



Relatório do PIC 2009

**Efeito dos Diferentes Tratamentos Químicos na Hidrólise Enzimática do
Bagaço de Cana-de-Açúcar**

Ciências Exatas e da Terra

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Mary Leiva de Faria

Co-Orientador: Ms. Rafael Elias Martins

Aluna: Guilherme da Silveira de Moraes

Autor: MORAES, Guilherme da Silveira de
Título: Efeito dos Diferentes Tratamentos Químicos na Hidrólise Enzimática do Bagaço de cana-de-açúcar / MORAES Guilherme da Silveira de
. Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA: Assis, 2009.
Nº de páginas: 27p.

Orientadora: Profª. Drª. Mary Leiva de Faria
Co-Orientador: Ms. Rafael Elias Martins
Programa de Iniciação Científica (PIC) – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis

Palavras chave: 1. Bagaço de cana-de-açúcar. 2. Bioetanol

CDD: 660
Biblioteca da FEMA

1 – Título - Efeito dos Diferentes Tratamentos Químicos na Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar

2 – Objetivos

2.1. Objetivo Geral – Obter o biocombustível etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar.

3.2. Objetivo Específico – Avaliar o efeito de vários tipos de pré-tratamentos químicos na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e sua subsequente suscetibilidade à hidrólise enzimática.

3 – Introdução

A maior parte de toda a energia consumida no mundo é proveniente de fontes não renováveis, como o petróleo, carvão e gás natural¹. Com a previsão do esgotamento dos recursos energéticos fósseis em um período de tempo relativamente curto, torna-se imprescindível a busca de fontes alternativas e renováveis de energia, também chamadas de energias limpas². Neste contexto, o uso de etanol proveniente da fermentação de matérias primas renováveis surge como uma grande alternativa para a substituição aos combustíveis fósseis³.

Segundo SCHUCHARDT³, para um país tropical como o Brasil, a biomassa é o substituto natural para o petróleo.

Resíduos agrícolas como madeira, cana-de-açúcar e palha de cereais, são as principais fontes de biomassa². O bagaço de cana-de-açúcar e a palha de cereal moída são resíduos lignocelulósicos produzidos abundantemente no Brasil, estando disponíveis para a utilização biotecnológica⁴. No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar, um subproduto da indústria sucroalcooleira, destaca-se como um dos materiais lignocelulósicos mais abundantes, chegando a uma produção superior a 100 milhões de toneladas, das quais cerca de 8% não tem destinação apropriada². Uma das formas de utilização deste bagaço é na geração de energia para a própria usina². Embora a maior parte do bagaço seja queimado, as sobras são ainda bastante significativas⁵.

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído de celulose, hemicelulose e lignina na proporção aproximada^{2,5} de 50:30:20. A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de glicose^{2,6}. A segunda fração, denominada hemicelulose, apresenta composição heteropolissacarídea, sendo constituída por vários açúcares, cujas proporções dependem da origem do material. Na maioria dos resíduos industriais, entretanto, verifica-se a presença de pentoses, em particular xilose e arabinose. A última fração, denominada lignina, é constituída por álcoois aromáticos polimerizados².

A separação seletiva das frações constituintes do bagaço de cana-de-açúcar permite o emprego de cada fração para a obtenção de produtos de alto valor agregado. A obtenção de etanol por fermentação da celulose, por exemplo, requer a separação da mesma dos outros dois componentes presentes e posterior hidrólise para a geração de glicose².

A região de Assis contempla várias Usinas de Açúcar e Alcool o que estimula o emprego deste resíduo lignocelulósico não só como fonte de energia, mas também para a produção do biocombustível etanol.

A utilização de biocombustíveis renováveis vem despertando um interesse cada vez maior em todo o mundo porque, além de reduzir a dependência externa de petróleo, o uso de tais combustíveis resulta em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera. O emprego de resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, como biomassa é interessante para a produção de energias renováveis, pois contribui para um melhor balanço da quantidade de carbono no ambiente. Antes de o carbono ser emitido na atmosfera, via combustão, a produção de etanol exige, por exemplo, a plantação de cana-de-açúcar, processo que retira carbono da atmosfera para auxiliar o crescimento das plantas, processo este chamado de “seqüestro de carbono”. Já os combustíveis fósseis são estoques de carbono, antes isolado no subsolo, e que passam a ser emitidos na atmosfera, desequilibrando o ciclo de carbono. O emprego desta biomassa como fonte de energia renovável e menos poluente que as de origem fóssil, vem de encontro ao Protocolo de Kyoto em que diversos países assumiram o compromisso de reduzir a emissão de gases tóxicos que provocam o efeito estufa. Tais fatores justificam o estudo do efeito dos diferentes métodos de

tratamentos químicos do bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão desta biomassa em açúcares fermentáveis para posterior obtenção de bioetanol.

4 – Uso da biomassa na geração de energias renováveis

Devido à crescente demanda por energia no mundo, é inevitável que os combustíveis fósseis, particularmente o petróleo, se esgote num futuro próximo¹. Segundo SCHUCHARDT et al.³, as reservas mundiais de petróleo irão acabar dentro dos próximos 100 anos. A busca por fontes alternativas de energia é, portanto, de suma importância¹. Com isto a utilização de combustíveis renováveis tem despertado um crescente interesse em todo o mundo². O emprego de tais combustíveis, além de reduzir a dependência externa de petróleo, implica em uma diminuição significativa das emissões de gases tóxicos para a atmosfera².

Segundo previsões, por volta do ano de 2014 o consumo de petróleo irá aumentar significativamente, fazendo o preço do barril subir tanto que forçará a diminuição do consumo³. Neste contexto, é recomendável que se busque tecnologias para a substituição do petróleo como fonte de insumos e energia^{2,3}. Uma alternativa seria o emprego de outros combustíveis fósseis como o gás natural e o carvão mineral, os quais apresentam reservas bastantes maiores e poderiam substituir o petróleo. Contudo, além de serem de difícil transformação em matéria prima para a indústria química, não resolveriam outro grande problema relacionado com o petróleo: o impacto ambiental devido à formação de CO₂ e gases sulfurados na sua queima ou transformação^{2,7}. A biomassa seria um substituto natural para o petróleo no Brasil, sendo necessário somente 1% da massa produzida anualmente no país para substituir o petróleo. Esta porcentagem não afetaria a produção de alimentos, nem causaria devastação ou outra forma de agregação às florestas³.

De acordo com FISCHER *apud* MARTINS², estudos indicam que o emprego da biomassa para fins energéticos vem tendo uma participação crescente na matriz energética mundial, com uma estimativa de que até o ano de 2050 o uso de biomassa disponível deverá dobrar.

SHENG⁸ e AGBLEVOR⁷ destacam que a produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósica tem atraído a atenção de pesquisadores à procura de

energia alternativa. KIM⁹, por exemplo, propôs a fermentação, em meio sólido, da palha de arroz e farelo de trigo por *Aspergillus niger* para a produção de etanol. Segundo HELEG *apud* KIM⁹, este processo consiste primeiramente na hidrólise dos materiais lignocelulósicos, produzindo principalmente glicose e xilose e posterior bioconversão destes açúcares em etanol.

5 – Utilização do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima lignocelulósica

O bagaço de cana-de-açúcar, um resíduo do processo de extração de açúcar, é um material lignocelulósico abundante e de baixo custo¹⁰.

No Brasil para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados em média 230 Kg de bagaço².

O uso mais freqüente do bagaço de cana-de-açúcar é na produção de energia pela sua combustão, sendo esta uma prática tradicional em todo o mundo^{2,10}. No Brasil para cada 1 tonelada de cana moída é produzida cerca de 30 KW/h de energia². Este procedimento, entretanto, causa poluição, aumentando a emissão de CO₂. Uma alternativa para o uso do bagaço de cana-de-açúcar é a produção biotecnológica de etanol, a qual resultaria em produto de maior valor agregado¹⁰. No Brasil o bagaço de cana-de-açúcar constitui o material lignocelulósico mais importante a ser utilizado na produção de bioetanol¹¹. Nas últimas safras a produção superou os 10 milhões de toneladas. Como deste montante 6% a 10% não tem destinação apropriada o bagaço excedente pode ser empregado na produção de etanol².

5.1. Composição Química do Bagaço de Cana-de-Açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído basicamente de três polímeros^{2,12}: celulose (polímero de glicose), hemicelulose (cadeias ramificadas de açúcares, maioria aldolpentoses, principalmente xilose) e lignina (polímero de fenilpropano) na proporção aproximada de 50:30:20.

A celulose (figura 1) é um homopolissacarídeo constituído por unidades glicosídicas que são unidas por ligações α -1,4^{2,13}.

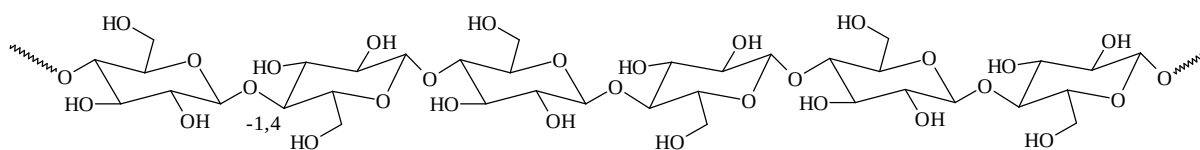


Figura 1 – Estrutura de uma cadeia de celulose¹³

A hemicelulose é uma mistura heterogênea de diferentes polissacarídeos, cuja composição varia dependendo do tipo de planta^{2,13}. No entanto, a hemicelulose do bagaço consiste principalmente de xilanas (figura 2), um heteropolissacarídeo unido por ligações β -1,4 de xilose que pode ser acetilada e substituída com uma variedade de carboidratos, sendo os mais comuns a arabinose e a glucuronose^{2,13,14}.

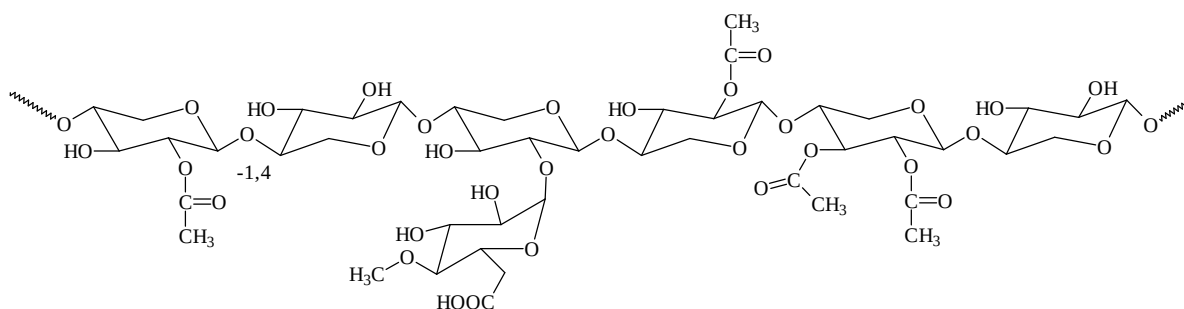


Figura 2 – Estrutura da O-acetil-(4-metilglucurono)-xilana¹³

A lignina (figura 3)¹⁵ é um polímero aromático heterogêneo que resulta da condensação radicalar dos álcoois aromáticos precursores coniferílico, cumarílico e sinapílico (figura 4)¹⁴.

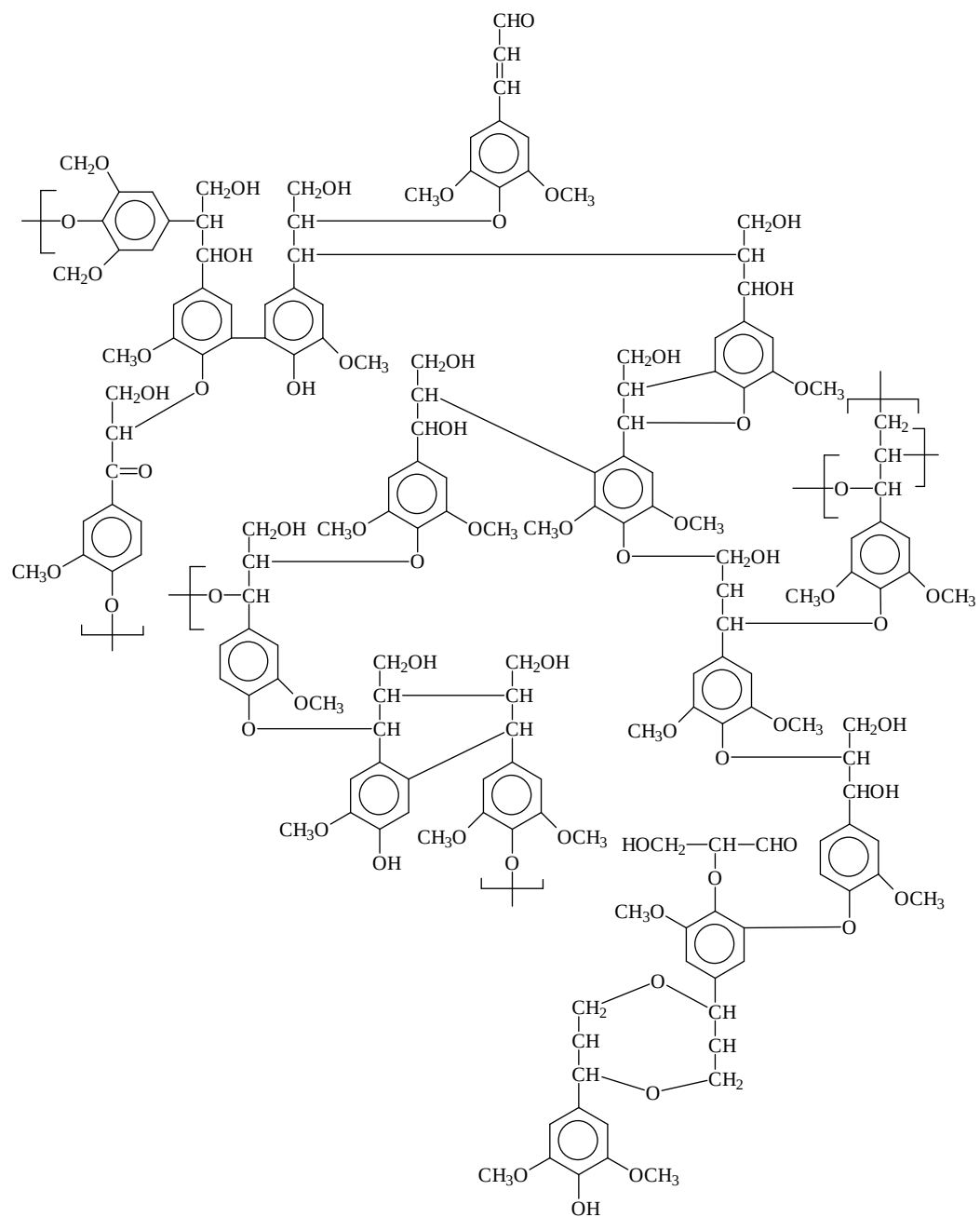


Figura 3 – Estrutura proposta para a lignina¹⁵

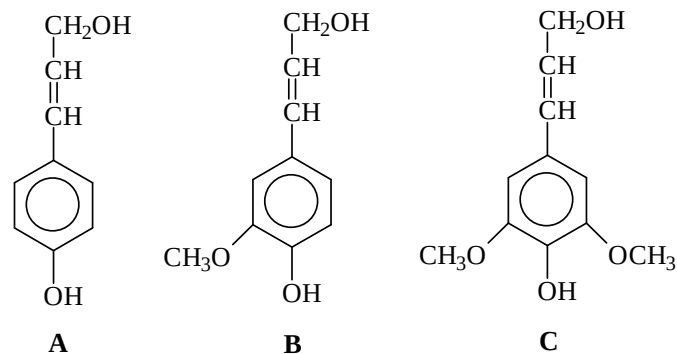


Figura 4 – Álcoois precursores da lignina: **A** – álcool *p*-cumarílico; **B** - álcool coniférico; **C** – álcool sinápico¹⁴

A lignina unida covalentemente à hemicelulose forma uma matriz complexa que envolve as microfibras de celulose, formando assim, o complexo lignocelulósico¹³ (figura 5).

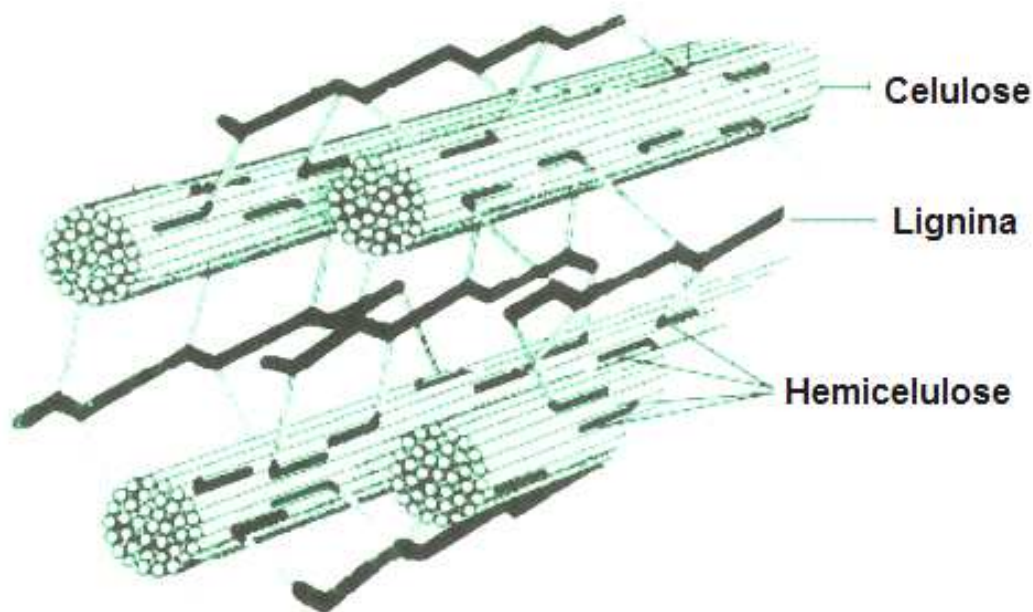


Figura 5 – Complexo lignocelulósico

A função da lignina é “cimentar” as fibras, atuando como um agente de endurecimento, protegendo a parede celular do ataque enzimático por microorganismos^{13, 14}.

5.2 – Pré-tratamento de Materiais Lignocelulósicos

Várias tecnologias podem ser utilizadas para efetuar a hidrólise dos polissacarídeos presentes em materiais lignocelulósicos². Estas diferentes tecnologias podem ser empregadas individualmente ou combinadas: cozimento com vapor a alta pressão seguida ou não de decomposição rápida, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, uso de peróxido de hidrogênio dissolução da lignina a quente com solvente orgânico ou álcali, entre outros². Contudo, dependendo da severidade do processo, produtos inibidores para os microorganismos que irão fermentar os açúcares, poderão ser obtidos. Estes produtos inibidores não são gerados quando o complexo de enzimas celulasas e xilanasas catalisam esta hidrólise². Porém, para o emprego da hidrólise enzimática é essencial uma etapa de pré-tratamento para preparar efetivamente a celulose para o ataque enzimático¹². Neste pré-tratamento ocorre um fracionamento dos três principais constituintes da fitobiomassa (figura 6) e um conseqüente aumento da suscetibilidade da celulose ao ataque enzimático².

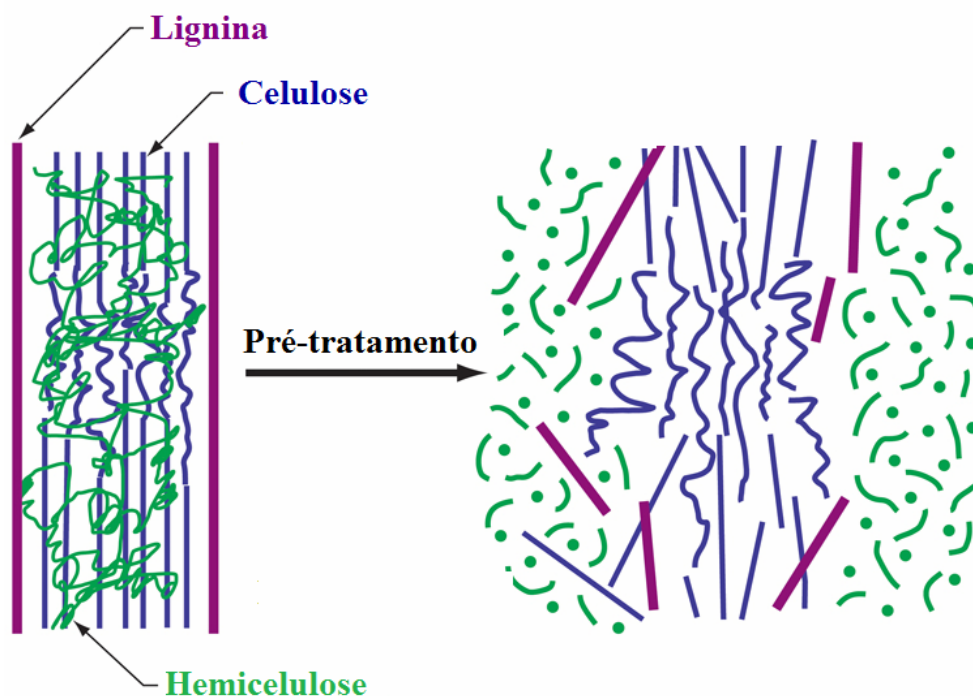


Figura 6 – Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento

RAMOS⁴ descreve vários métodos de pré-tratamentos físicos e químicos para o fracionamento de materiais lignocelulósicos. Segundo o autor o sucesso

relativo de cada método usualmente depende da eficiência com que o material lignocelulósico é transformado e, no caso específico da bioconversão, da extensão com que a hidrólise enzimática da celulose é melhorada.

WYMAN et al¹² descrevem que os pré-tratamentos com ácido sulfúrico diluído, com amônia e com cal, estão entre as opções mais promissoras.

AGUIAR e MENEZES¹⁶ submeteram dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar à hidrólise enzimática: o sem pré-tratamento e o bagaço tratado com hidróxido de sódio 4%, ácido fosfórico e vapor d' água. De acordo com os autores as maiores porcentagens de hidrólise foram alcançadas com o bagaço de cana tratado, evidenciando que o tratamento físico e químico é necessário para um melhor aproveitamento do conteúdo celulósico do bagaço. O pré-tratamento aumentou a suscetibilidade da celulose à hidrólise enzimática, culminando em maiores conversões em açúcares redutores do que simplesmente a moagem do bagaço.

6 – Enzimas celulolíticas

As celulasas (figura 7) são capazes de hidrolisar a celulose, que é a matéria-prima mais abundante do planeta e a principal fonte de carbono. A celulose, encontrada nas paredes celulares de vegetais, apresenta-se em forma amorfa e cristalina^{2,17}. A celulose amorfa é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina. Assim, quanto maior for a proporção da forma cristalina, maior a resistência ao ataque enzimático. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários tipos de microrganismos têm se demonstrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis de baixa massa molar¹⁸.



Figura 7- Estrutura terciária da celulase de *Trichoderma reesei* (modelo de fita)².

A conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa árdua, em decorrência da natureza física do substrato². Na sua forma nativa, a celulose é composta principalmente de fibras cristalinas insolúveis, nas quais as pontes de hidrogênio mantêm as moléculas unidas. A figura 8 ilustra as pontes de hidrogênio formando redes/fibras cristalinas insolúveis².

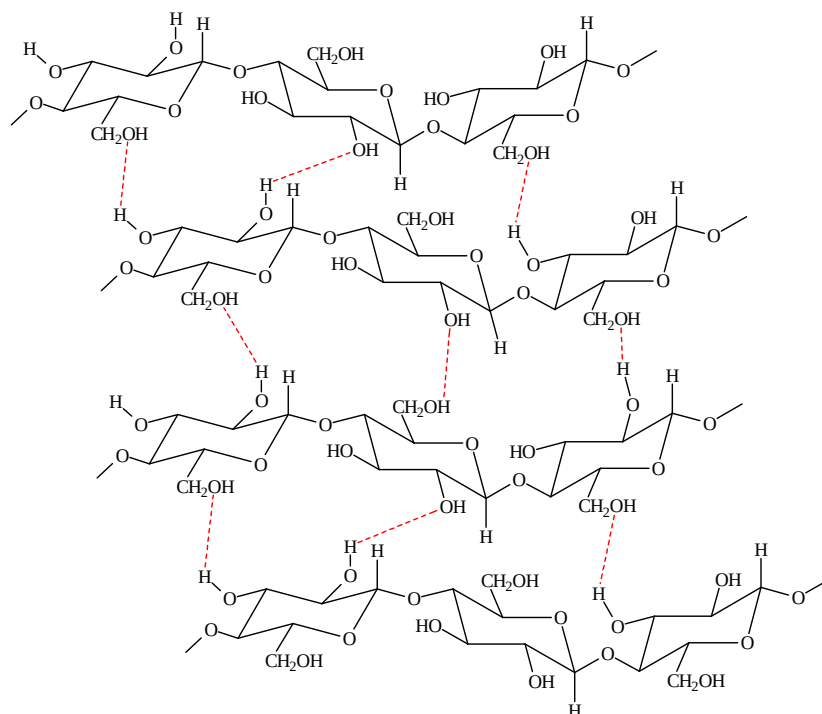


Figura 8 – Fibras cristalinas de celulose, ilustrando influência das pontes de hidrogênio²

Estas fibras são embebidas em uma matriz de hemicelulose e lignina, a qual reduz a acessibilidade às enzimas celulolíticas². Assim, para hidrólise da celulose necessita-se de um consórcio de enzimas: as endoglucanases (β -1,4-glicano-glicanoidrolase), as β -1,4-glicano-celobiohidrolases (exoglucanases) e as β -1,4-glucosidases (uma celobiase)^{18,19}, pois elas possuem uma ação sinérgica entre elas². As primeiras dividem a celulose nativa ao acaso, possibilitando a formação de cadeias menores de celotriose, celobiose e glicose, enquanto que as segundas atuam nas extremidades não redutoras das cadeias, separando moléculas de celobiose. Finalmente as glicosidases hidrolisam celobiose a glicose¹⁹.

A figura 9 representa a degradação da celulose utilizando endo e exoenzimas.

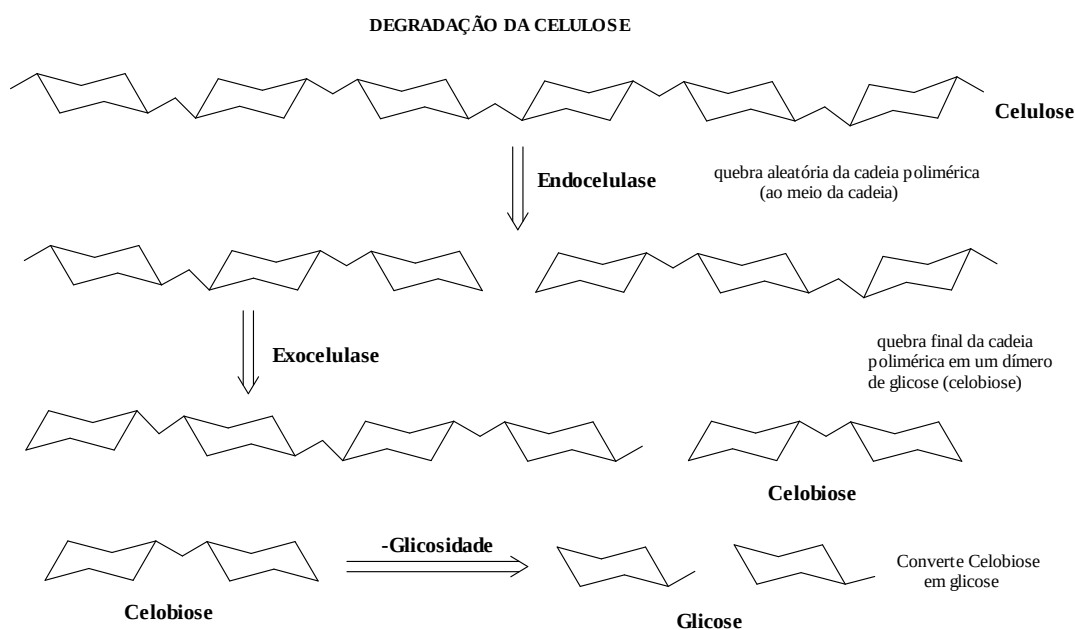


Figura 9 – Mecanismo da degradação da celulose¹⁸

7 – Metodologia

7.1 – Materiais

- Algodão.
- Bacia de plástico.
- Balão de fundo chato de 1000 mL.
- Balão Volumétrico de 1000 mL.
- Bastão de vidro.
- Béquer de 2000, 600 e 250 mL.
- Boneca.
- Cubeta.
- Espátula.
- Erlenmeyer 125 mL.
- Frasco de vacina.
- Funil de vidro.
- Grade para tubo de ensaio.
- pinça stainless LB2 – S4
- Pipeta volumétrica de 50, 3 e 5 mL.
- Proveta de 250 e 500 mL.
- Rolha.
- Seringa de plástico (descartável).
- Tubo de ensaio (pyrex).
- Tubo de Folin Won de 25 mL.
- Algodão.
- Bacia de plástico.
- Balão de fundo chato de 1000 mL.
- Balão Volumétrico de 1000 mL.
- Bastão de vidro.

7.2 – Reagentes

- Ácido 3,5 - dinitro salicílico (Vetec).
- Ácido cítrico (Carlo Erba).

- Ácido sulfúrico (Quimex).
- Bagaço de cana-de-açúcar cedido pela Usina Silvio Tiroli.
- Celulase de origem microbiana *Trichoderma reesei*-Novozymes A/S (NS 50013).
- Citrato de sódio (Vetec).
- Glucose (Vetec).
- Hidróxido de sódio (Quimex).
- Indicador universal (Merck).
- Peróxido de Hidrogênio (Dinâmica) .
- Sulfito de sódio (Synth).

7.3 – Equipamentos

- Agitador de tubo de ensaio (Phoenix)
- Agitador magnético/Chapa aquecedora TE – 085 – (Tecnal).
- Agitador mecânico (Fisatom 713).
- Autoclave vertical (Phoenix).
- Balança analítica (Gehaka, BG 1000).
- Bico de bunsen.
- Espectrofotômetro (Tecnal/Fento 700 Plus).
- Estufa (Tecnal-397/4).
- Estufa para cultura Bacteriológica (Tecnal TE-398/2).
- Micropipetador (Digipet, vol. 5 – 50 µL).
- Peneira de 100 mesh (Bertel Ind. Metalúrgica Ltda).
- Peneira de 60 mesh (Bertel Ind. Metalúrgica Ltda).
- pHmetro digital (Tecnal).
- Termômetro (Icoterm – 635).

7.4 – Procedimento Experimental

7.4.1 – Seleção do Bagaço.

Os 4Kg de bagaço de cana-de-açúcar cedido pela Usina Silvio Tiroli, foram selecionados para retirar partículas maiores e sujeiras obtendo 3,6Kg de bagaço de cana-de-açúcar em pequenos pedaços.

7.4.2 - Etapa de lavagem

Os 3,6Kg bagaço de cana foram divididas em frações, para que todas tivessem como massa inicial 50 gramas.

Cada fração de 50 gramas foi adicionada em um béquer de 2000 mL com 1500 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 70°C e mantida nesta temperatura por 3 horas sob agitação mecânica constante de 1000 RPM, trocando a água a cada hora,. Em seguida a mistura foi filtrada e as frações foram secas em estufa a 65°C até obter peso constante.

7.4.3 - Pré-tratamentos do Bagaço

7.4.3.1 – Pré–tratamento com água destilada

O pré-tratamento com água destilada, denominado explosão à vapor, foi realizado em duas etapas.

Na primeira etapa foram introduzidos 12,5 gramas de bagaço e 250 mL de água destilada em um balão de fundo chato de 1000 mL, o qual foi vedado com uma boneca. Em seguida, este balão foi autoclavado à 121°C durante 30 minutos. Depois o bagaço foi filtrado simultaneamente em peneira tamis de 60 e 100 mesh e lavado com bastante água destilada. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 65°C até obter massa constante.

Na segunda etapa foi realizado o mesmo processo com o bagaço que sobrou da primeira etapa.

7.4.3.2 – Pré–tratamento com hidróxido de sódio 4%

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 4%, denominado explosão à vapor, foi realizado em duas etapas.

Na primeira etapa foram introduzidos 12,5 gramas de bagaço e 250 mL de solução hidróxido de sódio 4% em um balão de fundo chato de 1000 mL, o qual foi vedado com uma boneca. Em seguida, este balão foi autoclavado à 121°C durante 30 minutos. Depois o bagaço foi filtrado simultaneamente em

peneira tamis de 60 e 100 mesh e lavado com bastante água destilada e neutralizado com uma solução de ácido clorídrico 1%. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 65°C até obter massa constante.

Na segunda etapa foi realizado o mesmo processo com o bagaço que sobrou da primeira etapa.

7.4.3.3 – Pré-tratamento com ácido sulfúrico (0,5; 1,0; 2,0; 2,5 e 3,0%)

Primeiramente foi preparada uma solução ácido sulfúrico PA 3% (v/v), e diluída para concentrações 0,5 a 2,5% (v/v). Para preparar a solução de 3% (v/v), pipetou-se 60 mL de ácido sulfúrico PA, em seguida transferiu-se para um balão de 2L e completou-se com água destilada. Para preparar as demais soluções foram retiradas alíquotas da solução mais concentrada e transferidas para balões de 250 mL e completado com água destilada. Para preparar a solução de 2,5% (v/v) pipetou-se 208,5 mL da solução de 3% (v/v). Para preparar a solução de 2,0% (v/v) pipetou-se 167 mL da solução de 3% (v/v). Para preparar a solução de 1,5% (v/v) pipetou-se 125 mL da solução de 3% (v/v). Para preparar a solução de 1,0% (v/v) pipetou-se 84 mL da solução de 3% (v/v) e a solução de 0,5% (v/v) foi preparada pipetando-se 42 mL da solução de 3% (v/v).

O pré-tratamento com ácido sulfúrico em várias concentrações, denominado explosão ácida, foi realizado em duas etapas.

Na primeira etapa em cada balão de fundo chato de 1000 mL foram introduzidos 250 mL de ácido sulfúrico variando as concentrações de 0,5 a 3,0% e 12,5 gramas de bagaço e vedado com uma boneca. Em seguida, este balão foi autoclavado à 121°C durante 20 minutos. Depois o bagaço foi filtrado simultaneamente em tamis de 60 e 100 mesh, lavado com bastante água destilada e neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio 1%. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 65°C até obter massa constante.

Na segunda etapa o bagaço obtido da primeira etapa foi adicionado a um balão de fundo chato de 1000 mL com 250 mL de água destilada e novamente autoclavado à 121°C durante 30 minutos. Depois o bagaço foi

filtrado simultaneamente em tamis de 60 e 100 mesh e lavado com água destilada. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 65°C até obter massa constante.

7.4.3.4 – Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio

No pré-tratamento alcalino com peróxido de hidrogênio, 5,00g de bagaço de cana-de-açúcar foram suspensa em 250mL de água oxigenada 1% (v/v). O pH desta suspensão foi ajustado em 11,5 com solução aquosa de hidróxido de sódio e mantido em agitação por 24hrs. Depois o bagaço foi filtrado simultaneamente em peneira tamis de 60 e 100 mesh e lavado com bastante água destilada e neutralizado com uma solução de ácido clorídrico 1%. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 65°C até obter massa constante.

Foram obtidas oito porções diferentes de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados para posterior hidrólise.

7.5 - Hidrólise

7.5.1 - Preparação da curva de calibração

Primeiramente foi preparada uma solução de glicose PA 1g/L, e diluída para concentrações 0,1 a 0,9 g/L. Para preparar a solução de 1g/L, pesou-se em um béquer 0,5058 gramas de glicose. Adicionou-se água para dissolver o soluto e em seguida transferiu-se para um balão de 500mL e completou-se com água destilada. Para preparar as demais soluções foram retiradas alíquotas da solução mais concentrada e transferidas para balões de 100mL e completado com água destilada. Para preparar a solução de 0,9g/L pipetou-se 90,0mL da solução de 1g/L. Para preparar a solução de 0,8g/L pipetou-se 80,0mL da solução 1g/L. Para preparar a solução 0,7g/L pipetou-se 70,0mL da solução de 1g/L. Para preparar a solução de 0,6g/L pipetou-se 60,0 mL da solução de 1g/L. Para preparar a solução de 0,5 g/L pipetou-se 50,0 mL da solução de 1g/L. Para preparar a solução de 0,4g/L pipetou-se 40,0 mL da solução de 1g/L Para preparar a solução de 0,3g/L pipetou-se 30,0 mL da

solução de 1g/L. Para preparar a solução de 0,2 g/L pipetou-se 20,0 mL da solução de 1g/L e a solução de 0,1g/L foi preparada pipetando-se 10 mL da solução de 1g/L. Em seguida foi realizado a quantificação de açúcar redutor pelo método de Miller²⁰, e depois feita a leitura da absorbância em 540 nm. Com os dados de absorbância obtidos foi realizada a confecção da curva de calibração.

7.5.3– Hidrólise Enzimática

Em um frasco de vacina foram colocados 0,05g de bagaço pré-tratado com 5 mL da solução enzimática (100 µL de complexo enzimático(50013) em 20 mL de solução tampão citrato, pH=4,8) . Em seguida o frasco foi vedado e a reação prosseguiu por 24 horas a +/- 50°C, sob agitação magnética constante em estufa bacteriológica. Todos os oito tipos de bagaço passaram pelo mesmo processo de hidrólise em triplicata.

O complexo enzimático de origem microbiana *Trichoderma reesei* foi gentilmente fornecida pela empresa Novozymes A/S, (NS 50013).

7.5.3.1 – Quantificação de açúcar redutor pelo método de Miller (Padrão)

A quantificação do açúcar redutor proveniente da hidrólise dos bagaços pré-tratados foi realizada pelo método DNS, proposto por Miller²⁰.

Primeiramente foi colocado em um tubo de Folin Won de 25 mL, 3 mL de solução DNS (Ácido 3,5 - dinitro salicílico, sulfito de sódio e hidróxido de sódio) junto com 1,5 mL de solução de enzima após a hidrólise e 1,5mL de água destilada. Em seguida o tubo foi inserido em banho-maria (ebulição) durante 5 minutos, logo após resfriado com auxílio de banho de gelo e diluído para 25 mL. A amostra foi lida em absorbância de 540 nm.

Para a construção da curva de calibração foi realizado o mesmo procedimento, porém adicionou-se no tubo de Folin Won 1,0 mL das soluções de glicose de concentração conhecida e 1,5 mL de água destilada, ao invés de 1,5 mL de solução de enzima após hidrólise¹⁷.

7.5.3.1.1 – Diluições efetuadas durante a quantificação de açúcar redutor pelo método de Miller

Para os bagaços pré-tratados exceto o pré tratado com apenas água destilada a quantificação de açúcar redutor pelo método de Miller²⁰ foi realizada inserindo em um tubo de folin won de 25 mL, 0,15 mL da amostra, junto com 1,35 mL de água destilada e 3 mL de solução DNS (Ácido 3,5 - dinitro salicílico, sulfito de sódio e hidróxido de sódio). Logo após o tubo foi inserido em banho-maria (ebulição) durante 5 minutos, em seguida resfriado com auxílio de banho de gelo e diluído para 25 mL. A amostra foi lida em absorbância de 540 nm.

Para o pré-tratamento à vapor com água destilada e o branco a quantificação do açúcar redutor foi realizada sem diluição.

8 – Resultados e Discussão.

A importância da lavagem com água quente é a de remover as substâncias neste meio, que se encontram aderidas no bagaço de cana, provenientes da lavoura e processo industrial tais como:

- sacarose, residual do processo industrial,
- glicídios de baixa massa molecular,
- sais inorgânicos,
- terra,
- adubos e outros resíduos agrícolas.

Todas as explosões foram feitas em triplicata.

A explosão com água foi efetuada seguindo a metodologia de AGUIAR e MENEZES¹⁶.

Segundo WYMAN et al.¹² a água sob pressão pode remover a hemicelulose e lignina. A água sob pressão pode penetrar na estrutura da célula da biomassa, hidratar a celulose e liberar a hemicelulose.

A figura 10 ilustra o bagaço após explosão com água.



Figura 10 – Bagaço após explosão com água

A explosão com ácido sulfúrico diluído foi efetuada seguindo a metodologia de GRILO e ARAÚJO²¹.

Segundo WYMAN et al.¹² ácido sulfúrico diluído a temperaturas moderadas libera eficientemente a hemicelulose, aumentando em quase 100% o rendimento da glicose a partir da celulose.

A figura 11 abaixo mostra o bagaço após explosão com ácido sulfúrico com 0,5 a 2%.

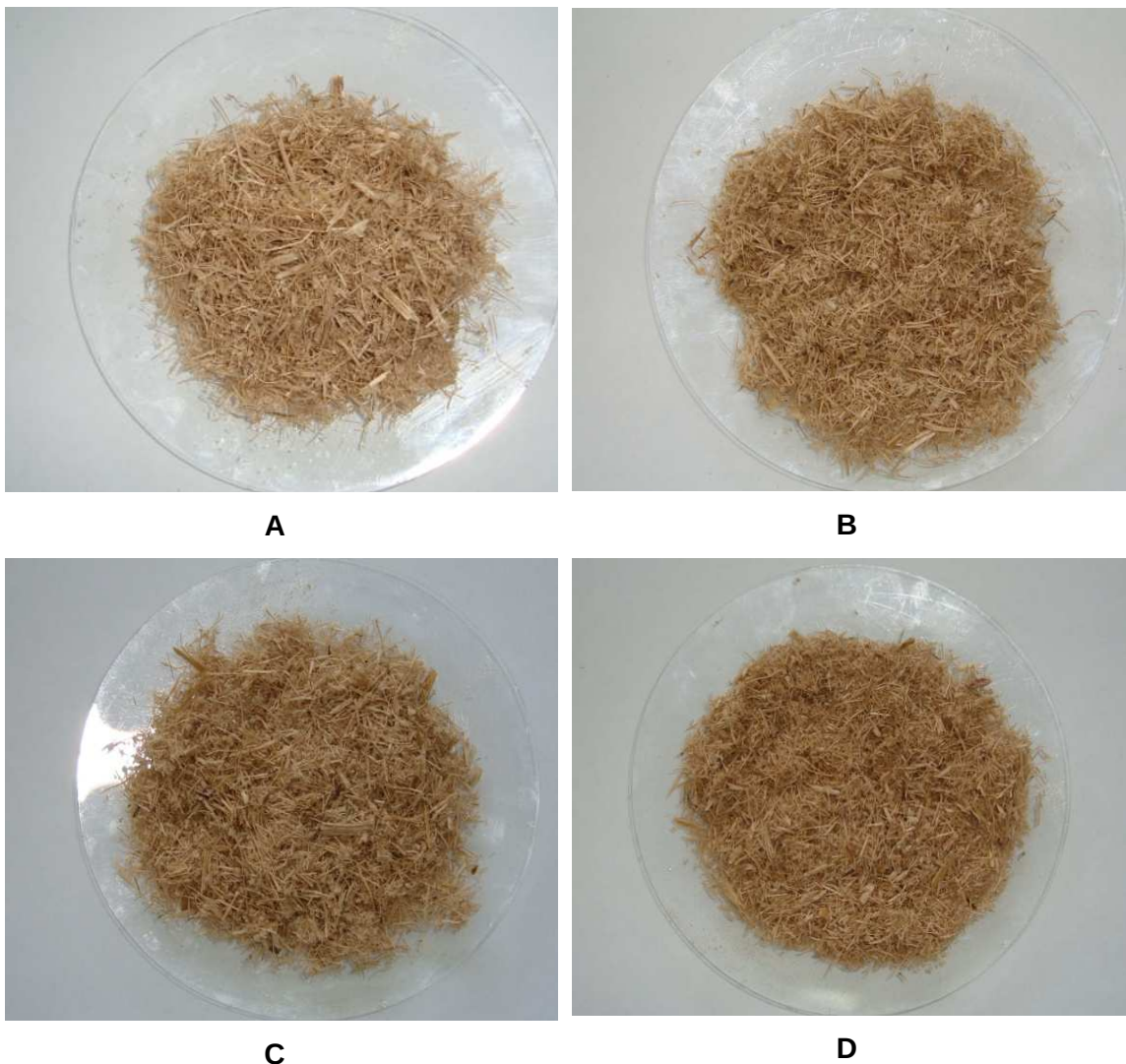


Figura 11 – Bagaço tratado com: A) H_2SO_4 0,5%; B) H_2SO_4 1,0%; C) H_2SO_4 1,5% e D) H_2SO_4 2,0%.

A explosão alcalina foi efetuada seguindo a metodologia de AGUIAR e MENEZES¹⁶.

O uso de reagentes alcalinos aumenta a digestibilidade da celulose, sendo um dos métodos mais comuns para a remoção de volumosas somas de lignina de materiais lignocelulósicos⁴.

A figura 12 mostra o bagaço após explosão com hidróxido de sódio 4%.



Figura 12 - Bagaço após explosão com hidróxido de sódio 4%

O tratamento do bagaço com peróxido de hidrogênio em pH 11,5 foi realizado seguindo a metodologia de REYS et al.²². Segundo estes autores entre os vários grupos funcionais característicos da lignina (grupos fenólicos, duplas ligações e grupos carbonila), as carbonilas conjugadas ao anel aromático parecem ser os cromóforos mais efetivos para dar início ao processo de fotodegradação. A figura 13 mostra o bagaço após tratamento com peróxido de hidrogênio em pH 11,5.



Figura 13 - Bagaço tratado com H₂O₂ em pH 11,5.

As filtrações em peneiras tamis de 60 e 100 mesh, efetuadas em todos os tipos de explosões, tiveram como objetivo reter a celulose e hemicelulose do

bagaço na peneira de 60 mesh, separando da lignina que fica retida na peneira de 100 mesh.

A quantificação dos açúcares redutores obtidos após a hidrólise enzimática foi feita pelo método DNS (3,5-dinitrosalicílico)^{2,20}. Neste método, a dosagem de açúcares com poder redutor é feito com base na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrosalicílico, sendo os grupos carbonila do açúcar oxidados a carboxila⁸ (figura 14).

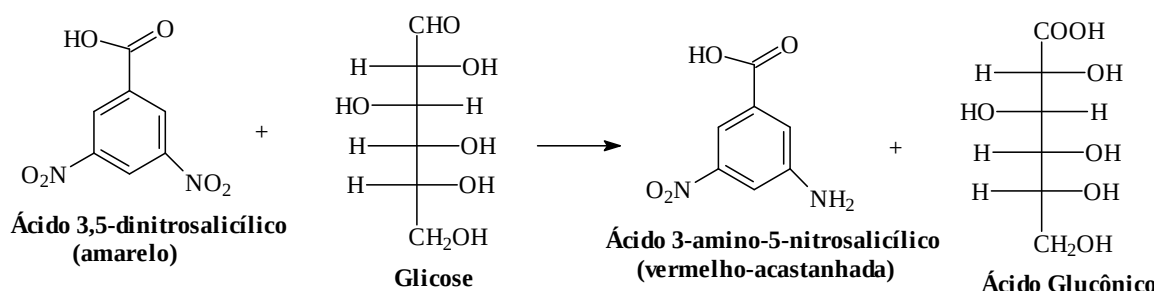


Figura 14 – Reações envolvidas Método de dosagem de açúcares com DNS^{17,20}.

O composto resultante desta reação, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, tem uma cor vermelho-acastanhada. A intensidade da cor, medida pela absorbância a 540 nm, é diretamente proporcional à concentração de açúcares redutores da solução original^{17, 20}.

Para determinar a concentração dos açúcares redutores obtidos após hidrólise dos bagaços pré-tratados, foi feita uma curva de calibração com soluções de concentrações conhecida de glicose¹⁷. Os valores médios das concentrações e absorbâncias da curva de calibração estão apresentados na tabela 1 e figura 15.

Tabela 1 - Concentrações e absorbâncias da curva de calibração.

Concentração (g/L)	Absorbância (540 nm)
1,0	0,398
0,9	0,361
0,8	0,325
0,7	0,290
0,6	0,240
0,5	0,188
0,4	0,146
0,3	0,112
0,2	0,076
0,1	0,019

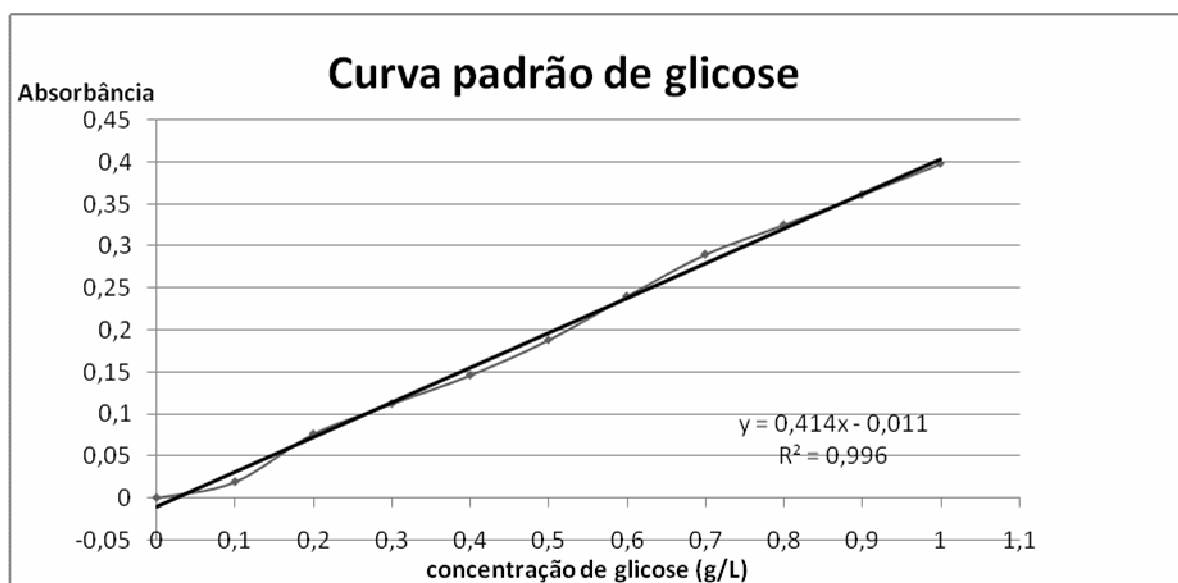


Figura 15 – Curva de calibração de açúcar redutor

Os valores das concentrações de açúcares redutores encontrados, após hidrólise enzimática de cada bagaço que foi efetuado o pré-tratamento, está apresentado na tabela 2. O cálculo foi efetuado utilizando-se a curva de calibração de açúcar redutor.

Tabela 2 – Valores de absorbância, diluição e concentração de açúcares redutores obtidos.

Pré-tratamento	Absorbância a 540 nm (Média)	Concentração de Açúcar redutor Total (g/L)	Diluição	Concentração final de Açúcar Redutor (g/L)
Água Destilada	0,098	0,369	01:10	3,69
NaOH 4%	0,785	2,914	01:10	29,14
Ácido Sulfúrico 0,5%	0,383	1,423	01:10	14,23
Ácido Sulfúrico 1,0%	0,402	1,493	01:10	14,93
Ácido Sulfúrico 1,5%	0,391	1,455	01:10	14,55
Ácido Sulfúrico 2,0%	0,446	1,658	01:10	16,58
Peróxido de Hidrogênio Alcalino	0,131	0,492	01:10	4,92

É importante ressaltar que ao efetuar a determinação de açúcar redutor pelo método de Miller²⁰, as amostras foram diluídas para que as mesmas estivessem dentro da linearidade, obedecendo a Lei de Beer - Lambert.

Foi realizado também um ensaio de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar num período de 48 horas. O gráfico apresentado na figura 16 demonstra o perfil de formação de açúcar redutor.

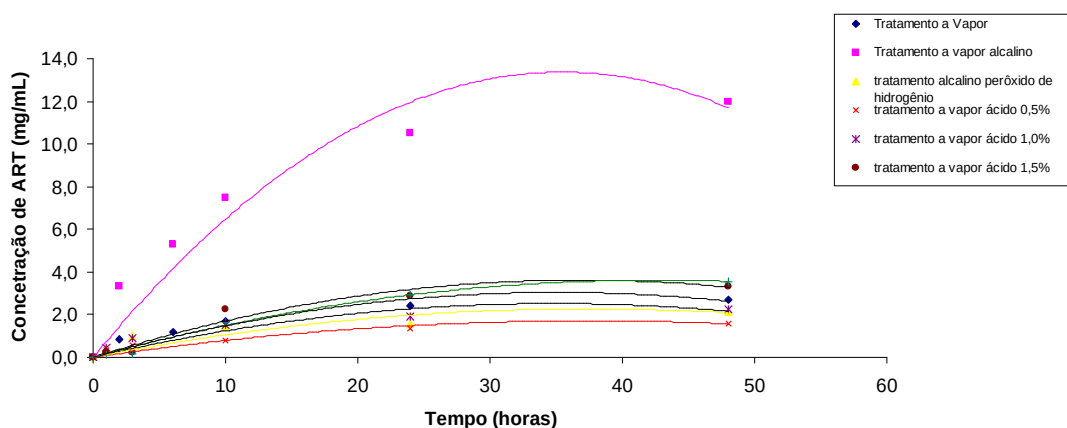


Figura 16 – Perfil de hidrólise do bagaço de cana de açúcar num período de 48 horas

9 – Conclusão

Os sistemas de pré-tratamentos empregados foram de fundamental importância no processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar, tornando o mesmo mais suscetível ao ataque enzimático.

Os resultados obtidos demonstraram que o pré-tratamento mais eficiente foi o método de explosão à vapor com hidróxido de sódio 4%.

10. Produtos gerados com o desenvolvimento do trabalho

10.1 - Apresentação em Eventos Científico

Semana Nacional de Ciência e tecnologia - 2º Fórum Científico – FEMA.
Novembro/2009. Apresentação oral.

11 – Referências Bibliográficas

1. FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de Soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. *Química Nova*, v. 28, nº. 1, p. 19/23, nov. 2005.
2. MARTINS, R. E. *Estudo da Imobilização de Celulose em Géis de Quitosana*, 2007, 98 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) UFSCar. São Carlos.
3. SHUSHARDT, U. et al. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? *Química Nova*, v. 24, nº. 2, p. 247/251, 2001.
4. RAMOS, L. P. The chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. *Química Nova*, v. 26, nº. 6, p. 863/871, 2003.
5. MACHADO, G. O. . *Preparação e Caracterização de CMC e CMC Graftizada*, 2000. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/88/88131/tde-11092001-160555/publico/disgilmara.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2005.
6. SOLOMONS. T. W. & FRYHLE, C. B. *Organic Chemistry*. 7th edition, New York: John Wiley & Sons, 1998, 1258 p.

7. AGBLEVOR, F. A. JOST. WEBER. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulose production. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 669/679, 2004.
8. SHENG, J. et al. Immobilization of cellulose using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *Journal of membrane science*, v. 155, p. 101/106, 1998.
9. KIM, S. W. Production of cellulose and hemicellulase by *Aspergillus niger* KK2 from Lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 91, p.153/156, 2004.
10. GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of Food Engineering*, v. 74, p. 78/88, 2006.
11. LINCOLN, T. et al. Optimizing Peracetic Acid Pretreatment Conditions for Improved Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF) of Sugar Cane Bagasse to Ethanol fuel. *Renewable Energy*, v. 16, p. 1070/1073, 1999.
12. WYMAN, C. E. et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 1959/1966, 2005.
13. SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Biophysies & Molecular Biology*, v. 89, p. 245/291, 2005.
14. SOUZA, M. DE F. B. Separação e Identificação dos Constituintes do Bagaço de Cana e sua Conversão em Insumos Químicos pelo Processo "Organosolve", 1984, 109 p. Dissertação (mestrado Química) UNICAMP. Campinas.
15. SANTOS, C. P. et al. Papel: como se fabrica?. *Química Nova na Escola*, nº. 14, p. 3/7, nov., 2001.
16. AGUIAR, C. L. e MENEZES, T. J. B. Conversão Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, nº26, p. 52/55, maio/jun., 2002.
17. RABELO, S. C. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. 2007, 150 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas.

18. PITARELO, A.P., *Avaliação da suscetibilidade do bagaço e da palha da cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática.*

2007, 125p. Dissertação (mestrado em química) Universidade Federal do Paraná. Curitiba

19. REYES, J. et al. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulase. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. *Química Nova*, v. 21, nº 2, p.140/143, 1998.

20. RIBEIRO, E. J. et al. Influência da aeração na síntese de β -galactosidase por fermentação com *kluveromyces marxianus*. Disponível em: http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao%202006_1/c/gisele_duque.pdf.

Acesso em: 25 de abr. 2008.

21. GRILO, J. G. B. e ARAÚJO J. H. B. Conversão Enzimática de Resíduos Lignocelulósicos em Etanol. Disponível em: http://www.interfface.com.br/c/pdf/UTCIENCIA_2007_Baga%E7o_Jonathas.pdf.

Acesso em: 28 de abr. 2008.

22. REYS, J.; PERALTA-ZAMORA, P; DURÁN, N. Hidrólise Enzimática de Casca de Arroz Utilizando-se Celulases. Efeito de Tratamentos Químicos e Fotoquímicos. *Química Nova*, v. 21, nº 2, p. 140/143, 1998.