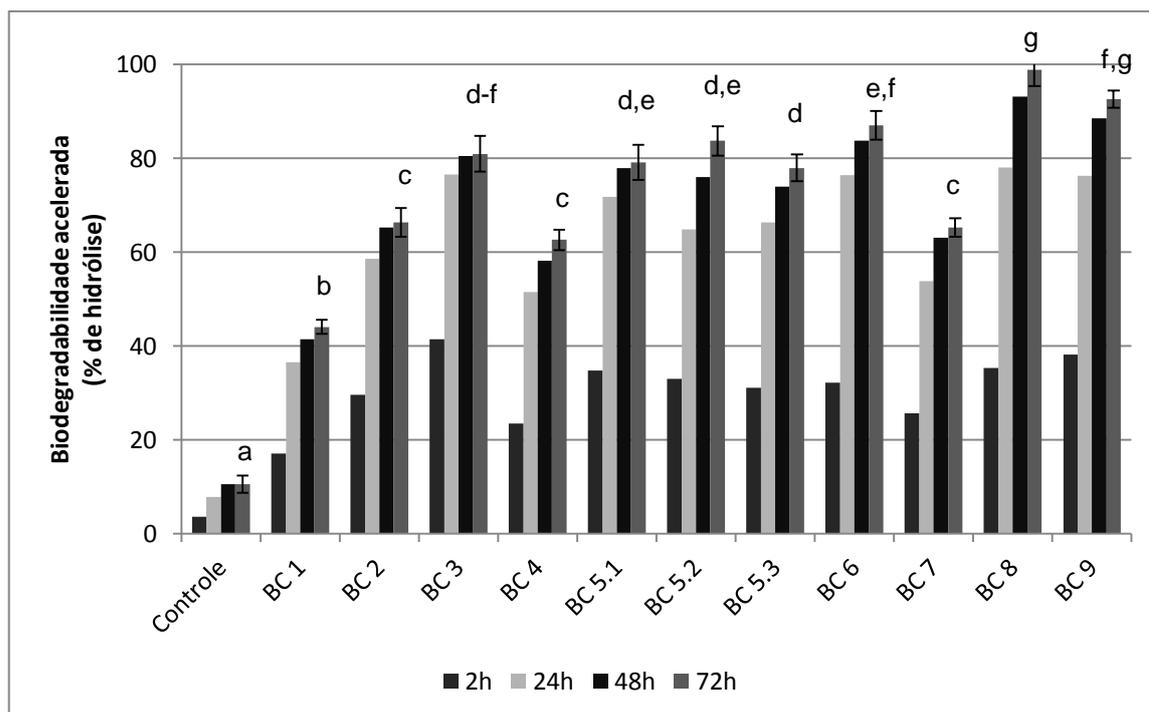
Analisando as médias apresentadas na figura 15 percebe-se que o tamanho de partícula apesar de ser uma variável significativa para a remoção de hemicelulose, sua influencia não se compara à da concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada.



**Figura 15 - Gráfico das médias de hemicelulose removida na mercerização do BC**

### 5.2.3 Teste de Resistência à Depolimerização Enzimática

Foi realizado o teste resistência à hidrólise enzimática ou de biodegradabilidade acelerada para todos os pontos do planejamento experimental e para a amostra controle, foram calculadas as porcentagens de hidrólise para os tempos 2, 24, 48 e 72 horas, os resultados obtidos estão apresentados na figura 16. Este teste foi realizado com o intuito de que uma modificação na estrutura do BC provocada pela ação do álcali, além da remoção parcial da hemicelulose e lignina, favorece a ação das enzimas celulolíticas, elevando seu potencial de hidrólise para esse substrato (ROCHA *et al.*, 2011).



**Figura 16 - Biodegradabilidade acelerada dos materiais em % de hidrólise**

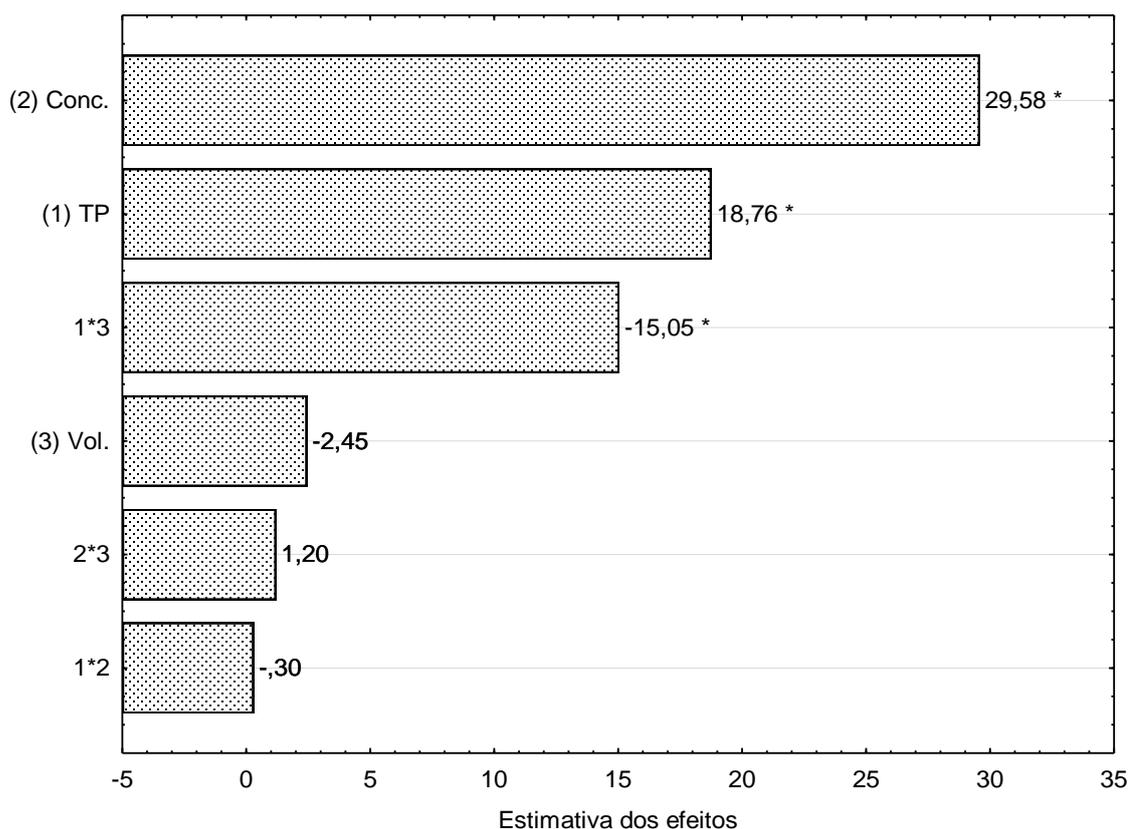
**NOTA:** As letras representam diferença estatística determinada pelo teste de Tukey para 72 h no teste de biodegradabilidade das amostras

Com base na análise do planejamento fatorial para as amostras no tempo de 72 h, foi possível observar uma correlação linear de  $R^2 = 0,92$  e  $R\text{-Ajustado} = 0,90$ . Conforme mostrado na Tabela 8, a ANOVA não foi significativa para a variável volume de solução (3), para as interações secundárias entre o tamanho da partícula e a concentração de NaOH (1\*2) e também entre concentração e o volume de NaOH (2\*3). Para as demais variáveis a significância foi confirmada com valores de  $F_{1,24} > 5,72$  e  $p < 0,05$ . Ressalvando que, assim como nas respostas anteriores de remoção de hemicelulose e lignina, a variável concentração de NaOH foi a mais significativa, com o valor de F foi bem acima do tabelado e valor de  $p \leq 0,0001$ , indicando grande influência na respostas.

**Tabela 8 - ANOVA para ajuste linear do planejamento  $3^{3-1}$  para a mercerização do bagaço de cana na resposta de degradação acelerada por enzimas celulolíticas**

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Tamanho de partícula	1584,30	1	1584,30	182,40	0,0000
(2) Conc. NaOH (% m/m)	3938,35	1	3986,35	453,43	0,0000
(3) Volume NaOH (mL)	27,04	1	27,04	3,11	0,0904
1*2	0,18	1	0,18	0,02	0,8874
1*3	452,83	1	452,83	52,13	0,0000
2*3	2,88	1	2,88	0,33	0,5702
Falta de Ajuste	306,78	2	153,39	17,66	0,0000
Erro Puro	208,46	24	8,69		
Total SQ	6707,00	32			

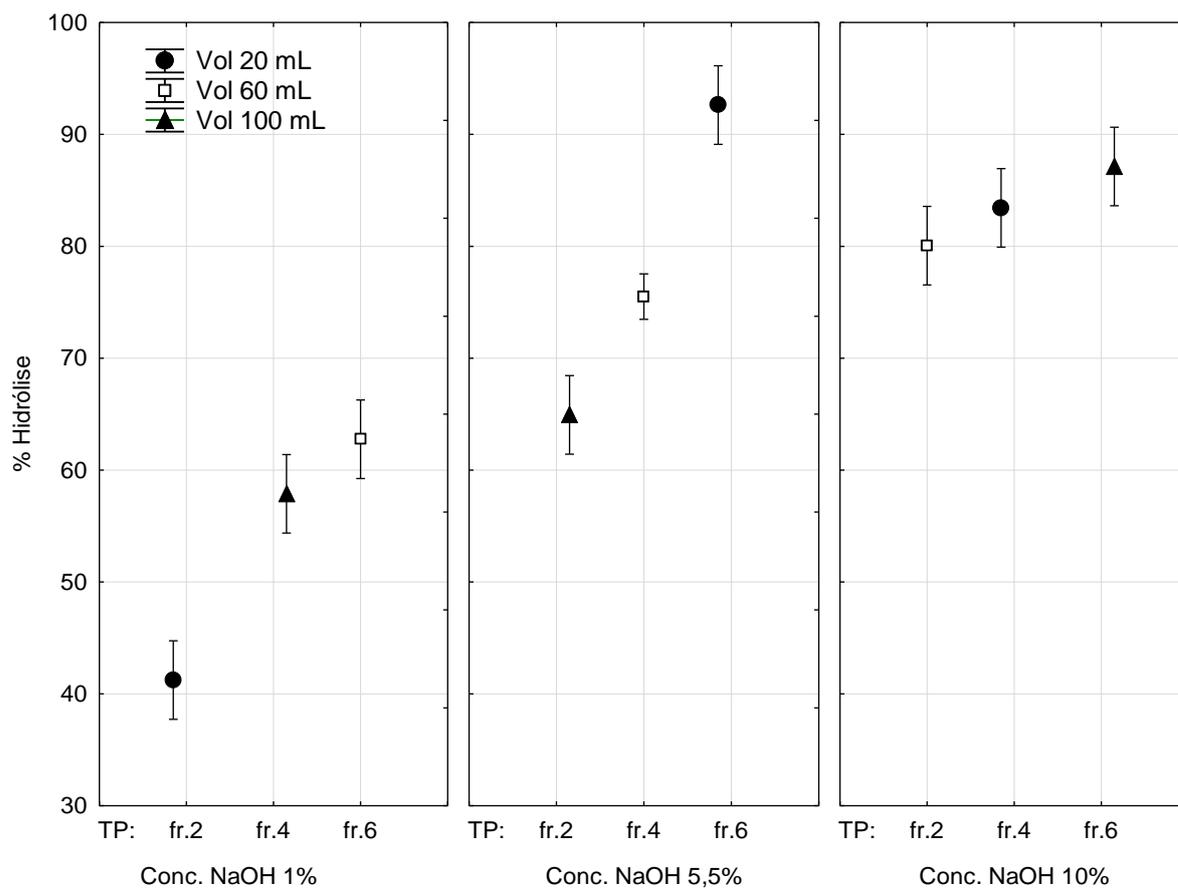
A significância dos efeitos, calculada a partir do erro padrão, de primeira (1,39) e de segunda ordem (2,08) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,24} = 2,064$  resulta em 2,87% e 4,29 % de hidrólise, respectivamente. A partir destes valores observa-se na Figura 17 que o efeito mais importante para o aumento da biodegradabilidade dos resíduos de bagaço de cana mercerizados foi a concentração de NaOH (% m/m). Enquanto que os efeitos de redução da biodegradabilidade frente às enzimas celulolíticas são causados pela interação das variáveis tamanho de partícula e volume de NaOH (1\*3).



**Figura 17 - Estimativa dos efeitos para teste de degradabilidade acelerada (% hidrólise) para o bagaço de cana mercerizado**

**NOTA: Valores significativos representados pelo asterisco e acima de 2,87% e 4,29 % para os efeitos primários e secundários, respectivamente.**

Analisando as médias apresentadas na Figura 18 vê-se que a variação do tamanho de partícula altera significativamente a biodegradabilidade do material, a fração 6, que corresponde aos menores tamanhos de partícula analisados apresentaram a maior porcentagem de hidrólise para todas as concentrações de NaOH, independente do volume de solução utilizada.



**Figura 18 - Gráfico das médias de porcentagem de hidrólise no teste de degradabilidade acelerada das amostras de bagaço de cana mercerizado**

### 5.3 AVALIAÇÃO DAS PERDAS DURANTE A DERIVATIZAÇÃO

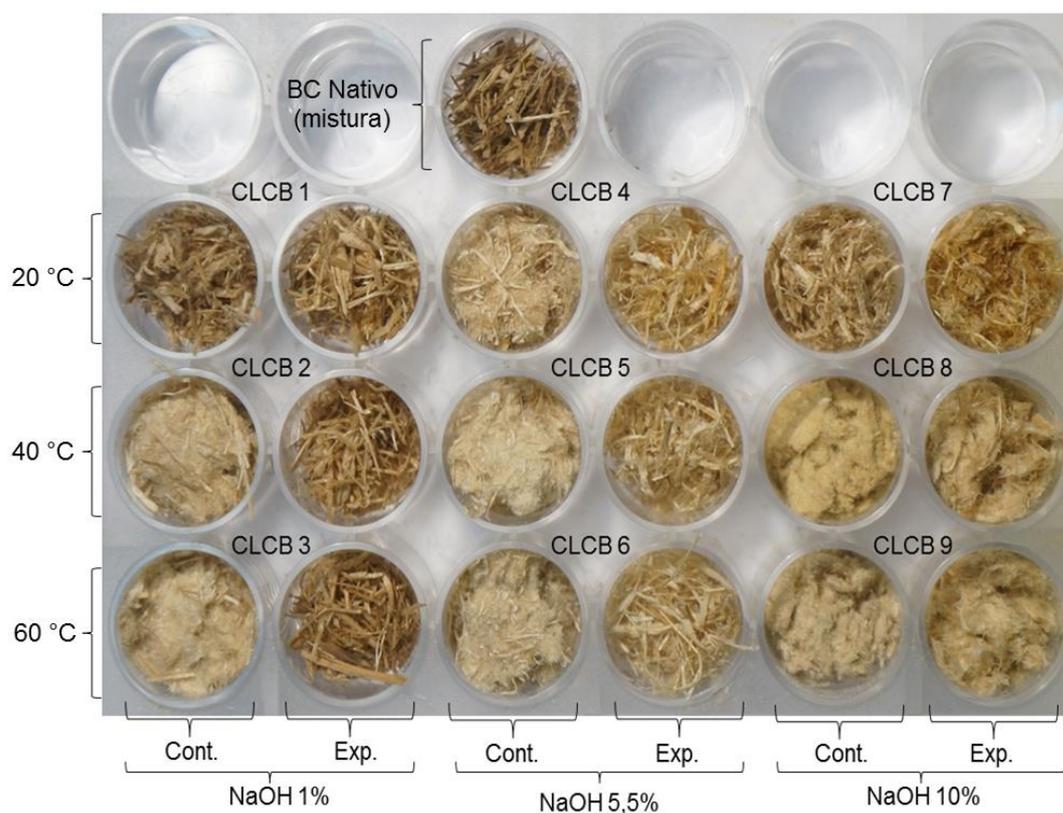
Para o experimento de derivatização do bagaço de cana foi realizado o planejamento fatorial descrito na Tabela 9, o mesmo planejamento foi repetido sem a adição do agente interligante para o controle das respostas.

As respostas analisadas foram: fluxo de coluna (4.4.1), remoção de lignina (4.4.2), hemicelulose removida (4.4.3), e ainda o ensaio de resistência à hidrólise enzimática (4.4.4).

**Tabela 9 - Planejamento fatorial fracionário experimental para a derivatização do bagaço de cana**

#	NaOH (% m/m)		Tempo (h)		Temperatura (°C)	
CLCB 1	1,0	(-)	6	(-)	20	(-)
CLCB 2	1,0	(-)	24	(+)	40	0
CLCB 3	1,0	(-)	15	0	60	(+)
CLCB 4	5,5	0	24	(+)	20	(-)
CLCB 5.1	5,5	0	15	0	40	0
CLCB 5.2	5,5	0	15	0	40	0
CLCB 5.3	5,5	0	15	0	40	0
CLCB 6	5,5	0	6	(-)	60	(+)
CLCB 7	10	(+)	15	0	20	(-)
CLCB 8	10	(+)	6	(-)	40	0
CLCB 9	10	(+)	24	(+)	60	(+)

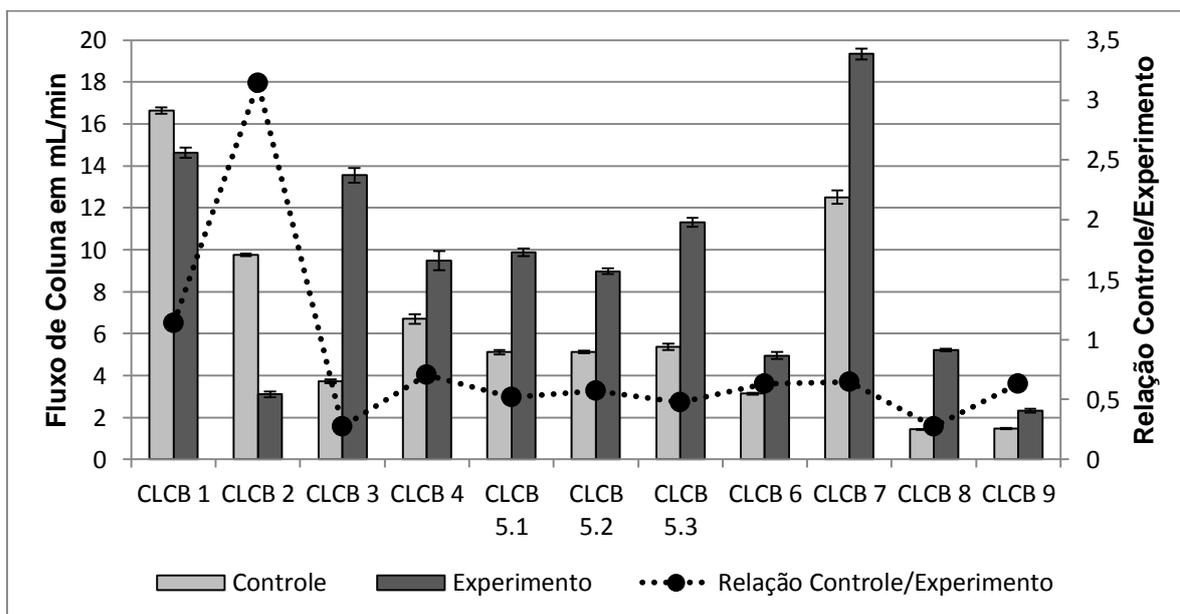
Na figura 19 estão apresentados os aspectos físicos finais do CLCB e seu controle para cada um dos pontos do planejamento experimental. Percebe-se que a medida que ocorre um aumento na concentração do álcali, há uma mudança visual no aspecto físico das amostras, o mesmo ocorre para as diferentes temperaturas utilizadas.



**Figura 19 - Aspecto físico do BC após processo de derivatização primária**

### 5.3.1 Determinação de Fluxo de Coluna

O fluxo colunar foi estimado para todos os pontos do planejamento experimental e seus respectivos controles. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 20.



**Figura 20 - Estimativa de Fluxo Colunar após derivatização primária do BC**

A adição da epicloridrina como agente interligante promoveu um aumento no fluxo de coluna para a maioria dos pontos experimentais, os resultados foram avaliados por teste t de Student bicaudal e todos apresentaram valor de  $p < 0,05$ , mostrando a sua diferença estatística.

O melhor resultado para esta resposta foi o ponto CLCB 7, que apesar de utilizar a solução alcalina mais concentrada não apresentou uma modificação tão significativa em sua estrutura quanto os outros pontos que tiveram a mesma concentração de NaOH, pelo fato da temperatura utilizada nesse ponto ser a mais baixa, 20 °C.

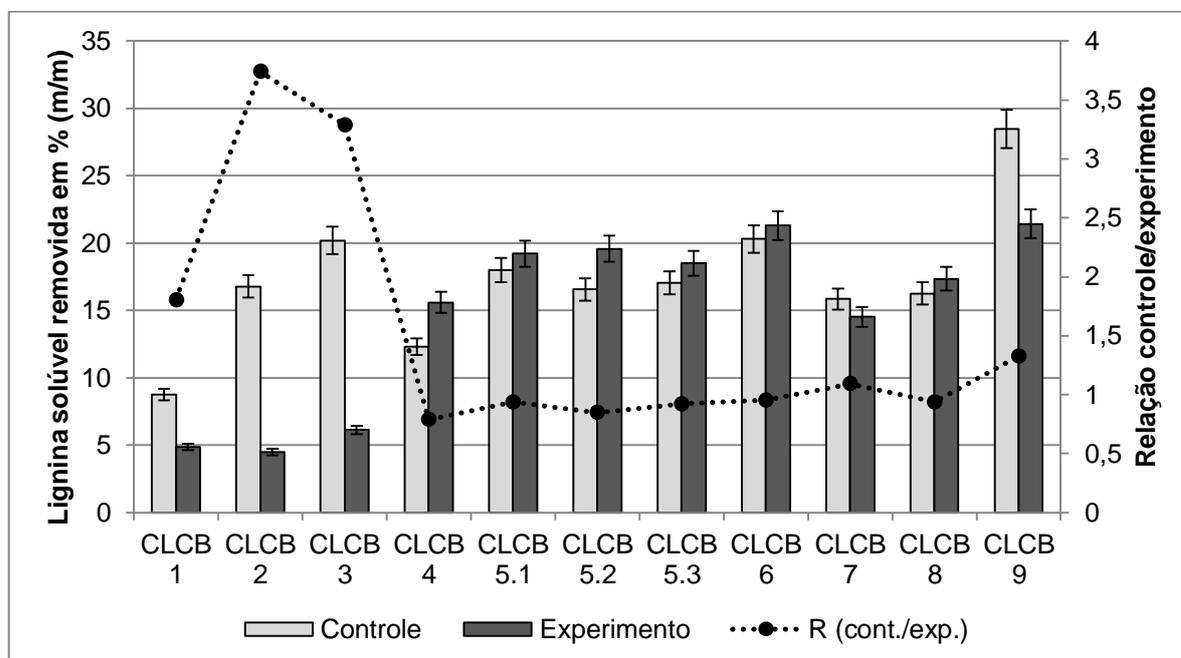
A relação obtida entre as respostas do CLCB e seus controles para o experimento de fluxo colunar não se ajustaram corretamente a um modelo linear,

$R^2= 0,68$ ; e nem a um modelo quadrático,  $R^2= 0,33$ ; portanto não foi possível estimar satisfatoriamente a influência das variáveis para esta resposta.

A falta de ajuste dos dados pode ser consequência do empacotamento manual das colunas, pois esta ação pode ter originado colunas que não tinham o mesmo grau de compactação ou mesmo uma distribuição uniforme do material.

### 5.3.2 Remoção de Lignina e Hemicelulose

A remoção tanto de lignina solúvel, quanto de hemicelulose no processo de derivatização foi avaliada para todos os pontos experimentais e seus respectivos controles. A resposta encontrada para lignina está representada na figura 21, onde foi admitido uma variação de 5% para os valores obtidos, uma vez que não foi possível realizar uma triplicata do experimento.



**Figura 21 - Lignina solúvel removida durante a derivatização primária do BC em % (m/m)**  
**NOTA: As barras de erro representam intervalo de 5% na variação dos dados.**

Os resultados foram avaliados por teste t de Student bicaudal e houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os pontos CLCB 1, 2, 3, 4, 5.2 e 9. Para os demais não houve uma diferença significativa para os valores de lignina solúvel liberada. Apenas nos pontos CLCB 1, CLCB 2, CLCB 3 (NaOH 1 % m/m), e no pontos CLCB 9 (NaOH 10 % m/m) houve uma redução significativa com a adição do interligante, e dentre esses o melhor resultado foi o ponto CLCB 3 onde a redução foi da ordem de 3,3 vezes.

Como os dados de remoção de lignina foram muito variáveis, optou-se por analisar somente a resposta de remoção de hemicelulose pelo planejamento fatorial.

A figura 22 apresenta a quantidade média de açúcares totais removidos que representa a remoção de hemicelulose durante a derivatização do BC.

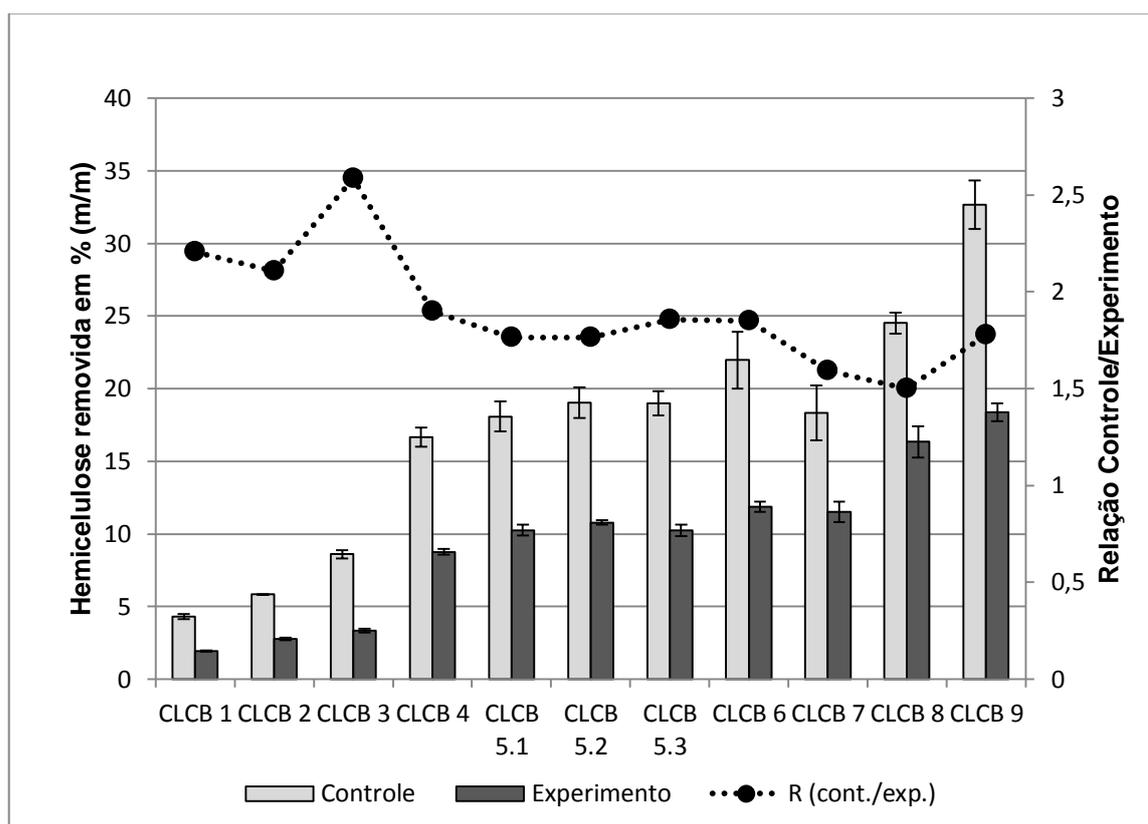


Figura 22 - Açúcares totais removidos durante a derivatização primária do BC

Os resultados foram avaliados por teste t de Student bicaudal e todos apresentaram valor de  $p < 0,05$ , o que indica uma diferença significativa entre o resultado dos experimentos e seus controles.

Claramente os controles que não contavam com o reagente responsável por realizar o interligamento dos componentes do BC, apresentaram uma maior liberação de açúcares álcali solúveis. Isso sugere que os experimentos em que a epícloridrina foi adicionada a reação de *crosslinking*, e a formação do CLCB ocorreu.

A maior redução ocorreu no ponto CLCB 9, em que a quantidade de açúcar liberado foi reduzida em 14%, mas a maior redução proporcional ocorreu no ponto CLCB 3, em que a quantidade de açúcar liberado reduziu 2,6 vezes (de 8,6 % para 3,3 %).

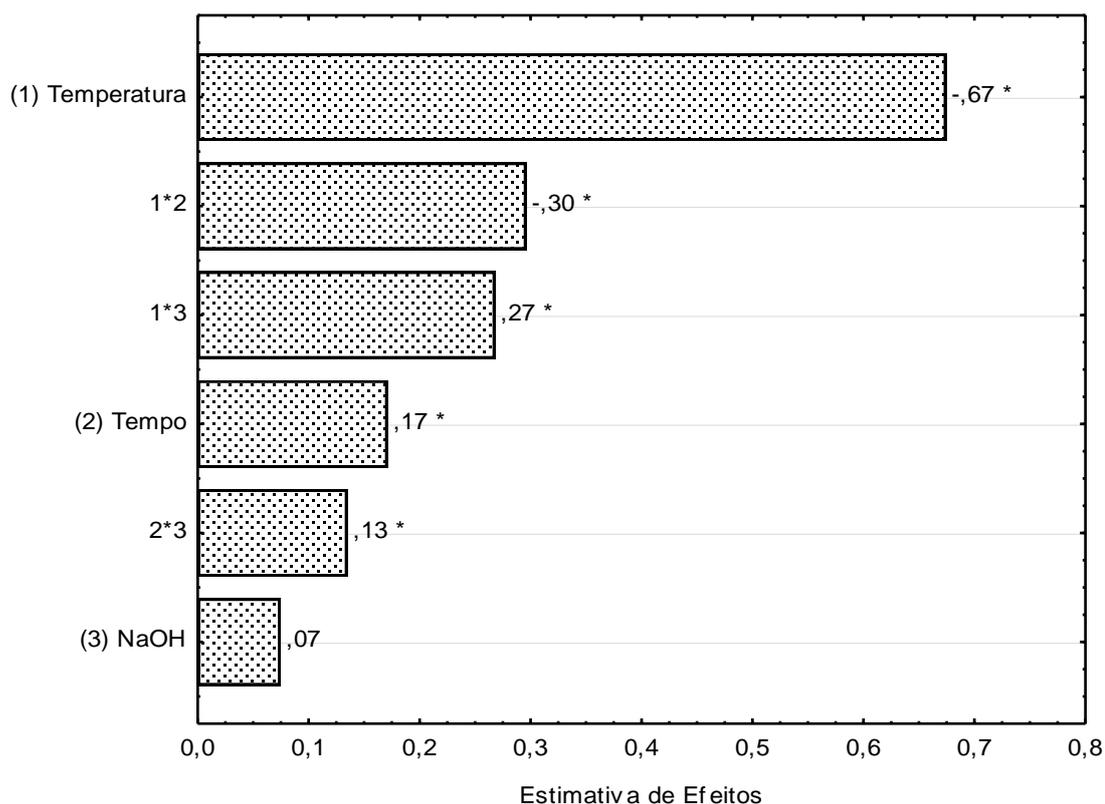
Para analisar o planejamento fatorial para resposta de liberação de hemicelulose utilizou-se a relação da redução de liberação entre o controle e o CLCB em cada ponto, ou seja, quantas vezes o experimento com epícloridrina foi capaz de reduzir a remoção de hemicelulose em relação ao controle. Foi possível observar uma correlação linear de  $R^2 = 0,85$  e  $R\text{-Ajustado} = 0,82$ . Conforme mostrado na Tabela 10, a ANOVA não foi significativa apenas para a concentração de NaOH (3). Para as demais variáveis a significância foi confirmada com valores de  $F_{1,24} > 5,72$  e  $p < 0,05$ , ou seja, para as interações secundárias entre a temperatura e o volume de NaOH (1\*3), entre a temperatura e o tempo (1\*2) e entre o tempo e o volume de NaOH (2\*3), além das variáveis temperatura e tempo isoladamente. Ressaltando que a variável temperatura do experimento foi a mais significativa, com o valor de F foi bem acima do tabelado e valor de  $p \leq 0,0001$ , indicando grande influência na resposta de redução na liberação de hemicelulose.

**Tabela 10 - ANOVA para ajuste linear do planejamento  $3^{3-1}$  para a derivatização do bagaço de cana na resposta de redução na remoção de hemicelulose**

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Temperatura (°C)	2,05	1	2,05	240,57	0,0000
(2) Tempo (h)	0,13	1	0,13	15,49	0,0006
(3) Conc. NaOH (% m/m)	0,02	1	0,03	2,95	0,0988
1*2	0,17	1	0,18	20,62	0,0001
1*3	0,14	1	0,14	16,89	0,0004
2*3	0,04	1	0,04	4,29	0,0495
Falta de Ajuste	0,24	2	0,12	13,92	0,0001
Erro Puro	0,20	24	0,01		
Total SQ	2,93	32			

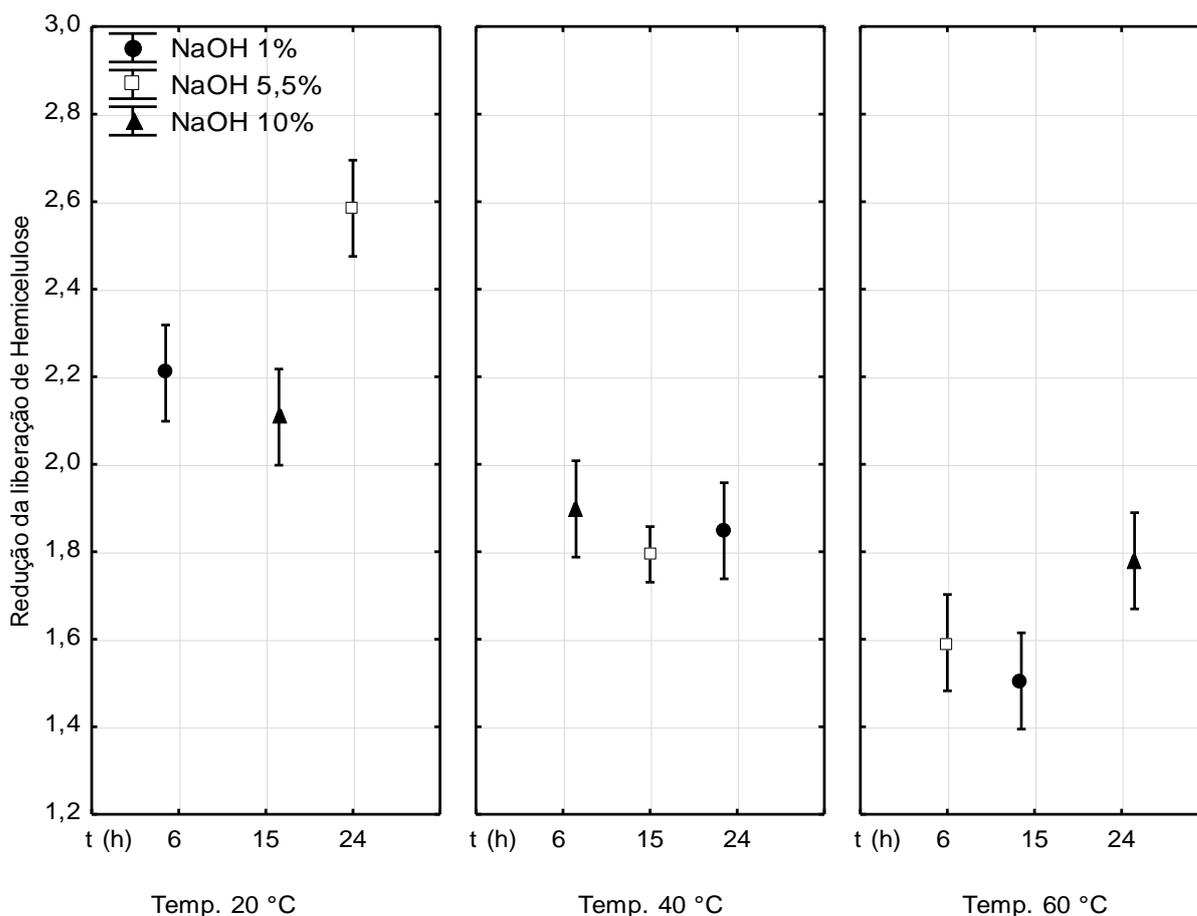
A significância dos efeitos, calculada a partir do erro padrão, de primeira (0,04) e de segunda ordem (0,06) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,24} = 2,064$  resulta

em 0,08 e 0,12 de redução de remoção de hemicelulose, respectivamente. A partir destes valores observa-se claramente na Figura 23 que o efeito mais importante para a redução da remoção de hemicelulose foi a temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), quando elevou-se a temperatura do menor para o maior valor a redução da liberação de hemicelulose diminuiu 0,67 vezes.



**Figura 23 - Estimativa dos efeitos para a redução na liberação de hemicelulose para o CLCB**  
**NOTA: Valores significativos representados pelo asterisco e acima de 0,08 e 0,12 para os efeitos primários e secundários, respectivamente.**

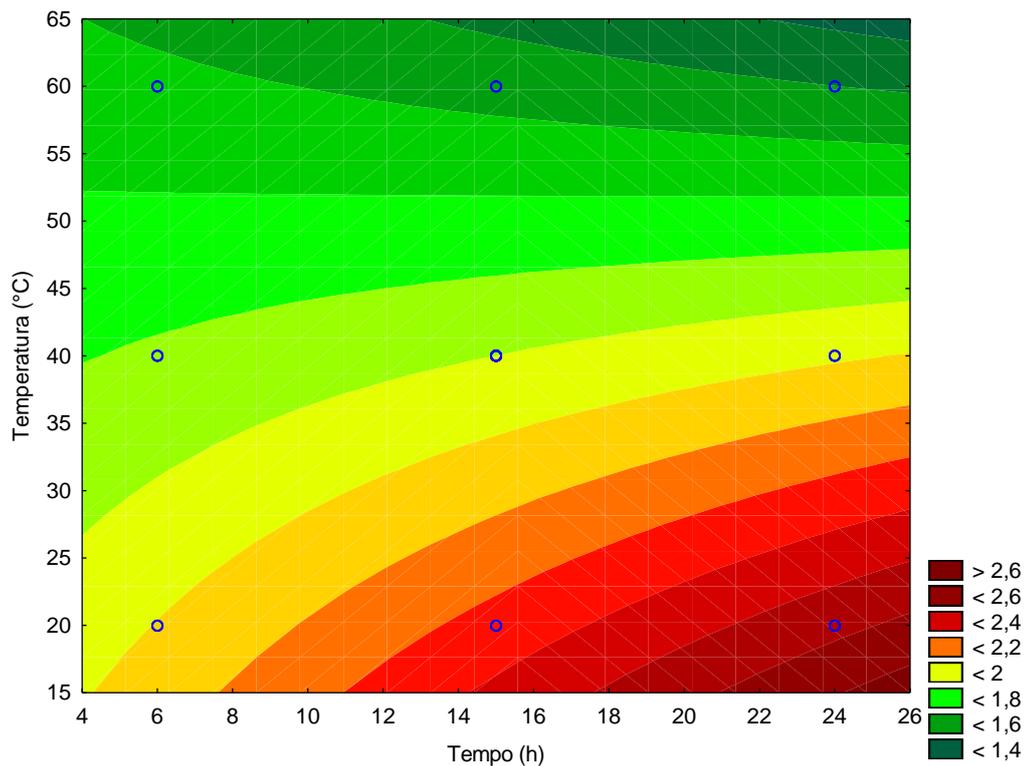
A variável concentração de NaOH não foi significativa para esta resposta, onde observou-se mais claramente a influencia das variáveis para a redução na remoção de hemicelulose a partir do gráfico de médias apresentado na figura 24.



**Figura 24 - Gráfico das médias de hemicelulose removida na derivatização primária do BC**

As médias para redução da liberação de hemicelulose foram menores na temperatura de 60 °C comparadas às médias obtidas em 20 °C. Segundo esse gráfico a maior redução seria obtida em um experimento a 20 °C, utilizando uma solução de NaOH 5,5 % por 24 horas.

Foi ainda gerado o gráfico de contorno para os fatores de maior influência na resposta, para uma fácil avaliação das suas contribuições e relações, o gráfico está representado na figura 25. Observa-se que a redução da liberação da hemicelulose é beneficiada por temperaturas menores e tempos maiores de reação. Para as temperaturas entre 35 e 55 °C, o tempo não apresentou grande influencia na resposta.



**Figura 25 - Gráfico de Contorno para a redução na remoção de hemicelulose**

### 5.3.3 Teste de Resistência à Hidrólise Enzimática

O teste de resistência à hidrólise enzimática foi realizado para todos os pontos do planejamento experimental e seus respectivos controles, foram calculadas as porcentagens de hidrólise para os tempos de 2, 24, 48 e 72 horas de incubação, os resultados obtidos estão apresentados na figura 26.

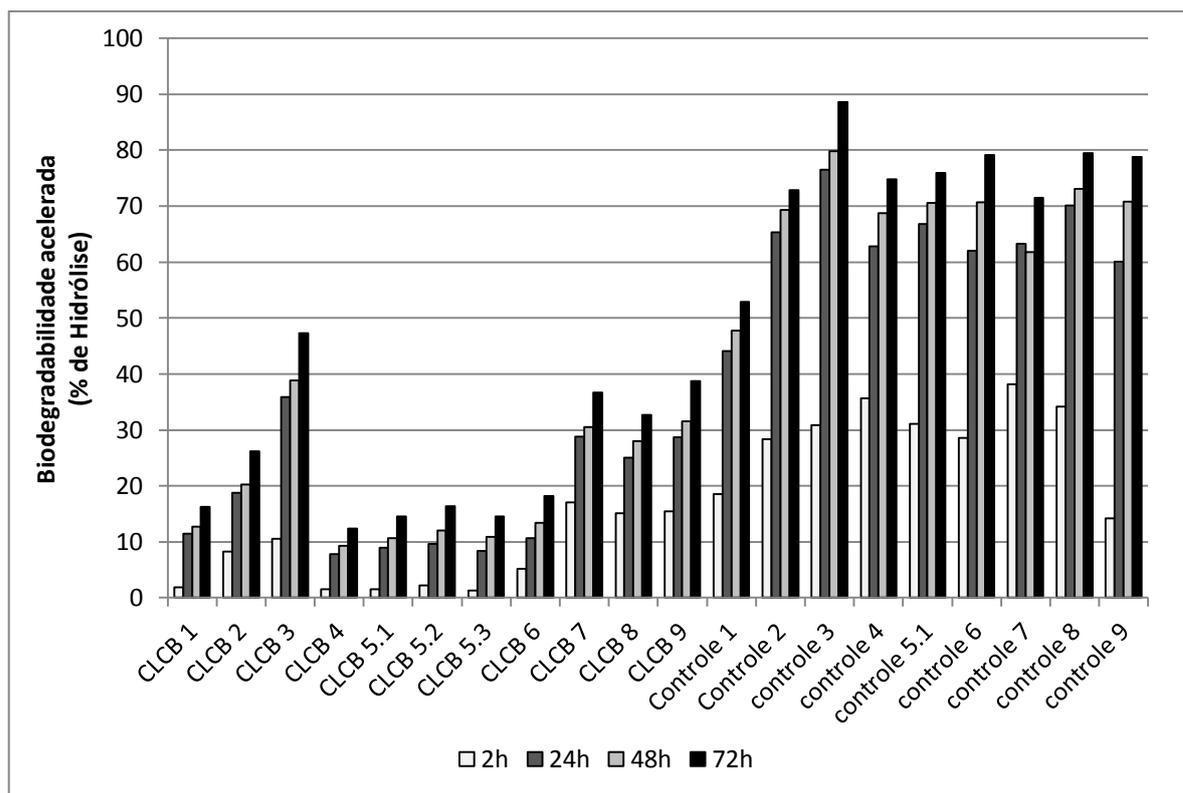


Figura 26 - Teste de degradabilidade enzimática dos materiais em porcentagem de hidrólise

Assim como Laszlo (1998) em seu trabalho, também se verificou que o *cross-linking* dos componentes do BC com a epícloridrina diminuiu significativamente sua biodegradabilidade, o interligamento pode afetar a porosidade superficial e diminuir o grau de penetração das enzimas no substrato. Os resultados foram avaliados por teste t de Student bicaudal e todos apresentaram valor de  $p << 0,05$ , mostrando diferença estatística entre a biodegradabilidade do CLCB e de seus controles.

Para a análise do planejamento fatorial foi usada a resposta para a biodegradabilidade em 72 horas de incubação. As médias obtidas para esse tempo estão apresentadas na figura 27.

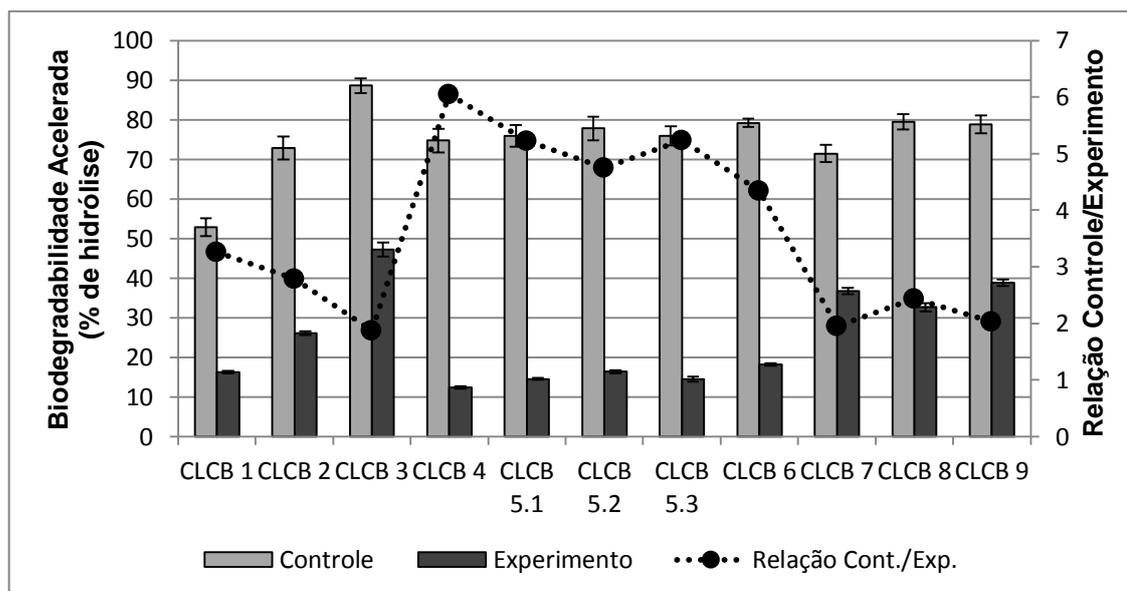


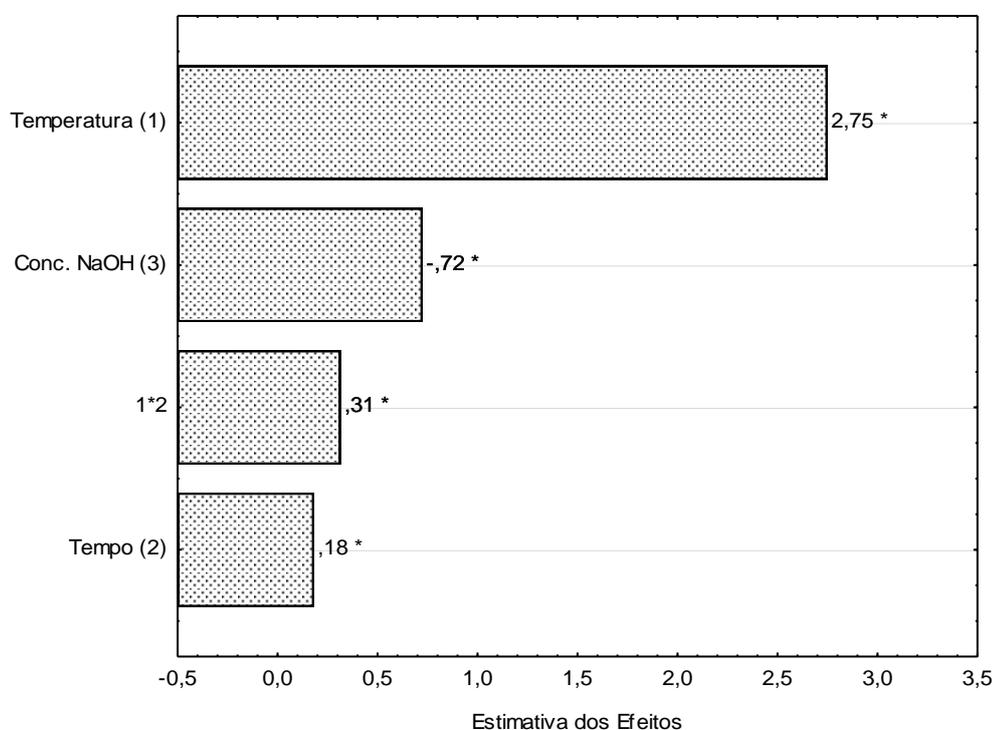
Figura 27 – Degradabilidade enzimática das amostras em porcentagem de hidrólise após 72 horas de incubação

Para analisar o planejamento fatorial para a resposta de biodegradabilidade acelerada utilizou-se novamente a relação de redução da degradabilidade provocada pelo *cross-linking* comparado a seu controle, ou seja, quantas vezes o percentual de hidrólise foi reduzido pela reação de interligamento. Foi possível observar uma correlação quadrática de  $R^2 = 0,89$  e  $R\text{-Ajustado} = 0,88$ . Conforme mostrado na Tabela 11, a ANOVA foi significativa para a interação secundária entre a temperatura e o tempo de reação ( $1^*2$ ) e para as variáveis isoladas. As interações quadráticas secundárias entre temperatura e concentração de NaOH ( $1^*3$ ) e tempo e concentração de NaOH ( $2^*3$ ) foram consideradas redundantes pelo programa Statistica. A significância das variáveis e interações foi confirmada com valores de  $F_{1,24} > 5,72$  e  $p < 0,05$ .

Tabela 11 - ANOVA para ajuste quadrático do planejamento  $3^{3-1}$  para a derivatização do bagaço de cana na resposta de redução da biodegradabilidade

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p
(1) Temperatura (°C)	53,26	1	53,26	1493,16	0,0000
(2) Tempo (h)	0,23	1	0,23	6,50	0,0176
(3) Conc. NaOH (% m/m)	1,57	1	1,57	44,16	0,0000
1*2	0,31	1	0,31	8,69	0,0070
Falta de Ajuste	6,72	4	1,68	47,09	0,0000
Erro Puro	0,86	24	0,04		
Total SQ	70,04	32			

A significância dos efeitos, calculada a partir do erro padrão, de primeira (0,07) e de segunda ordem (0,11) multiplicado pelo valor de  $t_{\text{tab}0,95,24} = 2,064$  resulta em 0,14 e 0,22 respectivamente. A partir disto se observa na Figura 28 que o efeito mais importante para a redução da hidrólise enzimática foi a temperatura do experimento, seguido da interação entre temperatura e tempo de reação (1\*2). Já a variável concentração de NaOH (% m/m) contribui significativamente para um aumento da biodegradabilidade do CLCB, que pode ser ocasionada por uma diminuição da efetividade do interligamento.



**Figura 28 - Estimativa dos efeitos para a redução da biodegradabilidade do CLCB**  
**NOTA: Valores significativos representados pelo asterisco e acima de 0,14 e 0,22 para os efeitos primários e secundários, respectivamente.**

Foi possível observar o comportamento da interação entre as variáveis mais significativas através da superfície de resposta representada na figura 29, que foi gerada para o tempo de 15 horas. A redução na biodegradabilidade foi maior em temperaturas menores, independentemente da concentração de álcali utilizado. Quando se fixa uma concentração qualquer se observa que o aumento da temperatura dificulta a redução da resistência à hidrólise enzimática.

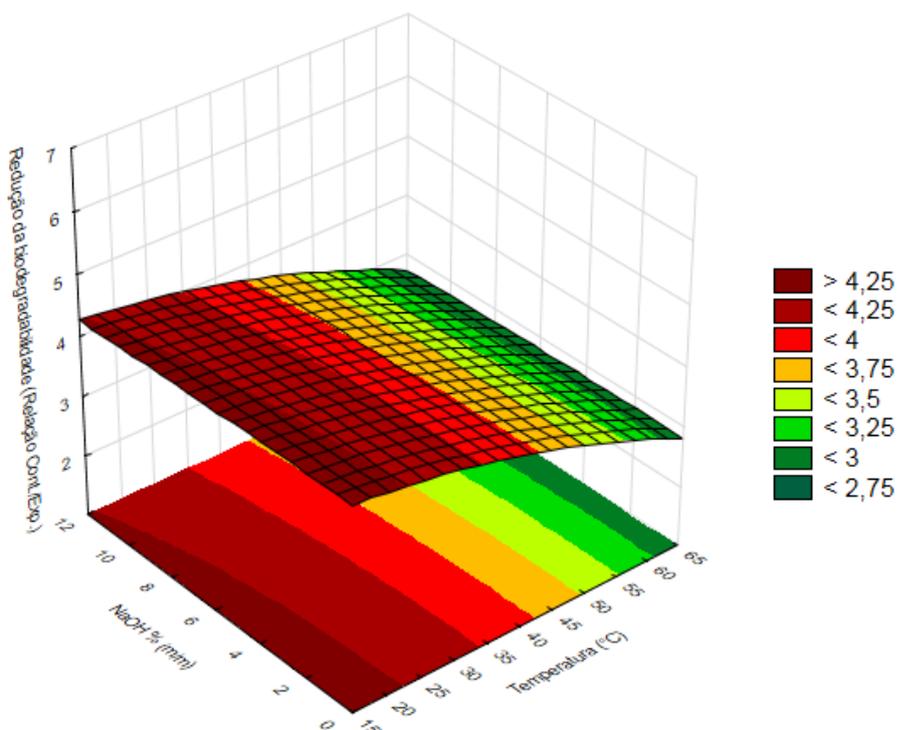


Figura 29 - Superfície de resposta para a redução da hidrólise após derivatização do BC

#### 5.3.4 Monitoramento da eficiência da derivatização

Além dos testes anteriormente descritos e analisados, realizou-se o espectro de FTIR do CLCB e seus controles para verificação da mudança estrutural das amostras.

Os espectros de FTIR na região de  $4000-650\text{ cm}^{-1}$  para os CLCB 3 e CLCB 5.2, seus controles e controles de BC nativo são apresentados na figura 30 e figura 31 respectivamente. Apesar do tratamento de mercerização e derivatização sofrido pelo BC foi difícil observar algumas alterações como a remoção de lignina e hemicelulose ou a modificação na estrutura da celulose.

Possivelmente através da preparação de pastilhas de KBr com amostra de CLCB e BC micropulverizados, a resolução dos espectros pudesse melhorar e as diferenças ficassem mais visíveis. Contudo, como não teve-se acesso a um

equipamento necessário para a micropulverização das amostras de BC não foi possível realizar o pastilhamento.

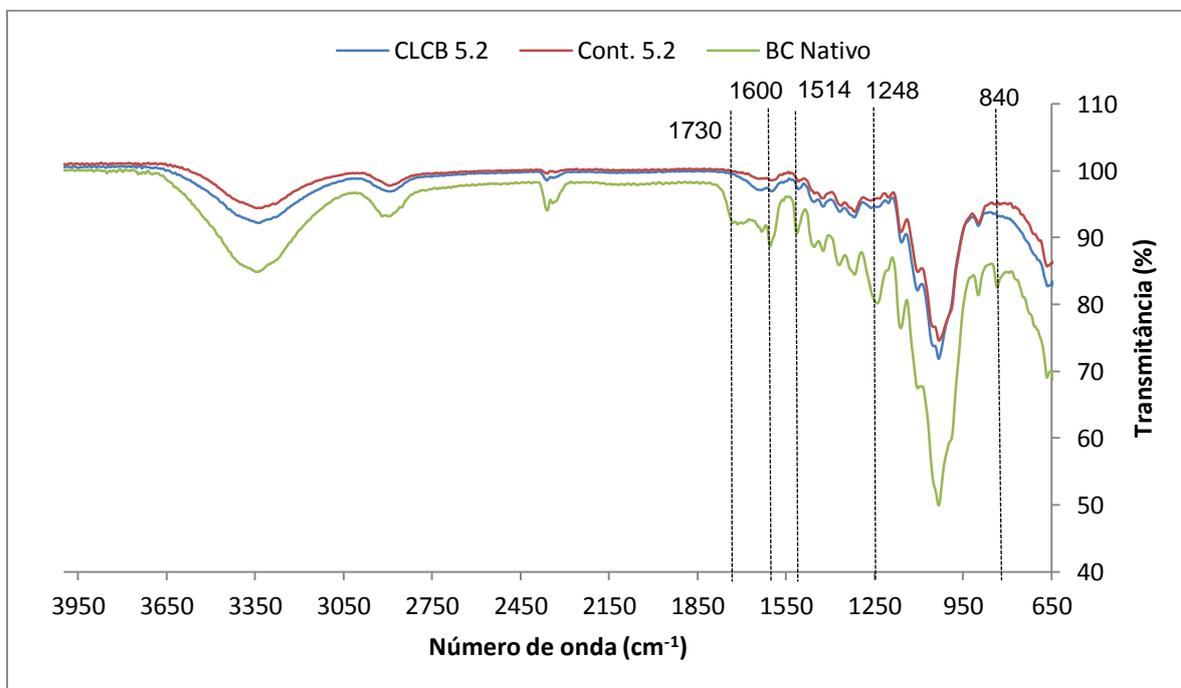


Figura 30 - Espectro de FTIR do CLCB 5.2, Controle 5.2 e BC Nativo

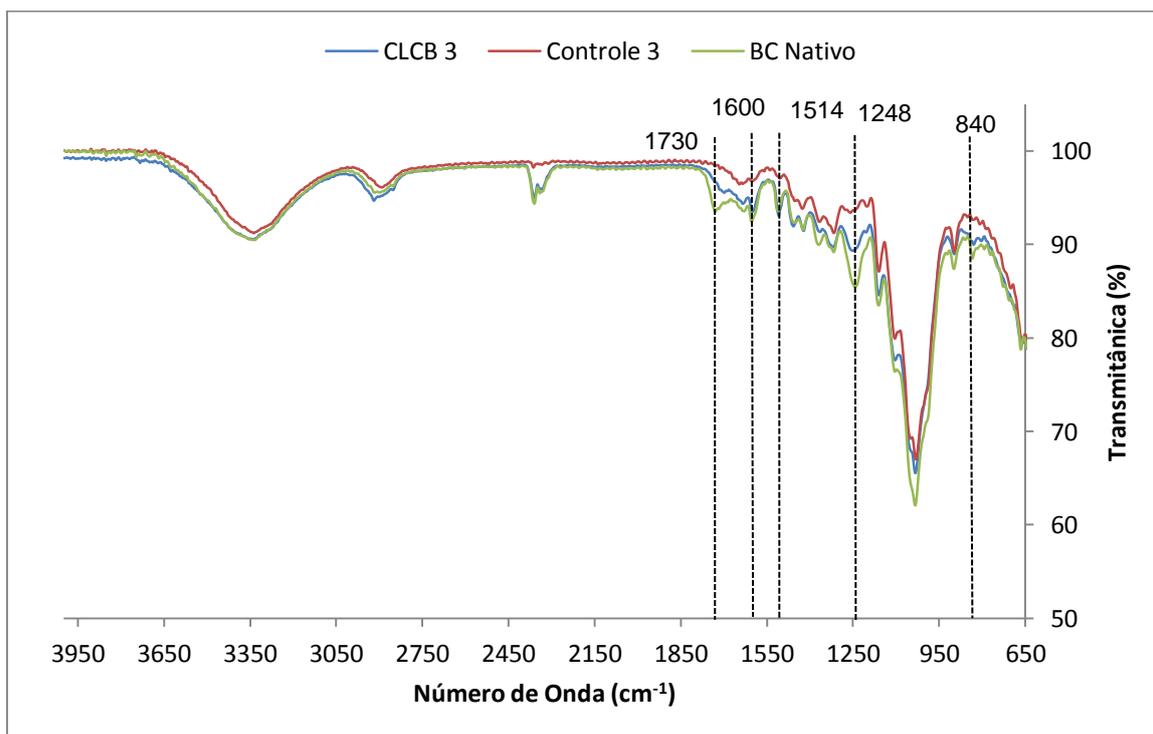


Figura 31 - Espectro de FTIR do CLCB 3, Controle 3 e BC Nativo

Os picos destacados em 1600, 1514 e 1248  $\text{cm}^{-1}$  são típicos da presença de lignina e através deles foi possível observar a remoção deste material durante os experimentos de mercerização e derivatização em relação ao BC nativo. As alterações nos picos 1730 e 840  $\text{cm}^{-1}$  podem indicar a mudança da estrutura da celulose (GURGEL, 2007).

Portanto, este trabalho de monitoramento analítico das perdas processuais durante a derivatização com epícloridrina do bagaço de cana mostrou-se importante no que diz respeito a uma nova aplicação industrial deste subproduto da indústria canavieira. Cabe ainda salientar que, embora bem explorado o uso de bagaço integral para aplicações semelhantes na literatura, a questão das perdas processuais aqui exploradas e quantificadas não está relatada na mesma, assumindo tais autores a síntese química de bagaço trocador iônico quando de fato deviam se referir à celulose residual de bagaço de cana então derivatizada.

Através da análise estatística dos resultados pode-se definir uma combinação das melhores condições para redução das perdas materiais e da hidrólise que traria, teoricamente, as condições mais efetivas para a reação de interligamento seria, portanto, temperaturas menores (20 °C), tempo de reação mais prolongado (24 h) e concentrações de NaOH menores ou intermediárias (1 - 5,5 %). Estes resultados são interessantes sob o ponto de vista industrial uma vez que temperaturas menores representam menor gasto energético, e as concentrações de álcali menores proporcionam menor volume de reagente gasto e menor custo para o processo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Através do primeiro planejamento experimental no processo de mercerização do bagaço de cana (BC) nativo observou-se que a concentração de NaOH se mostrou de maior influência frente aos demais fatores (tamanho das partículas e volume de solução alcalina), na avaliação das perdas materiais (e.g. hemicelulose) e também no teste de resistência enzimática.

- O experimento de derivatização primária proposto para promover a formação do *cross-linking* entre os componentes do BC utilizando a epícloridrina como agente interligante foi eficaz, pois reduziu as perdas materiais de hemicelulose em até 2,6 vezes, sendo que a análise do planejamento mostrou que o fator temperatura teve maior influência na redução das perdas processuais, indicando que as condições ideais para o experimento se dão com temperaturas menores por um tempo mais prolongado.

- O teste de resistência à hidrólise enzimática, ou seja, de biodegradabilidade acelerada, apresenta um grande indicio da ocorrência do *cross-linking* entre os componentes do BC, uma vez que a biodegradabilidade do material interligado apresentou uma grande redução em relação aos controles de até 6 vezes. A condição em que esta resposta teria a maior redução para qualquer tempo seria em temperaturas menores e concentração de NaOH baixa. Uma combinação das melhores condições para redução das perdas materiais e da hidrólise que traria, teoricamente, as condições mais efetivas para a reação de interligamento seria, portanto, temperaturas menores (20 °C), tempo de reação mais prolongado (24 h) e concentrações de NaOH menores ou intermediárias (1 - 5,5 %).

- As análises do FTIR indicaram alterações nos picos de 1600, 1514 e 1248  $\text{cm}^{-1}$  referentes a lignina nas amostras e seus controles analisados dos pontos do CLCB 3 e 5.2, que foram tratadas respectivamente com 1 e 5,5% de NaOH, e 60 e 40 °C, ambas nos tempos de 15 h.

- Este trabalho de monitoramento das perdas processuais durante a derivatização com epícloridrina do bagaço de cana mostrou-se importante no que diz respeito a uma nova aplicação industrial deste subproduto da indústria canavieira. Cabe ainda salientar que, embora bem explorado o uso de bagaço integral para aplicações semelhantes na literatura, a questão das perdas processuais aqui

exploradas não está relatada na mesma, assumindo tais autores as modificações químicas de bagaço quando de fato deviam se referir a celulose residual de bagaço de cana então derivatizada.

## 7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Monitorar a ocorrência da reação de interligamento através de técnicas analíticas mais sofisticadas como ressonância magnética nuclear (RMN), análises térmicas, espectrometria de massas, entre outras.
- Avaliar a capacidade do CLCB em receber derivatizações secundárias como a inserção de novos grupamentos iônicos (Carboximetilação –  $\text{CM}^-$  ou Dietilaminoetilação –  $\text{DEAE}^+$ ) ou hidrofóbicos (C8, C10 ou C12).
- Avaliar o grau de substituição das hidroxilas do substrato comparativamente à capacidade deste no tratamento de efluentes de industriais.
- Prospectar algum destino interessante para o caudal de hemicelulose e lignina solubilizado.

## REFERÊNCIAS

AGEITEC - Agência Embrapa de Informação Tecnológica. **Cana – de - açúcar**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\\_108\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html)>. Acesso em: 23 de Ago. 2013

BRIENZO, M.; **Extração de hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar para produção de xilo-oligossacarídeos**. 2010. 134f. Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

BOERJAN W.; RALPH J.; BAUCHER M. Lignin Biosynthesis. **Plant Biology**.v.54, p.519-546, jun. 2003.

BON, E. P. S.; CORVO, M. L.; FERRARA, M. A. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro, RJ. Interciência, 2008.

CHIOU, M. S., HO, P. Y.; LI, H. Y. Adsorption of anionic dyes in acid solutions using chemically cross-linked chitosan beads. **Dyes and Pigments**. v.60, p.69-84, 2004.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: Cana de Açúcar – Safra 2013/2014. Primeiro Levantamento – Abril de 2013**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_04\\_09\\_10\\_29\\_31\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_abril\\_2013\\_1o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_04_09_10_29_31_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf)>. Acesso em: 14 de Ago. 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350 — 356, 1956.

FONSECA, B. G.; **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkiaoccidentalis* e *Issatchenkiaorientalis***. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

FONTANA, J. D. **Biodiesel**: para leitores de 9 a 90 anos. Curitiba: UFPR, 2011.

FONTANA, J.D., DESOUZA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C., GALLOTTI, B. J.; DESOUZA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Applied Biochemistry and Biotechnology**.v.24/25, n.1, p.253-264, 1990.

GURGEL, L. V. A.; GIL, L. F.; Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by succinylated twice-mercerized sugarcane bagasse functionalized with triethylenetetramine. **Water Research**. 43. 4479-4488. 2012

GURGEL, L. V. A.; FREITAS, R. P.; GIL, L. F. Adsorption of Cu(II), Cd(II), and Pb(II) from aqueous single metal solutions by sugarcane bagasse and mercerized sugarcane bagasse chemically modified with succinic anhydride. **Carbohydrate Polymers**.v.74, n.4, p.922-929, 2008.

GURGEL, L. V. A.; **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: preparação de novos materiais quelantes para adsorção de Pb(II), Cd(II), Cr(II) e Cu(II)**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos – PROAGUA, Mestrado em Engenharia Ambiental) – Instituto de Ciências exatas e biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto

JIANG, G.; LIN, Z.; HUANG, X.; ZHENG, Y.; REN, C.; HUANG, C.; HUANG, Z.; Potential biosorbent based on sugarcane bagasse modified with tetraethylenepentamine for removal of eosin Y. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 50. 707-712. 2012

KAMEL, S.; ABOU-YOUSEF, H.; YOUSEF, M.; EL-SAKHAWY, M.; Potential use of bagasse and modified bagasse for removing of iron and phenol from water. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 88. 250-256. 2012

LASZLO, J. A.; Biodegradability of Quaternized, Crosslinked Sugarcane Bagasse. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, Vol. 6. No. 2. 73-78. 1998

LASZLO, J.A.; ŠIMKOVIC, I.; Preparation of ion exchangers from bagasse by crosslinking with epichlorohydrin-NH<sub>4</sub>OH or epichlorohydrin-imidazole. **Journal of Applied Polymer Science**. Vol. 64. 2561-2566. 1997

LAN, W.; LIU, C.; SUN, R.; Fractionation of Bagasse into Cellulose, Hemicelluloses, and Lignin with Ionic Liquid Treatment Followed by Alkaline Extraction. **J. Agric. Food Chem**. V. 59. 8691-8701. 2011

MARTINELLI L. A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: Environmental and social challenges. **Ecological Applications**. v.18, n.4, p.885-898, 2008.

MEDINA, I. M.; NATEL; A. S. **Bagaço de cana-de-açúcar**: fonte alternativa de alimento. Disponível em <[http://www.zoonews.com.br/exibir\\_noticias.php?a=view&idnoticia=187893&tipo=2](http://www.zoonews.com.br/exibir_noticias.php?a=view&idnoticia=187893&tipo=2)>. Acesso em: 20 Ago. 2013.

NADA, A-A. M. A.; HASSAN, M. L. Ion Exchange Properties of Carboxylated Bagasse. **Journal of Applied Polymer Science**. v.102, p.1399-1404, 2006.

NOVACANA.COM. **GranBio**: 116 fotos da primeira usina de etanol celulósico do Brasil: 85% concluída. Disponível em: <<http://www.novacana.com/fotos/granbio/>>. Acesso em: 21 fev 2014

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S.; Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**. Vol.33, No. 7, 1549-1558, 2010.

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**. Bangor, v.4, n.3, p.173-207. 1997.

PIRES, A.J.V.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, O.G.; CECON, P.R.; SILVA, F.F.; SILVA, P.A.; ITAVO, L.C.V. Degradabilidade do bagaço de cana-de-açúcar tratado com amônia anidra e, ou, sulfeto de sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33. n.4. p. 1071-1077. 2004.

ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, 2011.

ROUSSEU, R. W.; FERRELL, J. K.; REARDON, R. F. Synthesis of Diethylaminoethyl Cellulose on Cotton Fabric. **Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development**.v.23, n.2, p.250-252, jun. 1984.

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

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J; H de; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T.; Potencial de palha de cana-de-açúcar para produção de etanol, **Química Nova**. Vol. 35, No. 5. 2012

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F.; Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**. Vol 32, No3, 661 – 671, 2009.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.2, n.1, p.27-32, 2007.

TAHIR, H.; SULTAN, M.; AKHTAR, N.; HAMEED, U.; ABID, T.; Application of natural and modified sugar cane bagasse for the removal of dye from aqueous solutions. **Journal of Saudi Chemical Society**. Disponível online <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2012.09.007> 2012> 12 October 2012. Acesso em 08 Out. 2013

TIBONI, M. **Monitoramento da atividade de enzimas do complexo celulolítico utilizando celulose bacteriana covalentemente tingida com azul brilhante de remazol R**. 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

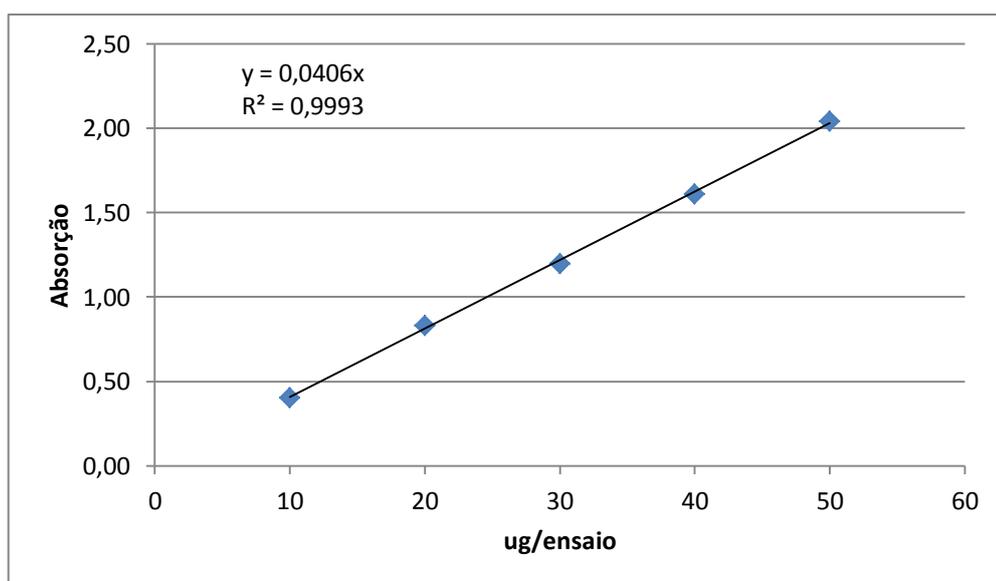
ZHAO, H.; KWAK J.H.; CONRAD ZHANG, Z.; BROWN H. M.; AREY, B.W; HOLLADAY, J.E. Studying cellulose fiber structure by SEM, XRD, NMR and acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**.v.68, n.2, p.235-241, mar. 2007.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Curva analítica para determinação de açúcares totais

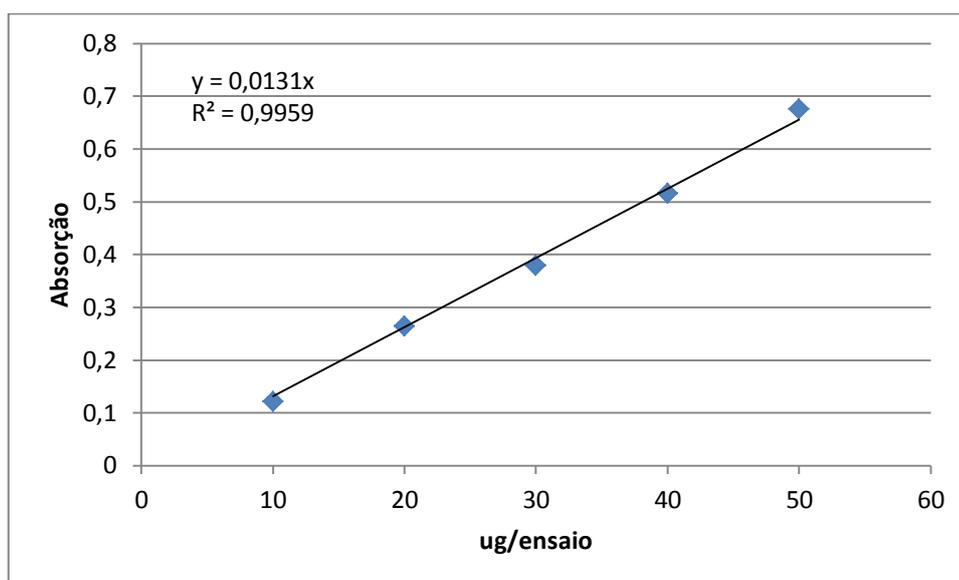
Xilose:

$\mu\text{g/ensaio}$	Absorção (480 nm)
10	0,405
20	0,833
30	1,197
40	1,612
50	2,041



Sacarose:

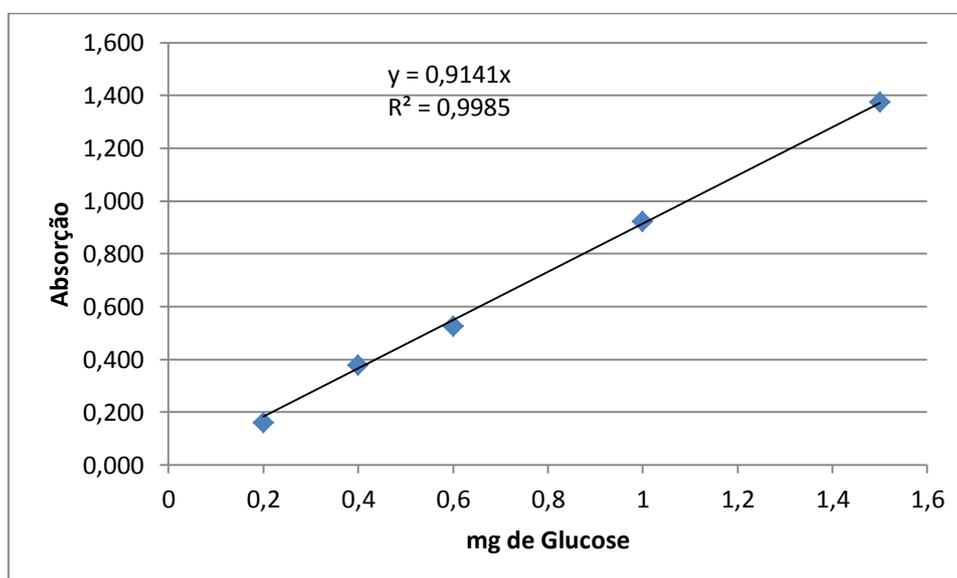
$\mu\text{g}/\text{ensaio}$	Média Leitura (490 nm)
10	0,121
20	0,264
30	0,379
40	0,515
50	0,675



## APÊNDICE B – Curva analítica para determinação de açúcares redutores

Glucose:

mg de açúcar no ensaio	Absorção (540 nm)
0,2	0,160
0,4	0,378
0,6	0,524
1,0	0,922
1,5	1,375



**ANEXOS**

SIGMA-ALDRICH - FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS  
QUÍMICOS