



Fundação Educacional do Município de Assis  
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis  
Campus "José Santilli Sobrinho"

**FERNANDA RODRIGUES PENA**

**OTIMIZAÇÃO DO PARÂMETRO CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓDO DE  
SÓDIO, EMPREGADO NO PRÉ – TRATAMENTO DO BAGAÇO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR, VISANDO À OBTENÇÃO DE ETANOL  
CELULOSICO.**

Assis

2011

FERNANDA RODRIGUES PENA

**OTIMIZAÇÃO DO PARÂMETRO CONCENTRAÇÃO DE HIDRÓDO DE SÓDIO, EMPREGADO NO PRÉ – TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, VISANDO À OBTENÇÃO DE ETANOL CELULOSICO.**

Trabalho de Programa de Iniciação Científica Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Programa de Iniciação Científica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Leiva de Faria

Área de Concentração: Química

Assis

2011

## FICHA CATALOGRÁFICA

PENA, Fernanda Rodrigues

Otimização de parâmetro concentração de hidróxido de sódio, empregado no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, visando à obtenção de etanol celulósico/ Fernanda Rodrigues Pena. Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA -- Assis, 2011.

45p.

Orientador: Mary Leiva de Faria.

Co-Orientador: Ms. Rafael Elias Martins

Trabalho de Iniciação Científica – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

1. Bioetanol. 2. Hidrólise enzimática. 3. Cana-de-açúcar.

CDD:660  
Biblioteca da FEMA

## RESUMO

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. Convenientemente a biomassa é um recurso sustentável, capaz de fornecer combustíveis líquidos e contribuir para sustentabilidade nas áreas ambiental, social e econômica. Os métodos atuais envolvidos na produção de etanol a partir de biomassa celulósica, usando conversão biológica, envolvem: 1) pré-tratamento do material lignocelulósico; 2) hidrólise dos intermediários celulósicos à açúcares fermentáveis; 3) fermentação para produzir etanol celulósico. O pré-tratamento na fase inicial de bioconversão é necessário devido às características morfológicas dos materiais lignocelulósicos que apresentam estrutura recalcitrante, o que dificulta o acesso dos agentes enzimáticos e promove uma consequente baixa digestibilidade da celulose. Embora muitos métodos biológicos, químicos e físicos tenham sido testados nestes últimos anos, avanços neste processo ainda são necessários para que o custo se torne competitivo com os combustíveis convencionais. Por isso que um estudo do pré-tratamento hidrotérmico com deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar, visando saber qual a concentração mínima de NaOH necessária é importante. Neste contexto o objetivo deste trabalho é validar o modelo estatístico realizando vários pré-tratamentos hidrotérmicos com deslignificação alcalina à pressão de 1,2 Kgf/cm<sup>2</sup>, para confirmar a melhor região de concentração de NaOH. Para isto primeiramente o bagaço foi lavado com água a 73°C. Empregando-se o planejamento fatorial foram realizados os pré-tratamentos do bagaço com NaOH em diferentes concentrações (3%, 4% e 5%) e diferentes pressões de trabalho (1,2; 1,25 e 1,3 Kgf/cm<sup>2</sup>). O bagaço com pré-tratamento hidrotérmico alcalino a 3% nas diferentes pressões foi submetido à etapa de hidrólise enzimática. Para a quantificação de açúcar produzido utilizou-se o método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Como não foi possível realizar as hidrólises de todos os bagaços pré-tratados, não foi possível saber qual a concentração mínima de NaOH para o pré-tratamento.

**Palavras-chave:** Bioetanol, Hidrólise enzimática, Cana-de-açúcar

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura da cadeia celulósica .....	14
Figura 2	- Estrutura da O-acetil-(4-O-metilglucurônico)-xilana.....	15
Figura 3	- Estrutura proposta para a lignina.....	16
Figura 4	- Álcoois precursores da lignina.....	17
Figura 5	- Estrutura recalcitrante do material lignocelulósico .....	17
Figura 6	- Complexo lignocelulósico .....	18
Figura 7	- Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento.....	19
Figura 8	- Estrutura terciária da celulase de <i>Trichoderma reesei</i> (modelo de fita)..	22
Figura 9	- Regiões cristalinas e amorfas na fibra de biomassa vegetal .....	23
Figura 10	- Representação da conversão enzimática de celulose em glicose por enzimas celulasas.....	24
Figura 11	- Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 3% .....	34
Figura 12	- Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 4%.....	34
Figura 13	- Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 5%.....	35
Figura 14	- Reações envolvidas no Método de dosagem de açúcares com DNS.....	35
Figura 15	- Curva de calibração de açúcar redutor .....	36
Figura 16	- Curva de hidrólise longa utilizando bagaço pré-tratado com NaOH 4% em diferentes valores de pressão .....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-Planejamento fatorial.....	29
Tabela 2	-Concentrações e absorbâncias da curva de calibração.....	36
Tabela 3	- Valores de absorbância, diluição e concentração de açúcares reductores obtidos.....	37
Tabela 4	- Conversão enzimática de bagaço em glicose .....	38
Tabela 5-	-Valores de concentração de açúcares reductores obtidos na hidrólise longa.....	38

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>O EMPREGO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA.....</b>	<b>13</b>
2.1	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	14
2.2	PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS...	18
<b>3.</b>	<b>HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1	EQUIPAMENTOS.....	26
4.2	REAGENTES.....	27
4.3	MATERIAIS.....	27
4.4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.4.1	Etapa de lavagem e obtenção de bagaço in-natura.....	28
4.4.2	Planejamento Fatorial.....	28
4.4.3	Pré-tratamento com hidróxido de sódio variando suas concentrações.....	29
4.4.4	Preparação da curva de calibração.....	30
4.4.5	Preparação de solução tampão citrato .....	31



4.4.6	<b>Preparo da solução de DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico).....</b>	<b>31</b>
4.5	<b>HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>31</b>
4.5.1	<b>Hidrólise enzimática utilizando enzima livre.....</b>	<b>31</b>
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
6.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS :.....</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A maior parte de toda a energia consumida no mundo é proveniente de fontes não renováveis, como o petróleo, carvão e gás natural (FERRARI et al., 2005). 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 limpas (MARTINS, 2007). Além disso, a poluição ambiental proveniente da queima de combustíveis fósseis pela emissão de gases de efeito estufa e seu efeito nocivo nas mudanças climáticas são fatores que justificam o aumento no interesse por fontes de energia renováveis. Convenientemente a biomassa é um recurso sustentável, capaz de fornecer combustíveis líquidos e produtos químicos em larga escala e contribuir para sustentabilidade nas áreas ambiental, social e econômica. (DA COSTA SOUSA et al., 2009; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

Segundo Suarez et al. (2009, p. 768), “as pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo”. Neste foco, a biomassa ocupa um lugar de destaque devido sua natureza renovável, sua grande disponibilidade, biodegradabilidade e aquisição de baixo custo, além de reduzir a emissão de carbono no ambiente (SUAREZ et al., 2009; GOLDEMBERG, 2009).

A produção sustentável de biocombustível, como o etanol, a partir de biomassa lignocelulósica é considerada uma das alternativas mais adequadas, uma vez que materiais lignocelulósicos como resíduos agrícolas e florestais estão amplamente disponíveis, promovendo simultaneamente formas para a redução da emissão de gases de efeito estufa (DA COSTA SOUSA et al., 2009).

Segundo SCHUCHARDT (2001), para um país tropical como o Brasil, a biomassa é o substituto natural para o petróleo.

No Brasil, a biomassa lignocelulósica para a produção de biocombustíveis apresenta uma série de resíduos agrícola tais como: palhas, caules, cascas, madeiras

coníferas e folhosas, resíduos das indústrias de polpa e papel e colheitas herbáceas (DA SILVA, 2009).

Devido à grande quantidade de cana-de-açúcar processado todos os anos provenientes das indústrias sucroalcooleiras Brasileiras, é gerado um excedente de bagaço e palha em comparação à quantidade de cana-de-açúcar produzida. Na safra 2007/2008 houve uma geração de quase 140 milhões de toneladas dessa biomassa vegetal, sendo que a maioria foi utilizada para gerar energia elétrica para a própria indústria. Contudo, há um excedente de 10-30% dependendo do tipo de caldeira empregada (CÂNDIDO et al., 2009).

O bagaço de cana-de-açúcar é constituído de celulose, hemicelulose e lignina na proporção aproximada de 50:30:20 (SILVA, 2008). A organização e interação entre essas três estruturas na parede celular da planta promovem uma propriedade natural de recalcitrância à degradação biológica (DA SILVA, 2009; DA COSTA SOUSA et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

Os métodos atuais envolvidos na produção de etanol a partir de biomassa celulósica, usando conversão biológica, envolvem três etapas: 1) pré-tratamento do material lignocelulósico, o qual converte a estrutura lignocelulósica recalcitrante à intermediários celulósicos mais acessíveis ao ataque enzimático; 2) aplicação de coquetéis enzimáticos especiais, os quais hidrolisam os intermediários celulósicos à açúcares fermentáveis (isto é, glicose e xilose); e 3) fermentação para produzir etanol celulósico (GOLDEMBERG, 2009; ZHANG et al., 2007).

O pré-tratamento na fase inicial de bioconversão é necessário devido às características morfológicas dos materiais lignocelulósicos que apresentam estrutura recalcitrante, o que dificulta o acesso dos agentes enzimáticos e promove uma consequente baixa digestibilidade da celulose (DA COSTA SOUSA et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa (SILVA, 2008) estudou o efeito de vários métodos de pré-tratamento na deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar: tratamento hidrotérmico, tratamento hidrotérmico alcalino com NaOH 4%, tratamento hidrotérmico ácido com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 4% e tratamento hidrotérmico ácido com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. Dentre os métodos de pré-tratamentos utilizados, o mais eficiente foi o método tratamento hidrotérmico alcalino com NaOH 4% e o menos eficiente foi o método de

tratamento hidrotérmico ácido com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%. A pouca eficiência obtida na deslignificação com ácido sulfúrico contraria os dados de literatura (WYMAN, 2005), os quais apontam o pré-tratamento com ácido sulfúrico entre as opções mais promissoras. Porém, acredita-se que  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10% além de causar despolimerização da lignina e a quebra da ligação lignina-hemicelulose, pode ter causado também a degradação dos oligopolímeros correspondentes. Para verificar esta hipótese MORAES (2009) efetuou o pré-tratamento com ácido sulfúrico em concentrações mais diluídas (0,5% a 2%). Os resultados obtidos neste estudo confirmaram a hipótese da degradação dos oligopolímeros em altas concentrações de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pois em todas as concentrações mais diluídas testadas (0,5 a 2%), obteve-se maior concentração de açúcar redutor quando comparada com o pré-tratamento utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%, o qual forneceu 5,10 g/L do mesmo açúcar. Das diluições efetuadas, a que forneceu maior concentração de açúcar redutor (16,58 g/L) foi tratamento hidrotérmico com ácido sulfúrico 2%. Estudou-se também o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio em pH 11,5 e tratamento hidrotérmico alcalino com hidróxido de sódio na concentração de 4%. De todos os pré-tratamentos estudados, tratamento hidrotérmico alcalino foi que forneceu maior concentração de açúcar redutor (29,14 g/L). Tendo em vista que os resultados novamente indicaram que o pré-tratamento mais eficiente foi o alcalino, MORAES (2010) realizou um estudo visando otimizar o parâmetro concentração de hidróxido de sódio, fazendo-se um planejamento fatorial, utilizando ANOVA como ferramenta estatística. O planejamento fatorial foi desenvolvido para encontrar as melhores variáveis de processos na etapa do pré-tratamento. Para isso foi considerada as variáveis pressão da autoclave (1,0; 1,25 e 1,50  $\text{Kgf/cm}^2$ ) e concentração da solução de hidróxido de sódio (4,0; 5,0 e 6,0 %).

A avaliação deste estudo de otimização foi feito através de um gráfico de superfície de resposta, o qual indicou, pelo modelo estatístico, que a melhor interação entre as variáveis ocorreram na região de 3,3 a 4,8 de concentração (% NaOH) e de 1,2 a 1,32 de pressão ( $\text{Kgf/cm}^2$ ). Portanto, para a otimização do processo propõe-se um estudo mais detalhado nesta faixa considerada ótima.

A redução eficiente da estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a consequente liberação dos polissacarídeos estão entre as mais importantes e

urgentes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento de etanol celulósico. Este pré-tratamento necessita ser de baixo custo, evitando o elevado consumo de reagentes químicos, a alta demanda energética e a degradação dos materiais lignocelulósicos. Embora muitos métodos biológicos, químicos e físicos tenham sido testados nestes últimos anos, avanços neste processo ainda são necessários para que o custo se torne competitivo com os combustíveis convencionais. Por isso que um estudo do pré-tratamento hidrotérmico com deslignificação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar, visando saber qual a concentração mínima de NaOH necessária é importante.

Neste contexto o objetivo deste trabalho é validar o modelo estatístico realizando vários pré-tratamentos hidrotérmicos com deslignificação alcalina com as concentrações de NaOH variando de 3% a 5% e nas pressões de 1,2 Kgf/cm<sup>2</sup>, 1,25 Kgf/cm<sup>2</sup> e 1,3 Kgf/cm<sup>2</sup>, para confirmar a melhor região de concentração de NaOH.

## **2. O EMPREGO DOS RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR COMO MATÉRIA-PRIMA LIGNOCELULÓSICA**

A indústria sucroalcooleira tem crescido muito nos últimos anos, levando a um aumento na geração de resíduos agroindustriais como palha e bagaço de cana-de-açúcar (DA SILVA 2009). Estes resíduos além de serem materiais abundantes, apresentam baixo custo (SILVA 2008)

O bagaço e a palha de cana-de-açúcar representam em média 14% da planta, ou seja, um total de 280 kg de material lignocelulósico por tonelada de cana processada (140kg de palha e 140Kg de bagaço chamada de matéria seca). Na safra 2008/2009 acumulou 130 toneladas desses resíduos (DA SILVA, 2009).

Material lignocelulósico é um termo empregado para descrever os principais constituintes na maioria dos vegetais, ou seja, a celulose, a hemicelulose e a lignina, cuja composição varia não apenas com o tipo de vegetal, mas também com as condições de crescimento, com a parte da planta escolhida e com a idade de colheita, etc. (OGEDA e PETRI, 2010).

Da Silva (2009) comenta que a palha queimada no campo durante a colheita, é um problema, pois gera fuligem e CO<sub>2</sub>, os quais são despejados em grande quantidade na atmosfera. O CO<sub>2</sub> contribui para o aumento do efeito estufa, enquanto as fuligens, que chegam às cidades e pousam no chão na forma de finos flocos escuros, causam sérios problemas respiratórios na população exposta.

A indústria sucroalcooleira, para gerar energia elétrica, utiliza o bagaço de cana-de-açúcar através de sua queima por meio de caldeiras. Este processo é empregado por não oferece custos de transporte e pelo fato do bagaço encontrar-se disponível em grande quantidade, geralmente em montes acumulados no pátio da indústria. A queima de 6,5 toneladas de bagaço gera 1MWh de energia (DA SILVA, 2009).

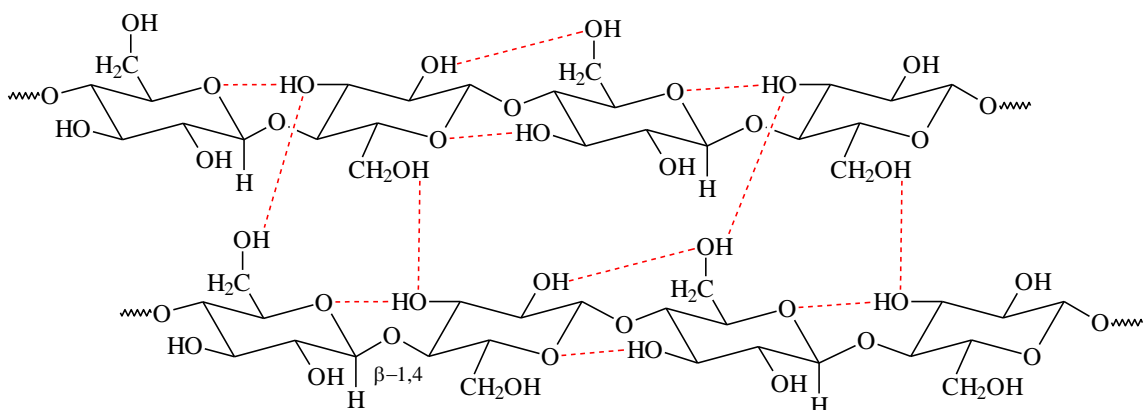
De acordo com SILVA (2008), a geração de energia por queima do bagaço causa poluição, devido à grande quantidade de CO<sub>2</sub> emitido na atmosfera. Uma alternativa

para evitar o impacto ambiental causado pelo CO<sub>2</sub> seria a produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana-de-açúcar, resultando em um produto de maior valor agregado. Nas últimas safras foram produzidos mais de 10 milhões de toneladas de bagaço de cana-de-açúcar, no qual 6 a 10% desse total não tem destinação apropriada. Desta forma, este excesso de material lignocelulósico poderia ser empregado na produção de bioetanol.

## 2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é um material lignocelulósico constituído basicamente por três polímeros: celulose (polímero de glicose), hemicelulose (cadeias ramificadas de açúcares, na maioria aldopentoses, principalmente xilose) e lignina (polímero de fenilpropano), na proporção aproximada de 50:30:20 respectivamente (WYMAN et al., 2005; SILVA, 2008; MOUTTA, 2009).

A celulose (figura 1) é um biopolímero linear com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 entre unidades de glicose (ZHANG, 2008, OGEDA e PETRI, 2010), o que permite uma disposição de 180° entre estas moléculas. Esta disposição no espaço torna a cadeia de celulose uma macromolécula linear (MOUTTA, 2009).



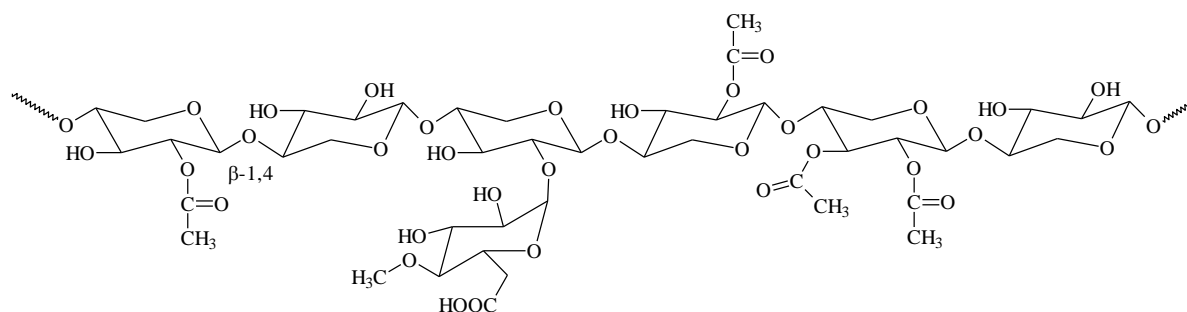
**Figura 1 – Estrutura da cadeia celulósica (In: ZHANG, 2008, p. 370)**

Segundo Da Silva (2009), uma cadeia de celulose pode conter mais de 15.000 unidades de glicose.

Na estrutura da celulose estão presentes vários grupos hidroxilas (OH), os quais permitem que ligações de hidrogênio inter e intramolecular (figura 1) se formem entre as cadeias, gerando regiões cristalinas. Este tipo de interação entre as cadeias permite a formação de micro-fibrilas com alto grau de cristalinidade. Porém, em algumas regiões dessas fibrilas que serão formadas, podem ocorrer irregularidades das interações, gerando então as regiões amorfas na rede cristalina (MOUTTA, 2009).

A alta resistência à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática é decorrente das regiões cristalinas presentes na celulose (DA SILVA, 2009).

A hemicelulose é uma mistura de diferentes polissacarídeos, cuja composição depende do tipo de planta (SILVA, 2008). As polioses são geralmente formadas com um grau de polimerização com variação entre 100 a 200 unidades de repetição, atingindo no conjunto uma massa molecular bem menor que a da celulose (MOUTTA, 2009). As hemiceluloses são geralmente classificadas conforme o resíduo de açúcar principal do polímero, com por exemplo, xilanas, mananas e glucomananas (DA SILVA, 2009, OGEDA e PETRI, 2010). A hemicelulose do bagaço da cana consiste principalmente de xilanas (figura 2), um homopolímero unido por ligações  $\beta$ -1,4 de xilose, podendo apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetilados ligados à cadeia principal (SILVA, 2008; DA SILVA, 2009).

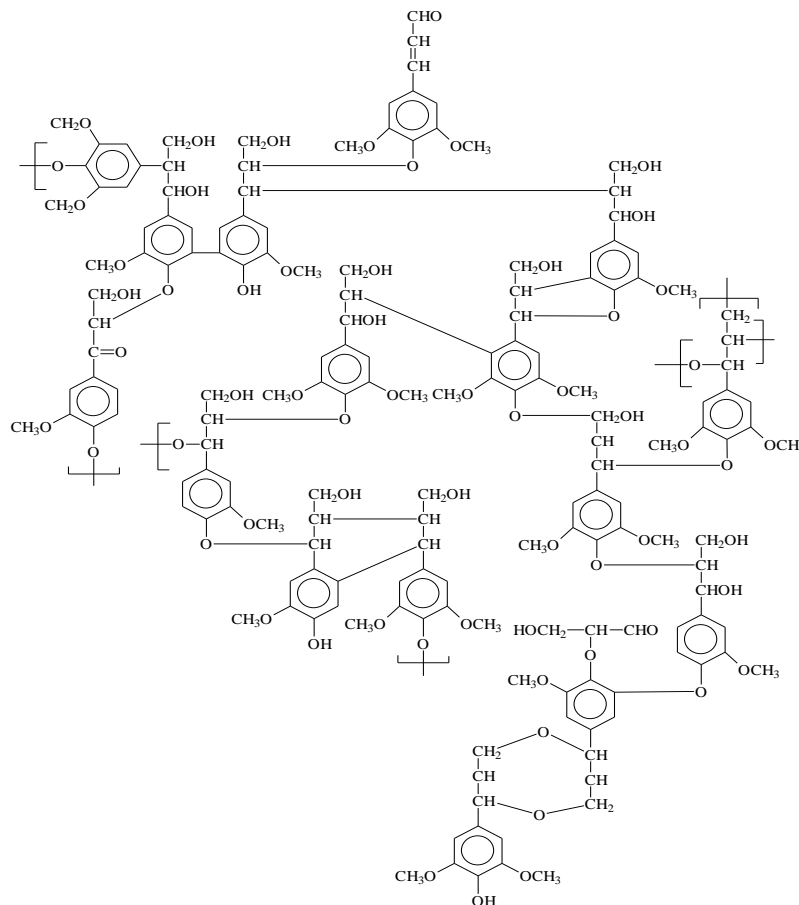


**Figura 2 – Estrutura da O-acetil-(4-O-metilglucurônico)-xilana (In: SILVA, 2008, p. 7).**

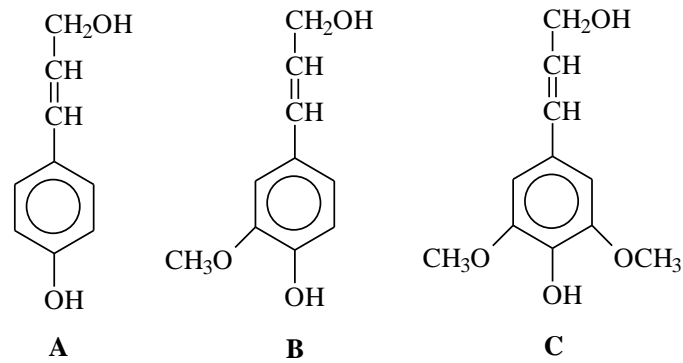


Por possuir grande parte de uma estrutura molecular amorfa e por apresentar uma combinação de vários açúcares, a hemicelulose é mais solúvel em água e apresenta maior facilidade para ser degradada que a celulose. Nos materiais lignocelulósicos funciona como uma fase adesiva na estrutura do material, estando intimamente ligada à celulose e à lignina (DA SILVA, 2009). Segundo Ogeda e Petri (2010), “acredita-se as interações entre hemiceluloses e as microfibrilas de celulose sejam mais fortes do que as interações entre as hemiceluloses e ligninas”.

Altamente complexa e com ramificação tridimensional, a lignina (figura 3) é uma macromolécula amorfa, que resulta da condensação dos álcoois hidroxicinâmicos: *p*-cumarílico (A), coniferílico (B) e sinapílico (C) (figura 4) (SILVA, 2008; DA SILVA, 2009).



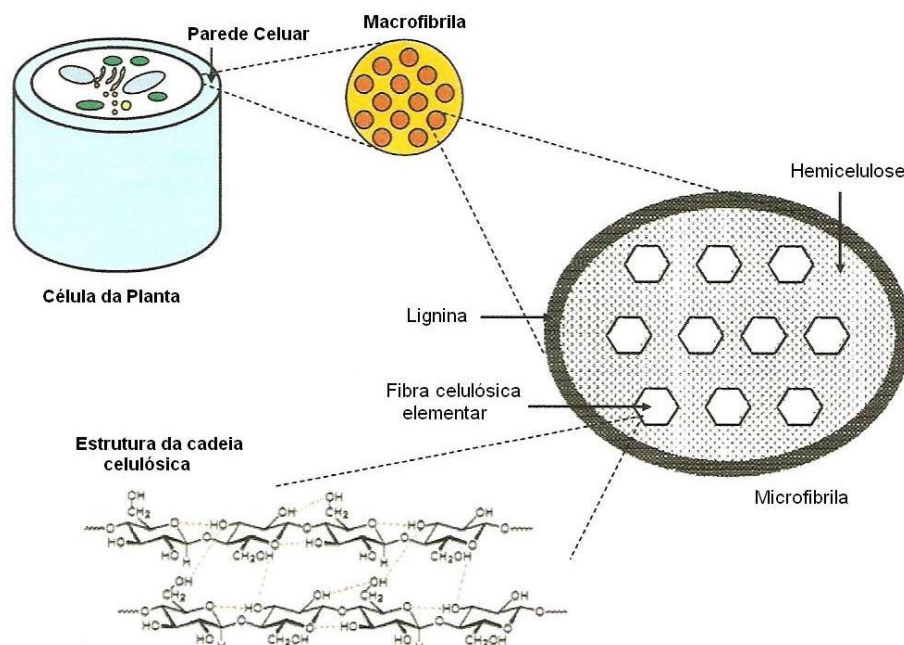
**Figura 3 – Estrutura proposta para a lignina (In: SANTOS et al., 2001, p. 5).**



**Figura 4 – Álcoois precursores da lignina: A – álcool p-cumarílico; B – álcool coniferílico; C – álcool sinapílico (In: FIALHO, 2010, p. 364).**

A lignina aumenta a resistência mecânica das plantas, atuando como um agente de endurecimento e protegendo a parede celular contra o ataque enzimático de microorganismos (SANDGREN; STAHLBERG; MITCHINSON, 2005).

A celulose, hemicelulose e lignina, são os principais componentes da parede celular das plantas e juntas formam uma estrutura complexa e rígida (figura 5).

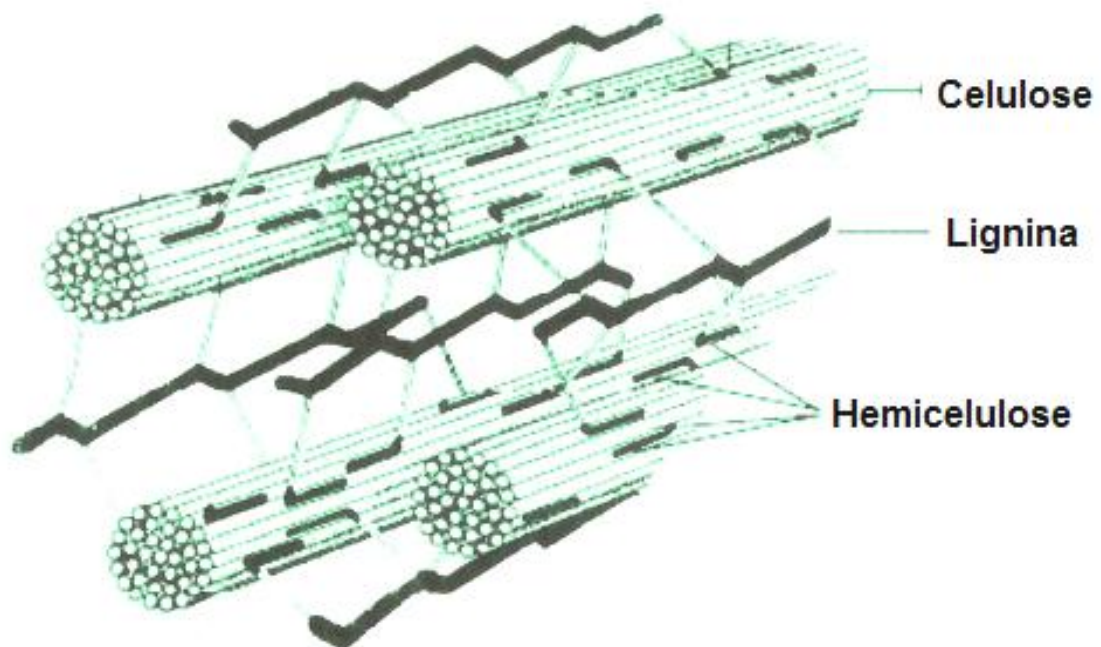


**Figura 5 – Estrutura recalcitrante do material lignocelulósico, o qual é composto por celulose, hemicelulose e lignina (In: ZHANG, 2008, p. 370)**

## 2.2 PRÉ-TRATAMENTO DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O que confere ao material lignocelulósico resistência à degradação química e biológica é a complexa estrutura desta biomassa (ZHANG, 2008). Segundo Da Silva (2009, p. 38), “a eficiente redução desta estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos e a liberação dos polissacarídeos estão entre uma das mais importantes e urgentes nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico”.

Apesar do grau de polimerização, da cristalinidade da celulose e da área superficial acessível serem fatores atribuídos a recalcitrância do material lignocelulósico, duas as causas principais de resistência desta biomassa à hidrólise enzimática: 1) baixa acessibilidade às fibras celulósicas micro-cristalinas, a qual impede a ação eficiente das celulases, e 2) presença de hemicelulose e principalmente de lignina na superfície da celulose (figura 6), que impede a celulase de acessar o substrato eficientemente. (ZHANG, 2008; DA SILVA, 2009)



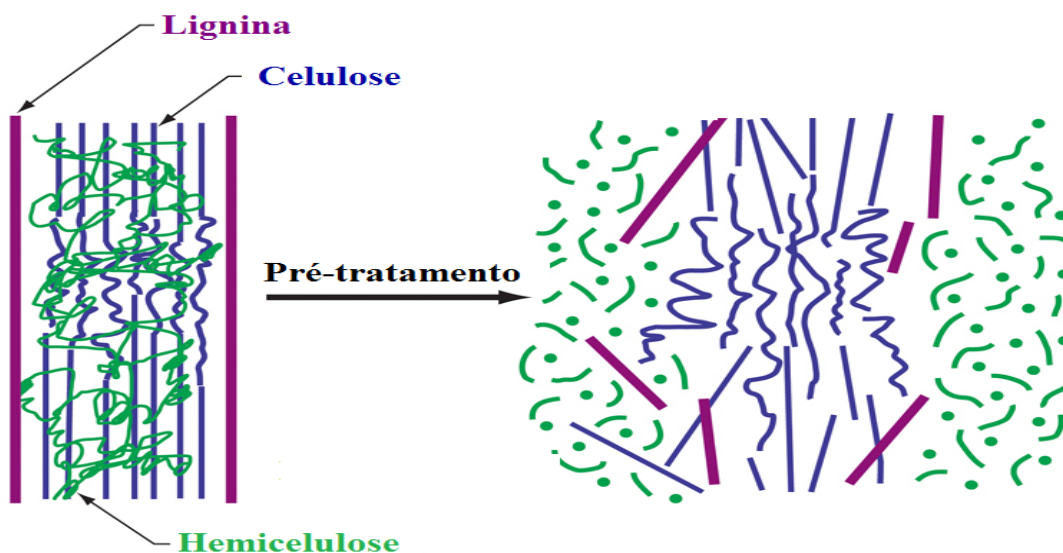
**Figura 6 – Complexo lignocelulósico (In: SILVA, 2008, p. 9).**

A hemicelulose, neste complexo lignocelulósico, está ligada por ligações covalentes, sendo que uma destas ligações ocorre entre a lignina e o ácido glucurônico ligado a xilana. Já com as fibras de celulose a hemicelulose se liga por ligações de hidrogênio (ZHANG, 2008).

Para que a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos seja eliminada torna-se necessário um pré-tratamento, o qual tem a finalidade de romper a parede celular, bem como diminuir a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina, permitindo assim, um maior acesso das enzimas hidrolíticas a macroestrutura da biomassa, que resulta em uma conversão da celulose em glicose mais eficiente (DA SILVA, 2009; WYMAN et al., 2005).

Geralmente, a hidrólises enzimáticas apresentam um rendimento de açúcar menor que 20%, ao passo que, se for utilizada uma etapa de pré-tratamento, o rendimento pode alcançar até > 90% (OGEDA e PETRI, 2010).

Os três constituintes do material lignocelulósico são fracionados (figura 7) no pré-tratamento, levando a um conseqüente aumento da suscetibilidade da celulose ao ataque enzimático (SILVA, 2008).



**Figura 7 – Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento  
(In: Silva, 2008, p. 10).**

Atualmente, há uma grande diversidade de processos de pré-tratamento do material lignocelulósico disponíveis, podendo ser físicos, químicos, biológicos ou de fracionamento por solvente (DA COSTA SOUSA et al., 2009; OGEDA e PETRI, 2010). As operações físicas de pré-tratamento baseiam-se na redução do tamanho da partícula por intermédio de moagem, que aumenta a atividade da enzima pelo fato de se aumentar a área superficial, e em alguns casos, pelo grau de polimerização e a cristalinidade da celulose ser diminuída (OGEDA e PETRI, 2010).

De acordo com pesquisadores as principais tecnologias de pré-tratamento são os pré-tratamentos químicos, os quais incluem os pré-tratamentos ácidos, alcalinos e oxidativos. A diferença da maior parte destes pré-tratamentos reside nos tipos de química e mecanismos que provocam as modificações estruturais e químicas da parede celular, resultando em uma maior acessibilidade da enzima, bem como em rendimentos maiores (DA COSTA SOUSA et al., 2009; OGEDA e PETRI, 2010).

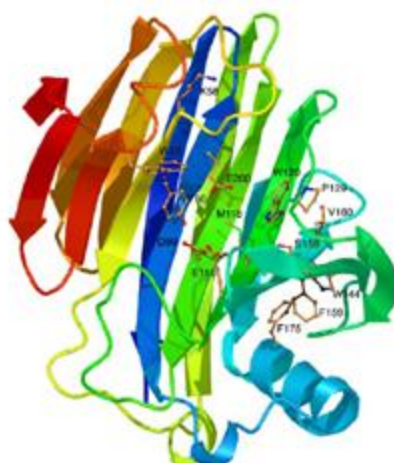
Nos pré-tratamentos que utilizam ácidos como catalisadores, a camada de hemicelulose é hidrolisada, ao passo que nos pré-tratamentos catalisados por bases, é removida parte da lignina e a hemicelulose tem que ser hidrolisada pelo emprego de hemicelulases (OGEDA e PETRI, 2010).

Segundo Ogeda e Petri (2010), a explosão a vapor é uma das tecnologias de pré-tratamento mais implementada e tem sido aplicada com sucesso a vários tipos de biomassa celulósica (madeiras macias e duras, além de resíduos agrícolas). Este tipo de pré-tratamento pode ocorrer na presença ou não de catalisadores químicos (ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, dióxido de enxofre e amônia) e opera a altas temperaturas (160-290°C) e pressão, por certo período de tempo (de alguns segundos até vários minutos), antes que seja explosivamente liberada a pressão (OGEDA e PETRI, 2010). Os autores descrevem ainda os pré-tratamentos biológicos, que normalmente empregam fungos e algumas bactérias (actinomicetes), os quais secretam durante o processo, enzimas extracelulares como lignina peroxidases e lacases que ajudam na remoção de uma quantidade considerável de lignina da biomassa.

Um estudo comparativo de pré-tratamentos do bagaço de cana , foi realizado por CÂNDIDO et al. (2009). Neste estudo foram testados três diferentes tipos de pré-tratamentos, a explosão a vapor, a auto-hidrólise por impregnação com vapor e um tratamento biológico com xilase. Os resultados preliminares indicam um rendimento satisfatório dos pré-tratamentos na remoção da lignina e hemicelulose. O estudo revelou ainda, que não é suficiente apenas uma etapa de pré-tratamento, sendo necessário um processo complementar. Este fato foi evidenciado pelos resultados da hidrólise enzimática do material tratado por explosão a vapor, que obteve maior concentração de glicose quando o material foi tratado juntamente com NaOH (hidróxido de sódio).

### 3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

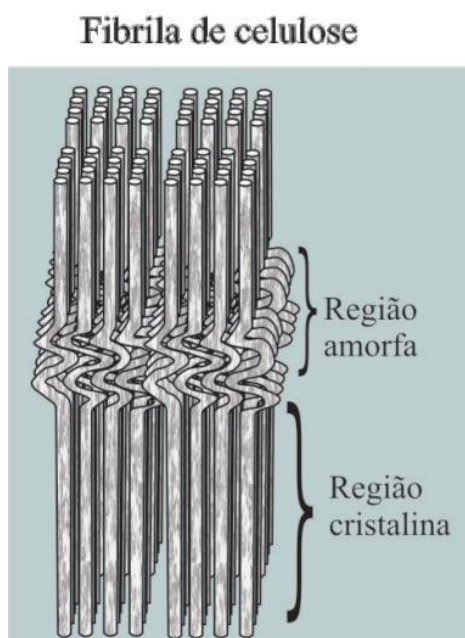
A hidrólise da celulose presente no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, é necessário para obtenção de açúcares redutores dessa biomassa (DA SILVA, 2009). Para que produtos inibitórios não sejam formados na posterior etapa de fermentação e produção de etanol, a reação de hidrólise é catalisada por enzimas específicas, (enzimas celulolíticas), geralmente um complexo enzimático constituído de celulasas (figura 8) e xilanases (MORAES, 2009).



**Figura 8 – Estrutura terciária da celulase de *Trichoderma reesei* (modelo de fita) (In: Silva, 2008, p. 12).**

A celulose encontrada na parede celular de vegetais, é a estrutura mais resistente á degradação biológica, por apresentar regiões cristalinas, bem estabilizadas de ligações inter e intra moleculares (figura 1), enquanto outras regiões menos organizadas ditas regiões amorfas, (figura 9), são mais suscetíveis ao ataque de enzimas (DA SILVA, 2009). Segundo Ogeda e Petri (2010) a estrutura altamente cristalina da celulose é que dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos. A dificuldade também é aumenta pelo fato da celulase adsorver fisicamente sobre

ligninas, tornando-se necessário a etapa de pré-tratamento para que esta estrutura cristalina da lignocelulose possa ser quebrada e a lignina removida, expondo a celulose e hemicelulose à ação enzimática.



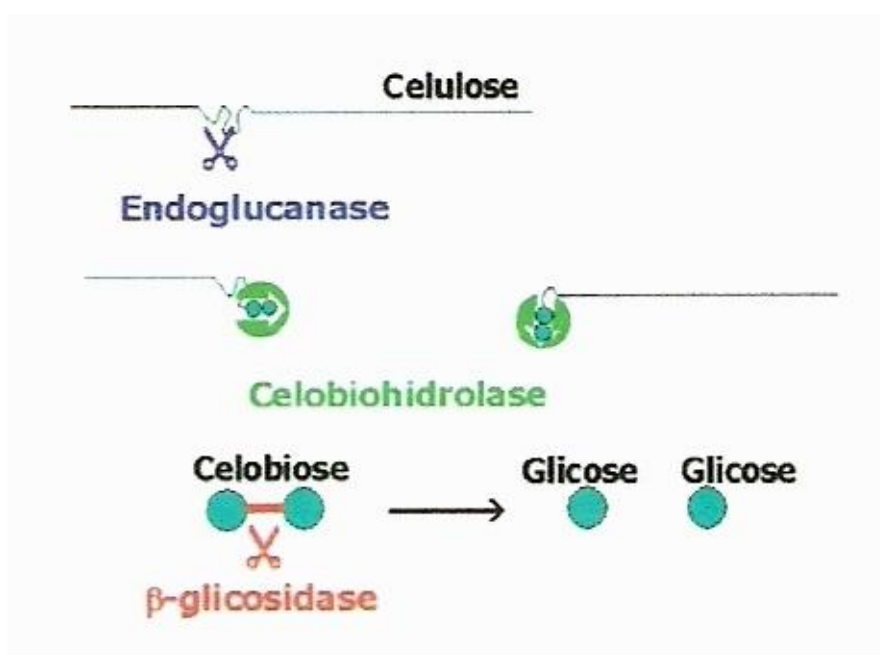
**Figura 9 – Regiões cristalinas e amorfas na fibra de biomassa vegetal (In: RUBIRA et al, 2009, p. 666).**

Para uma hidrólise efetiva da celulose precedente de biomassa vegetal em açúcares de baixo peso molecular é necessária a ação de complexos enzimáticos, os quais têm sido efetivos na sacarificação da celulose (DA SILVA, 2009; MORAES, 2009).

Devido à cristalinidade do substrato, a conversão enzimática da celulose em glicose é uma tarefa difícil, contudo complexos de enzimas produzidos por microrganismos se mostram capazes de catalisar a reação de hidrólise. Essa conversão ocorre porque as enzimas celulases atuam sinergeticamente, estando envolvidas pelo menos três classes principais: 1) Endoglucanases (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases), as quais quebram as ligações glicosídicas das cadeias de celulose gerando novos terminais; 2) Celobio-hidrolases (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases), as quais são responsáveis pela ação nos terminais, resultando em celobiose, e por fim 3)  $\beta$ -glicosidases (1,4- $\beta$ -D-glucosidases), que convertem as moléculas de celobiose em



duas moléculas de glicose, com a finalidade de eliminar a inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo de celobiose (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006; OGEDA e PETRI, 2010). A figura 10 representa de forma simplificada a ação enzimática de cada classe de enzimas. As endoglucanases agem aleatoriamente nas regiões amorfas da celulose e de seus derivados, hidrolisando ligações glicosídicas  $\beta$ -(1,4). As celobiohidrolases (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanases) agem nos terminas redutores das cadeias de celulose liberando D-celobiose. Já as  $\beta$ -glicosidases catalisam a liberação de moléculas de glicose a partir de celobiose.



**Figura 10** – Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre ração de glicose (In: OGEDA e PETRI, 2010, p. 1551).

Segundo Da Silva (2009), o fungo *Trichoderma reesei* é o microorganismo mais empregado para a produção de celulasas. Contudo, pelo fato da produção de  $\beta$ -glicosidase ser baixa, a conversão de celobiose a glicose pode ser restringida, o que pode levar a inibição da atividade das celulasas pelo acúmulo da celobiose. Desta forma, um suplemento de  $\beta$ -glicosidase, proveniente do fungo *Aspergillus sp.*, é necessário para reduzir o efeito inibitório da celobiose nas celulasas e por consequência, aumentar o rendimento de conversão de celulose em glicose.

Segundo Ogeda e Petri (2010), “o *Trichoderma reesei* produz duas celobio-hidrolases, ao menos cinco endo-glucanases e duas  $\beta$ -glucosidades”. Os autores descrevem ainda que além das celulasas de fungos, existem também celulasas produzidas por bactérias aeróbicas e anaeróbicas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 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).
- Balança semi-analítica (modelo: B-tec-1300)
- Bico de bunsen.
- chapa aquecedora (Fisatom 503)
- Espectrofotômetro (Tecnal/Fentom 700 Plus).
- Estufa (Tecnal-397/4).
- Micropipeta (Lab Mate, vol. 100 – 1000 µL).
- Peneira de 100 mesh (Bertel Ind. Metalúrgica Ltda).
- Peneira de 60 mesh (Bertel Ind. Metalúrgica Ltda).
- pHmetro digital (Tecnal).
- Termômetro (Icoterm – 635).

## 4.2 REAGENTES

- Ácido 3,5 - dinitro salicílico (Vetec).
- Água destilada.
- Bagaço de cana-de-açúcar cedido pela Usina Cocal de Tarumã-SP.
- Celulase de origem microbiana *Trichoderma reesei*-Novozymes A/S (NS50013).
- Glicose (Vetec).
- Hidróxido de sódio (Quimex).
- Indicador universal (Merck).
- Quitosana Polymar
- Solução indicador sal sódico vermelho de metila
- Solução hidróxido de sódio 3, 4 e 5%
- Solução indicador fenolftaleína
- Solução HCl 0.1%
- Tartarato de sódio e potássio. (Chemco)

## 4.3 MATERIAIS

- Balão Volumétrico de 1000, 200, 50 mL
- Bastão de vidro.
- Béquer de 2000, 1000, 600, 250 e 100mL.
- Boneca (algodão papel alumínio e fita adesiva).
- Cubeta de vidro.
- Espátula.
- Frasco de vacina.

- Funil de vidro.
- Gamela
- Grade para tubo de ensaio.
- Papel Whatman
- Pinça stainless LB2 – S4
- Bureta de 50mL.
- Proveta de 250 mL.
- Rolha de borracha.
- Tubo Falcom 5mL
- Tubo de Folin Won de 25 mL.

#### 4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

##### **4.4.1 Etapa de lavagem e obtenção de bagaço in-natura**

O bagaço de cana foi dividido em frações de 50 gramas e cada fração foi adicionada em um béquer de 2000 mL com 1600 mL de água destilada. A mistura foi aquecida a 73°C e mantida nesta temperatura por 2 horas sob agitação mecânica constante de 1000 RPM, trocando a água a cada meia hora. Em seguida a mistura foi filtrada e as frações foram secas em estufa a 70°C até obter massa constante, obtendo-se o bagaço in-natura.

##### **4.4.2 Planejamento Fatorial**

O planejamento fatorial foi desenvolvido para encontrar as melhores variáveis de processos na etapa do pré-tratamento. Para isso foi considerada as variáveis pressão da autoclave (em Kgf/cm<sup>2</sup>) e concentração da solução de hidróxido de sódio

(em %). A escolha dessas variáveis se deu pelo fato das mesmas estarem ligadas diretamente ao processo de pré-tratamento. A tabela 1 representa o planejamento fatorial realizado.

Variáveis	Níveis		
	-1	Ponto central	+1
Concentração (%)	3	4	5
Pressão (Kgf/cm <sup>2</sup> )	1,20	1,25	1,30

**Tabela 1 – Planejamento Fatorial**

#### **4.4.3 Pré-tratamento com hidróxido de sódio variando suas concentrações**

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 3% à pressão 1,2Kgf/cm<sup>2</sup>, denominado tratamento hidrotérmico, foi realizado em uma etapa. Foram introduzidos 12,5 gramas de bagaço e 250 mL de solução hidróxido de sódio 3% em um erlenmeyer de 500 mL, o qual foi vedado com uma boneca. Em seguida, este sistema foi colocado em uma autoclave e autoclavado á pressão 1,2Kgf/cm<sup>2</sup> durante 30 minutos. Depois o bagaço foi filtrado simultaneamente em peneira tamis de 60 e 100 mesh, lavado com água destilada e neutralizado com uma solução de ácido clorídrico 0,1%. A neutralização foi verificada com indicadores de ácido e base adicionados na água de lavagem do sistema filtrante do bagaço. Após ficar em média 12 horas filtrando em tamis, o bagaço retido na peneira de 60 mesh foi seco em estufa a 70°C até obter massa constante, obtendo-se o bagaço pré-tratado denominado B<sub>3</sub>P<sub>1,2</sub>.

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 3% à pressão 1,25Kgf/cm<sup>2</sup>, denominado, tratamento hidrotérmico foi realizado em uma etapa, a mesma descrita anteriormente, variando o parâmetro da autoclavagem, pressão 1,25 Kgf/cm<sup>2</sup>, respectivamente, obtendo-se o bagaço pré-tratado denominado B<sub>3</sub>P<sub>1,25</sub>.

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 3% à pressão 1,3Kgf/cm<sup>2</sup>, denominado tratamento hidrotérmico, foi realizado em uma etapa, a mesma descrita anteriormente, variando o parâmetro da autoclavagem, pressão 1,3 Kgf/cm<sup>2</sup>, respectivamente, obtendo-se o bagaço pré-tratado denominado B<sub>3</sub>P<sub>1,3</sub>.

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 4% foi realizado da mesma forma descrita acima. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 4% e nas condições de pressão 1,2Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>4</sub>P<sub>1,2</sub>. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 4% e nas condições de pressão 1,25Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>4</sub>P<sub>1,25</sub>. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 4% e nas condições de pressão 1,3Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>4</sub>P<sub>1,3</sub>.

O pré-tratamento com hidróxido de sódio 5% foi realizado da mesma forma descrita acima. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 5% e nas condições de pressão 1,2Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>5</sub>P<sub>1,2</sub>. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 5% e nas condições de pressão 1,25Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>5</sub>P<sub>1,25</sub>. O bagaço submetido ao pré-tratamento com NaOH 5% e nas condições de pressão 1,3Kgf/cm<sup>2</sup> foi denominado B<sub>5</sub>P<sub>1,3</sub>.

#### **4.4.4 Preparação da curva de calibração**

Inicialmente foi preparada uma solução de glicose 2g/L, e diluída para as concentrações 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6g/L. Para preparar a solução de 2g/L, pesou-se em um béquer 0,5058g de glicose. Adicionou-se água para dissolver o soluto e em seguida transferiu-se para um balão de 200 mL e completou-se com água destilada. Para preparar as demais soluções foram retiradas alíquotas da solução mais concentrada com auxílio de uma bureta e transferidas para balões

volumétricos de 50 mL e completado com água destilada. Em seguida foi realizada a quantificação de açúcar redutor pelo método de Miller (AGUIAR E MENEZES 2002).

As soluções foram lidas no espectrofotômetro á absorbância em 540nm. Com os dados de absorbância obtidos foi realizada a confecção da curva de calibração.

#### **4.4.5 Preparação de solução tampão citrato**

Para o preparo da solução tampão citrato 0,01M pH 4,8, adicionou 4,4g de ácido cítrico, 8,6g de citrato de sódio em balão volumétrico de 1000mL. A solução foi transferida para um becker de 1000mL e com o auxílio de um pHmetro corrigiu-se o pH da solução com hidróxido de sódio 2M para pH 4,8.

#### **4.4.6 Preparo da solução de DNS (ácido 3,5 dinitro salicílico)**

Para o preparo da solução DNS (ácido dinitro salicílico), adicionou 150 g de tartarato de sódio e potássio, 5g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 100 mL de solução de hidróxido de sódio 2M e 100 mL de água destilada em um becker de 5000 mL, que foi colocado em agitação magnética. Após completa dissociação, a mistura foi transferida para um balão volumétrico onde foi avolumada com água destilada até 500 mL.

### **4.5 HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS**

#### **4.5.1 Hidrólise enzimática utilizando enzima livre**

Foram submetidos a esta etapa 3 tipos de bagaços pré-tratados, em duplicata. Foram adicionados em um erlenmeyer de 125 mL, 0,50g de bagaço pré-tratado, 50 mL de solução enzimática, cuja carga oferecida foi de 45,2 FPU por grama de

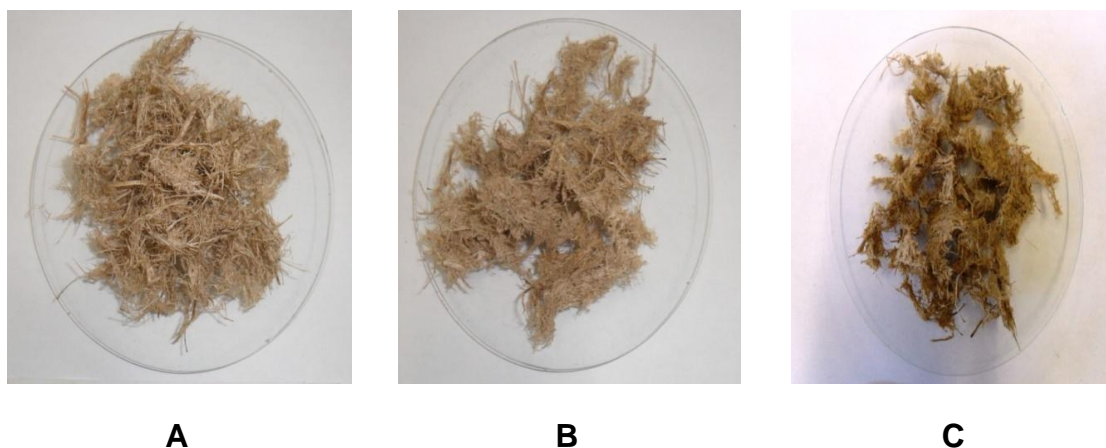


bagaço. O sistema foi vedado com uma rolha de borracha e colocado em banho Maria a 50°C sob agitação magnética, o qual prosseguiu por 24 horas. Foram coletadas amostras durante todo o tempo de hidrólise. Coletas com, 2; 4; 6; 9; 12; 15 e 24 horas de reação. A concentração de açúcar redutor destas amostras foi determinada pelo método de Miller (AGUIAR E MENEZES 2002).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

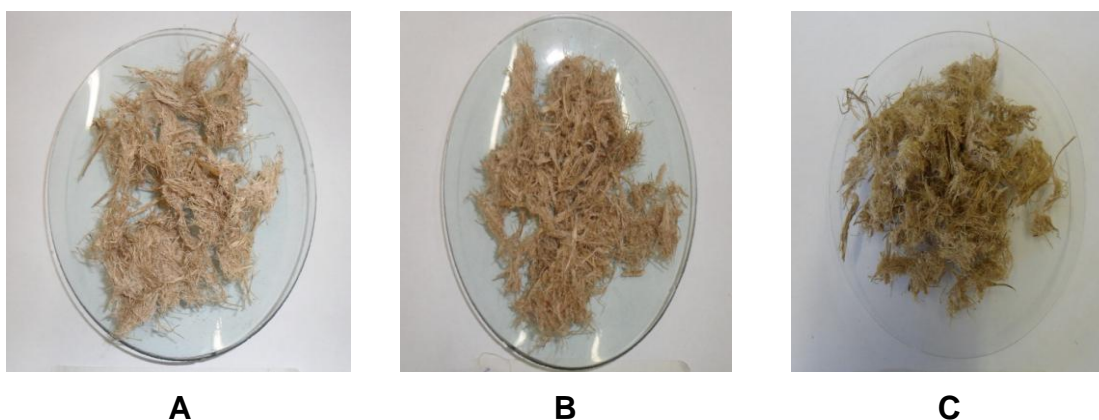
A importância da lavagem com água quente é a de remover as substâncias neste meio, que se encontram aderidas no bagaço de cana, tais como: sacarose, glicídios de baixa massa molecular, como também a remoção de sais inorgânicos, terra, adubos e outros resíduos agrícolas.

O pré-tratamento com hidróxido de sódio a diferentes pressões foi realizado seguindo a metodologia de AGUIAR e MENEZES (2002), com algumas modificações, pois ao invés de promover o pré-tratamento em duas etapas (primeiramente a etapa física para remoção da hemicelulose e depois pré-tratamento químico para deslignificação), foi realizado um pré-tratamento em apenas uma etapa combinando o tratamento hidrotérmico e químico. Segundo Ereno (2010), no pré-tratamento térmico, quando há uma descompressão brusca no meio, o bagaço é desestruturado removendo a hemicelulose que fica solúvel no meio. O tratamento químico com hidróxido de sódio em condições bem suaves promove uma deslignificação do material sem a produção de compostos inibitórios. Esses tratamentos combinados diminuem na recalcitrância do bagaço. A figura 11 mostra o bagaço de cana-de-açúcar após explosão alcalina com hidróxido de sódio 3%, a diferentes pressões.



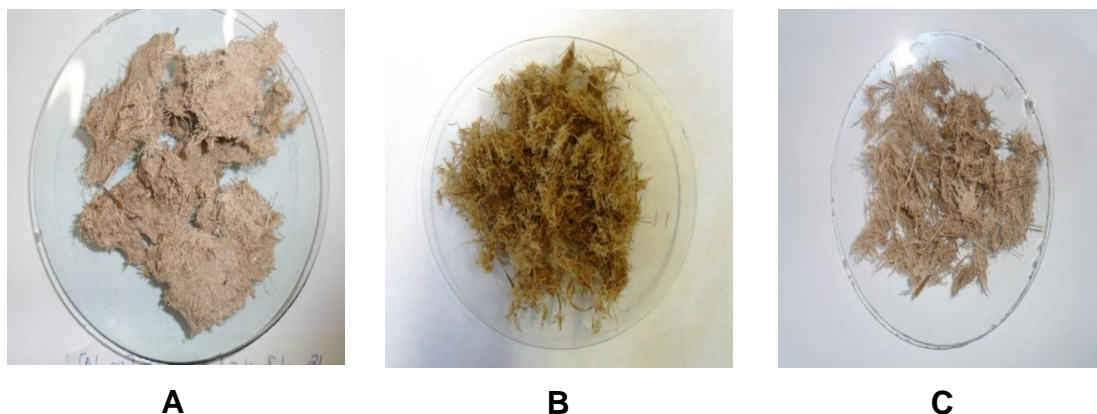
**Figura 11 – Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com deslignificação alcalina (NaOH) a 3% com pressão: A) 1,2 kgf/cm<sup>2</sup>, B) 1,25 kgf/cm<sup>2</sup> e C) 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>.**

A figura 12 mostra o bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 4%, a diferentes pressões.



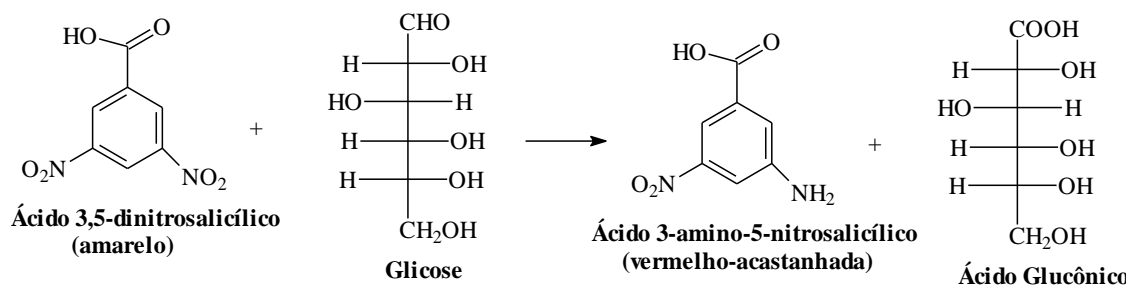
**Figura 12 – Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com deslignificação alcalina (NaOH) a 4% com pressão: A) 1,2 kgf/cm<sup>2</sup>, B) 1,25 kgf/cm<sup>2</sup> e C) 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>.**

A figura 13 mostra o bagaço de cana-de-açúcar após o tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 5%, a diferentes pressões.



**Figura 13 - Bagaço de cana-de-açúcar após tratamento hidrotérmico com deslignificação alcalina (NaOH) a 5% com pressão: A) 1,2 kgf/cm<sup>2</sup>, B) 1,25 kgf/cm<sup>2</sup> e C) 1,3 kgf/cm<sup>2</sup>**

A quantificação do açúcar redutor, obtida após a hidrólise enzimática foi realizada pelo método de DNS (3,5-dinitrosalicílico). Neste método, a dosagem de açúcares com poder redutor é feita com base em uma reação de oxidoredução, em meio alcalino, sendo o grupo aldeído do açúcar oxidado a carboxila e o grupo nitro do DNS reduzido a amina (figura 14) (RABELO, 2007).



**Figura 14 – Reações envolvidas no Método de dosagem de açúcares com DNS (In: SILVA, 2008, p. 26)**

O composto resultante da reação, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, tem cor vermelho-acastanhada e a intensidade da cor da solução obtida é diretamente proporcional à concentração de açúcares redutores da solução de partida. A intensidade da cor da solução é medida pela absorvância em 540 (nm) (SILVA, 2008).

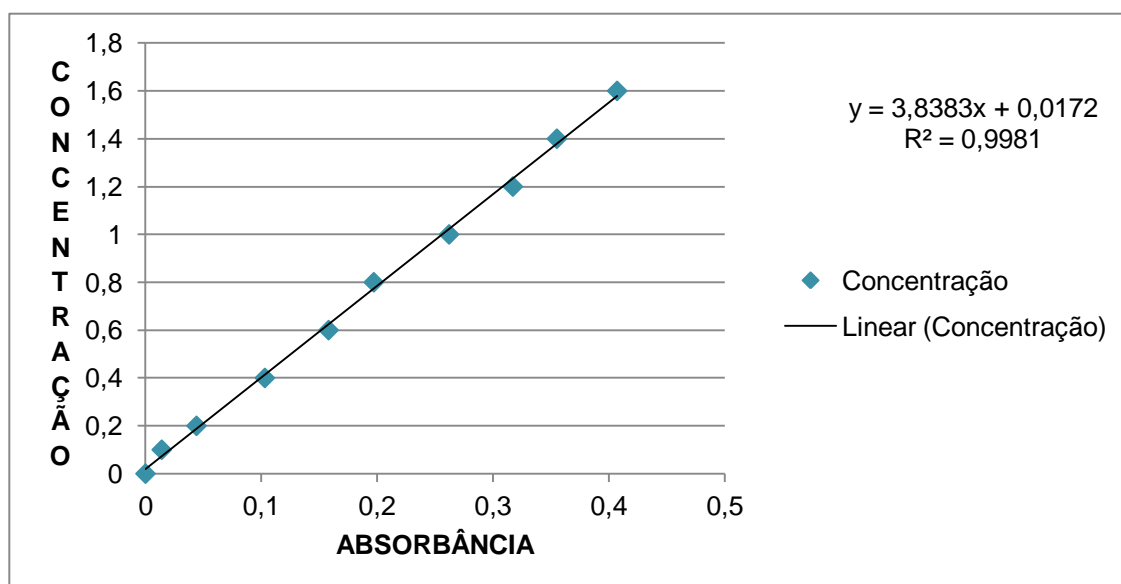
Para determinar a concentração dos açúcares redutores obtidos após hidrólise dos bagaços pré-tratados, foi feita uma curva de calibração com concentrações

conhecidas de glicose. Os valores médios das concentrações e as absorvâncias da curva de calibração estão apresentados na tabela 2 e figura 15.

Absorbância (540 nm)	Concentração (AR* g/L)
0.014	0,10
0.044	0,20
0.103	0,40
0,158	0,60
0.197	0,80
0.262	1,00
0.317	1,20
0.355	1,40
0.407	1,60

\* A.R. – Açúcar Redutor em gramas por litro em solução após hidrólise enzimática

**Tabela 2 – Concentrações e absorvâncias da curva de calibração.**



**Figura 15 – Curva de calibração de açúcar redutor.**

Os valores das concentrações de açúcares redutores encontrados, após hidrólise com enzima livre de cada bagaço que foi efetuado o pré-tratamento, está apresentado na tabela 3.

Pré-tratamento	Abs. 540 nm (média)	Concentração de Açúcar redutor Total (g/L) 24h de reação	Diluição	Concentração final de Açúcar Redutor (g/L)
B <sub>3</sub> P <sub>1,2</sub>	0.180	0.708	1:8	5.66
B <sub>3</sub> P <sub>1,25</sub>	0.1435	0.567	1:8	4.59
B <sub>3</sub> P <sub>1,3</sub>	0.1435	0.567	1:8	4.59

**Tabela 3 – Valores de absorvância, diluição e concentração de açúcares redutores obtidos.**

Ao efetuar a determinação de açúcar redutor pelo método de Miller, as amostras foram diluídas para que as mesmas estivessem dentro da linearidade, obedecendo a Lei de Beer-Lambert.

A conversão enzimática do bagaço em açúcar obedeceu à equação em eq. (5) abaixo.

$$X\% = \left( \frac{(C_{\text{glicose}})}{(\% \text{ celulose} \times C_{\text{BCA}})} \times 90,9 \right) \times 100 \quad \text{eq. (6)}$$

Onde:

Fator de conversão: 90,9.

X% = conversão enzimática do bagaço de cana-de-açúcar em %.

C<sub>glicose</sub> (concentração de glicose) e C<sub>BCA</sub> (concentração de bagaço de cana-de-açúcar) é dada por g/L.

Para os cálculos, foram considerados 88% de celulose após os tratamentos alcalinos e 60% após somente tratamento a vapor de acordo com Adriano (2008).

A tabela 4 mostra as conversões enzimáticas obtidas de bagaço em glicose para hidrólise com enzima livre.

<b>Conversão Enzimática do BCA (%)</b>			
<b>Tratamento hidrotérmico com % NaOH (m/V)</b>	<b>Pressão Aplicada (Kgf/cm<sup>2</sup>)</b>		
	1,20	1,25	1,30
3	58,46%	47,41%	47,41%

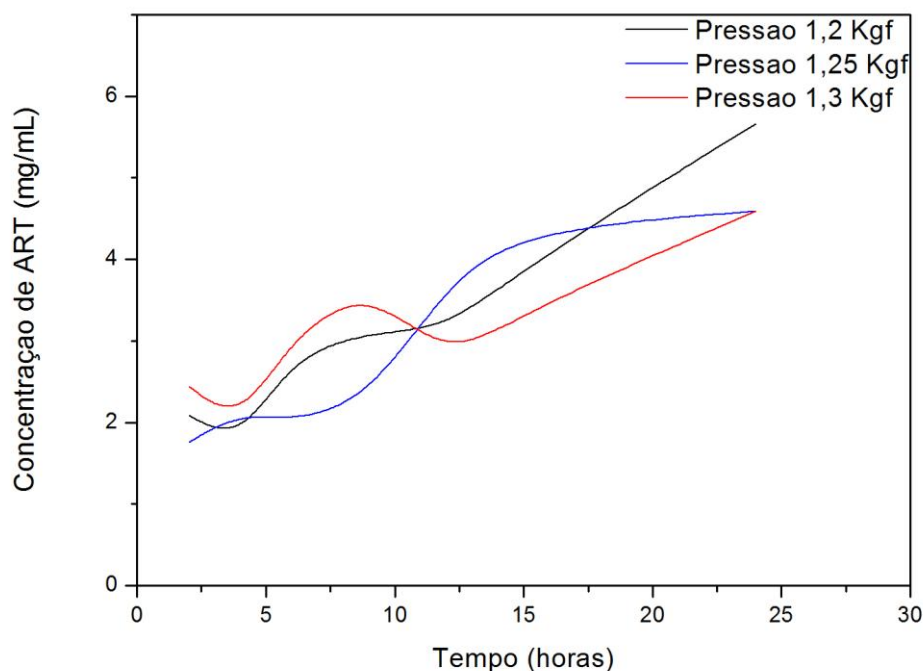
**Tabela 4 – Conversão enzimática de bagaço em glicose**

Foi realizado também um ensaio de hidrólise com enzima livre do bagaço de cana-de-açúcar num período de 24 horas, denominado hidrólise longa. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 5.

<b>Tempo ( h )</b>	<b>Concentração final de Açúcar Redutor (g/L) NaoH 3% -1.2kgf</b>	<b>Concentração final de Açúcar Redutor (g/L) NaoH 3%1.25Kgf</b>	<b>Concentração final de Açúcar Redutor (g/L) NaoH 3% -1.3Kgf</b>
2	2.09	1.76	2.44
4	1.75	2.12	1.98
6	2.82	2.01	3.06
9	3.11	2.28	3.69
12	3.14	3.70	2.73
15	3.90	4.37	3.37
24	5.66	4.59	4.59

**Tabela 5 - Valores de concentração de açúcares redutores obtidos na hidrólise longa**

A figura 16 mostra a curva de hidrólise longa utilizando enzima livre do bagaço NaOH 3% em diferentes valores de pressão.



**Figura 16 – Curva de hidrólise longa utilizando bagaço pré-tratado com NaOH 3% em diferentes valores de pressão.**

Os resultados obtidos na hidrólise enzimática longa utilizando enzima livre, na concentração 3% a diferentes pressões demonstraram um perfil semelhante de hidrólise variando em faixas relativamente próximas. As inflexões observadas no tempo de 4 horas da pressão 1,2 Kgf/cm<sup>2</sup>, no tempo 6h da pressão 1,25 Kgf/cm<sup>2</sup> e nos tempos 4 e 12h da pressão 1,3 Kgf/cm<sup>2</sup> foram decorrentes de erro experimental na diluição da solução do sistema de hidrólise.

Destaca-se que, embora fosse objetivo do presente trabalho realizar a hidrólise de todos os bagaços pré-tratados (tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio a 4 e 5%, nas pressões de 1,2; 1,25 e 1,30 Kgf/cm<sup>2</sup>), esta etapa não foi efetuada por duas razões. Em primeiro lugar, após a realização dos pré-tratamentos, houve uma



dificuldade na obtenção da enzima para a realização da hidrólise. Isto já provocou atraso no cronograma de realização do projeto. Em seguida, após a aquisição da enzima, foi realizada a etapa de hidrólise do bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 3% a diferentes pressões. Fez-se a quantificação do açúcar redutor, que conforme já descrito é efetuado pelo método de DNS (3,5-dinitrosalicílico), onde a intensidade da cor vermelha-acastanhado da solução é medida em espectrofotômetro a 540 (nm). Após as medidas realizadas, foi constatado pelos valores obtidos e pela realização de outras medidas no espectrofotômetro por outros grupos de pesquisa, que o aparelho estava fornecendo valores completamente errôneos. Isto foi constatado quando um grupo de alunos fez a leitura de concentrações conhecidas de substrato e observaram que a absorção de uma solução mais concentrada era inferior a solução mais diluída. Este fato nos levou a repetir todo o procedimento para a realização da hidrólise enzimática, ou seja, a confecção de uma nova curva de calibração, pois iríamos agora realizar as leituras em outro espectrofotômetro, e a realização de toda a etapa de hidrólise do bagaço submetido ao tratamento hidrotérmico com hidróxido de sódio 3%. Estes fatores impossibilitaram, por questão de tempo, a realização da hidrólise com os demais bagaços pré-tratados.

## **6. CONCLUSÃO**

Como não foi possível realizar as hidrólises de todos os bagaços pré-tratados, não foi possível saber qual a concentração mínima de NaOH para o pré-tratamento.

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, Wellington Sabino. **Preparação e caracterização de derivados de enzimas industriais em quitosana**. 2008 161p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008

AGUIAR, C. L. e MENEZES, T. J. B. Conversão Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.26, p.52-55, maio/jun.,2002.

CÂNDIDO, Rafael Garcia; DA SILVA, Vinícius Fernandes Nunes; OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins; GONÇALVES, Adilson Roberto; ROCHA, George Jackson de Moraes. Estudo comparativo de pré-tratamentos do bagaço de cana visando à obtenção de etanol celulósico, In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2009, Natal, Brasil.

CARDOSO, Arnaldo Alves; MACHADO, Cristine de Mello Dias; PEREIRA, Elisabete Alves. Biocombustível, o Mito do Combustível Limpo. **Química Nova na Escola**, n. 28, maio, 2008, p.9-14.

DA COSTA SOUSA, Leonardo; CHUNDAWAT, Shishir PS, BALAN, Venkatesh; DALE, Bruce E. 'Cradle-to-grave' assessment of existing ignocellulose pretreatment technologies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, 2009, p. 339-347.

DA SILVA, Vinícius Fernandes Nunes. **Estudos de pré-tratamentos e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico**. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena– Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

ERENO, Dinorah; CESAR, Eduardo, Rota enzimática. **Revista FAPESP**, n.169, março, 2010, p. 69-71.

FERRARI, Roseli Aparecida ; OLIVEIRA, Vanessa da Silva ; SCABIO, Ardalla.

FERREIRA, Vitor Francisco; ROCHA David Rodrigues da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, abril, 2009, p. 623-638.

FIALHO, Lucimar Lopes; DA SILVA, Wilson Tadeu Lopes; MILORI, Débora M. B.; SIMÕES, Marcelo Luiz; MARTIN-NETO, Ladislau; SAAB, Sérgio da Costa. Interferência da Lignina na Quantificação de Radicais Livres no Processo de Compostagem. **Química Nova**, v. 33, n. 2, 2010, p. 364-369.

GOLDEMBERG, José. Biomassa e energia **Química Nova**, v. 32, n. 3, março, 2009, p. 582-587.

LÔBO, Ivon Pinheiro; FERREIRA, Sérgio Luis Costa; CRUZ, Rosenira Serpa da. Biodiesel: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, julho, 2009, p. 1596-1608.

MARTINS, Rafael Elias. **Estudo de Imobilização de Celulase em Géis de Quitosana**, 2007, 98 p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) UFSCar. São Carlos, 2007.

MORAES, G. da S. de, **Otimização dos Parâmetros Pressão e Concentração de Hidróxido, Empregado no Pré – tratamento do Bagaço de Cana-de-Açúcar, Utilizando Planejamento fatorial**. 2010, 69p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/ Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA

MORAES, Guilherme da Silveira de. **Efeito dos Diferentes Tratamentos Químicos na Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2009. 27p. Relatório de Iniciação Científica – Fundação Educacional do Município de Assis, Química Industrial, Assis, 2009.

MOUTTA, Rondinele de Oliveira. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de obtenção de bioetanol**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena– Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, nº 7, 2010, p. 1549-1558.

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, 2007.

RAMOS, Luiz Pereira. The chemistry Involved in the Steam Treatment of Lignocellulosic Materials. **Química Nova**, v. 26, nº. 6, 2003, p. 863-871.

REYES, Juan; PERALTA-ZAMORA, Patrício; DURÁN, Nelson. Hidrólise Enzimática de Casca de Arroz Utilizando-se Celulases. Efeito de Tratamentos Químicos e Fotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, nº. 2, 1998, p. 140-143.

RUBIRA, Adley F.; SILVA, Rafael; HARAGUCHI, Shirani K.; MUNIZ, Edvani C. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova** v. 32, nº 3, 2009, p.661-671.

SANDGREN, Mats; STAHLBERG, Jerry; MITCHINSON, Colin. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. *Biophysies & Molecular Biology*, v. 89, 2005, p. 245-291.

SANTOS, Celênia Pereira; DOS REIS, Lêda Nunes; MOREIRA, José Eduardo Borges; BRASILEIRO, Lilian Borges. Papel: como se fabrica?. **Química Nova na Escola**, nº. 14, novembro, 2001, p. 3-7.

SHUSHARTD , Ulf ; RIBEIRO , Marcelo L ; GONÇALVES , Adilson , R. A. indústria petroquímica no próximo século : como substituir o petróleo como matéria prima? **Química Nova**, v. 24,nº. 2, 2001, p. 247/251

SILVA, Andressa Arianne Souza e. **Efeito dos Diferentes Métodos de Tratamento do Bagaço de Cana-de-açúcar na Obtenção de Açúcares Fermentáveis por Conversão Enzimática.** 2008. 33p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA.

SUAREZ, Paulo A. Z.; SANTOS, André L. F.; RODRIGUES, Juliana P.; ALVES, Melquizedeque B.. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras, desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, abril, 2009, p. 768-775.

WYMAN, Charles E.; DALE, Bruce E.; ELANDER, Richard T.; HOLTZAPPLE, Mark; LADISCH, Michael R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, 2005, p. 1959-1966.

ZHANG, Percival Y.-H.; HIMMEL, Michael E.; MIELENZ, Jonathan R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, **Biotechnology Advances**, v. 24, 2006, p. 452-481.

ZHANG, Yi-Heng Percival. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2008, p. 367-375.

ZHANG, Yi-Heng Percival; DING, Shi-You; MIELENZ, Jonathan R.; CUI, Jing-Biao; ELANDER, Richard T.; LASER, Mark; HIMMEL, Michael E.; MCMILLAN, James R.; LYND, Lee R. Fractionating Recalcitrant Lignocellulose at Modest Reaction Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n<sup>o</sup> 2, junho, 2007, p. 214-223.