

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Amanda Letícia de Carvalho Cardoso

PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FSDE 16 E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

João Pessoa – Paraíba

2017

Amanda Letícia de Carvalho Cardoso

**PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FSDE 16 E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho Final de Curso apresentado à
Universidade Federal da Paraíba – UFPB,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Engenharia
Química.

Orientadora: Prof.^aDr.^aSharline
Florentino de Melo Santos.

João Pessoa – PB

2017

C268p Cardoso, Amanda Letícia de Carvalho

Produção de celulases pelo FSDE16 e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Amanda Letícia de Carvalho Cardoso. – João Pessoa, 2017.

49 f. il.:

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos

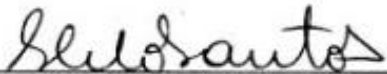
Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Química) Campus I - UFPB / Universidade Federal da Paraíba.

Amanda Letícia de Carvalho Cardoso

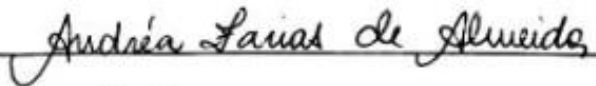
**PRODUÇÃO DE CELULASES PELO FSDE 16 E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA
DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Trabalho Final de Curso apresentado à Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

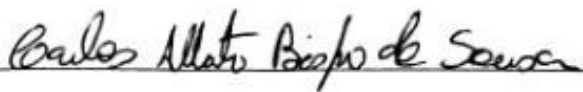
Banca Examinadora:



Prof.^aDr.^aSharline Florentino de Melo Santos (UFPB/CT/DEQ)
(Orientadora)



Prof.^aDr.^aAndréa Farias de Almeida (UFPB/CBIOTEC)
(Examinadora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa (UFPB/CT/DEQ)
(Examinador)

Dedico este trabalho a Deus, pois tudo é para Ele e por Ele, e aos meus pais, por todo amor e dedicação para que esse momento pudesse se realizar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por ter me dado forças, saúde, e tudo que me concedeu para seguir em frente e chegar até aqui, pois sem Ele nada disso teria acontecido.

Aos meus pais, Eufrasia e Adson, por todo o apoio, amor, dedicação e ajuda durante este longo caminho para realizar este sonho.

Aos meus irmãos Pedro e Ester, por toda a compreensão e pela ajuda nos momentos difíceis de estudo.

Ao meu namorado Thiago, por todo o amor, compreensão, carinho, ajuda, e por estar ao meu lado para caminhar ao longo dessa jornada.

A todos os meus familiares, por todo o amor e apoio ao longo dessa caminhada.

Aos meus amigos da universidade por estarem ao meu lado em todos os momentos do curso, em especial a Gessyca Borges, Jefferson Thiago, Felipe Augusto, João de Queiroz, Gustavo Maia e Thaffarel Guedes.

Aos meus amigos, Lala, Cyntia e Igor pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis, e por acreditarem na realização desse sonho.

A minha professora Sharline por sido minha orientadora, por ter me aberto as portas na pesquisa, por toda a dedicação, ensinamentos, ajuda e apoio para realizar este trabalho.

A todos os professores que contribuíram para minha formação, pelos conhecimentos transmitidos, por se dedicarem a ensinar e por estarem dispostos a ajudar.

A toda equipe do Labio, pelos auxílios no laboratório e conhecimentos compartilhados, em especial a técnica Débora por sempre estar disposta a ajudar.

“Pode acreditar que um novo dia vai raiar, sua hora vai chegar”

(Revelação)

RESUMO

Com o aumento da demanda por energia e de problemas de poluição causados por combustíveis fósseis, os materiais lignocelulósicos vêm sendo objeto de estudo como fonte renovável de energia, afim de minimizar os problemas ambientais. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar. As enzimas do sistema celulolítico hidrolisam a celulose presente nestes materiais à açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração. O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica rompe o escudo formado pela lignina, reduz a cristalinidade da celulose e aumenta a porosidade facilitando a hidrólise enzimática. O objetivo deste trabalho foi avaliar a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado quimicamente utilizando enzimas produzidas pelo fungo FSDE16 no cultivo em estado sólido. Foi realizado o cultivo do fungo em meio contendo 60% de farelo de trigo com 40% de bagaço de cana, enriquecido com solução de sulfato de amônio 1% (m/m_{H2O}). O cultivo foi realizado em erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 g de meio sólido. Em seguida, o meio foi esterilizado e foi feita a inoculação com concentração de 10⁶ esporos/g. Posteriormente, o cultivo foi incubado durante 5 dias à temperatura de 33°C. Após, todo o fermentado foi armazenado sob refrigeração para análise. Em seguida, foi realizado o estudo da melhor temperatura de secagem do fermentado, amostras de aproximadamente 5 g foram secas nas temperaturas de 50, 60, 70, 80 e 90°C. Após, foi realizado o pré-tratamento do bagaço de cana com NaOH 3% (m/v) em erlenmeyers de 2000mL, na razão 1:20 sólido/sólido, em autoclave à 121°C por 90 minutos. E então, foi realizada a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, razão 1:20 sólido/líquido, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 50°C, pH 4,8, utilizando o fermentado sólido como carga enzimática, variando a proporção pré-tratado/fermentado em 1:1, 1:2 e 2:1. O melhor resultado de atividade enzimática foi para a temperatura de secagem de 60°C, com um valor de 0,09 FPU/mL. Para a desativação do microrganismo o melhor resultado da temperatura de secagem foi 90°C. Para a hidrólise enzimática, o melhor resultado foi para o caso da proporção pré-tratado/fermentado 1:1 com um valor de pico de concentração de açúcares redutores totais (ART) de 5,0 g/L em 8 horas, mas em relação ao melhor comportamento da curva de ART o melhor resultado foi para o caso da proporção pré-tratado/fermentado 2:1.

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar, hidrólise enzimática, cultivo em estado sólido, enzimas.

ABSTRACT

With increasing energy demand and pollution problems caused by fossil fuels, lignocellulosic materials have been used as a renewable source of energy in order to minimize environmental problems. Brazil is the largest producer of sugarcane. The enzymes of the cellulolytic system hydrolyze the cellulose present in these materials to fermentable sugars for the production of second-generation ethanol. The pretreatment of the lignocellulosic biomass breaks the lignin shield, reduces the crystallinity of the cellulose and increases its porosity facilitating the enzymatic hydrolysis. The aim of this work was to evaluate the enzymatic hydrolysis of pretreated sugarcane bagasse using enzymes produced by the FSDE16 fungus in the solid-state fermentation. The fungus was cultured in medium containing 60% wheat bran and 40% sugarcane bagasse, enriched with 1% ammonium sulfate solution (m/m_{H₂O}). Fermentation was carried out in a 1000 ml erlenmeyer flask containing 100 g of solid medium. The medium was then sterilized and inoculated with a concentration of 10⁶ spores/g. Subsequently, the culture was incubated for 5 days at 33 °C. Afterwards, all fermented was stored under refrigeration for analysis. After that, the study of the best drying temperature of the fermented was carried out, samples of approximately 5 g were dried at temperatures of 50, 60, 70, 80 and 90 °C. Afterwards, the pretreatment of sugarcane bagasse with 3% NaOH (m/v) in 2000mL erlenmeyers at 1:20 solid/solid ratio was performed in autoclave at 121 °C for 90 minutes. And then, the enzymatic hydrolysis of the pretreated bagasse with carried out, considering a 1:20 solid/liquid ratio, under agitation of 150 rpm and a temperature of 50 °C, pH 4.8 and using solid fermented as an enzymatic charge, varying the pretreated/fermented ratio in 1:1, 1:2 and 2:1. The best result of enzymatic activity was at the drying temperature of 60 °C, with a value of 0.09 FPU/mL. For the deactivation of the microorganism, the best result of the drying temperature was 90 °C. For the enzymatic hydrolysis, the best result was for the pre-treated/fermented 1:1 ratio with a peak value of total reducing sugars (ART) of 5.0 g/L in 8 hours, but in relation to the better behavior of the curve of ART, the best result was for the pre-treated/fermented ratio 2:1.

Key words: sugarcane bagasse, enzymatic hydrolysis, solid-state fermentation, enzymes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Geral.....	14
2.2. Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1. Biomassa lignocelulósica.....	15
3.1.1. Celulose.....	16
3.1.2. Hemicelulose	17
3.1.3. Lignina	18
3.2. Cana-de-açúcar	20
3.2.1. Bagaço de cana-de-açúcar	21
3.3. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	22
3.3.1. Pré-tratamento físico	23
3.3.2. Pré-tratamento químico	23
3.4. Hidrólise Enzimática.....	23
3.5. As enzimas celulases	25
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. Produção de celulases	27
4.2. Atividade Enzimática.....	30
4.3. Avaliação da secagem do fermentado e manutenção da atividade enzimática....	31
4.4. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar	32
4.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar.....	32
4.4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	32
4.4.4. Análise de Açúcares Redutores Totais (ART).....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1. Produção das enzimas	34

5.2. Secagem do fermentado	35
5.3. Pré-tratamento do bagaço-de-açúcar	37
5.4. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	38
6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Diante do aumento da demanda por energia e da necessidade de geração de nova matriz energética sustentável no mundo atual, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm sido pesquisadas em todo o mundo.

Por esse motivo, os materiais resultantes das atividades agrícolas de origem lignocelulósica, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha, madeira, restos de culturas de grãos e frutíferas, têm sido objeto de pesquisa para aproveitamento nos processos de obtenção de energia renovável (ALMEIDA, 2012). O bagaço de cana-de-açúcar ocupa posição de destaque destes materiais provenientes das atividades agrícolas brasileiras.

Em geral, os materiais lignocelulósicos apresentam uma estrutura complexa e compacta sendo necessário submeter esta biomassa a pré-tratamentos físicos e químicos antes da sua hidrólise para produção do etanol. Esta etapa é responsável pela remoção da lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade do material, de maneira a tornar a celulose susceptível à hidrólise (RABELO, 2010). Esta etapa é muito importante pois deixa a celulose mais disponível para o ataque das enzimas celulolíticas.

O etanol de primeira geração, que é obtido a partir da sacarose da cana, vem sendo cada vez mais produzido porque ainda é o único combustível capaz de atender à crescente demanda mundial por energia renovável de baixo custo e de baixo poder poluente. Porém, estudos vem sendo desenvolvidos nos processos que utilizam materiais lignocelulósicos, a partir da celulose e da hemicelulose, para produção do etanol de segunda geração (AZEVEDO, 2014).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por duas frações polissacarídicas (celulose e hemicelulose) e lignina. As frações polissacarídicas constituem de 50 a 70%, sendo majoritária a celulose com cerca de 40 a 60% do material (VÁSQUEZ, 2007).

A dificuldade de converter a biomassa lignocelulósica em insumos químicos é atribuída às suas características químicas e morfológicas. A conversão do componente celulósico dessas biomassas residuais a glicose, requer o uso de enzimas celulolíticas (NASCIMENTO, 2015). A celulose representa um dos maiores complexos naturais de

carbono orgânico presente na estrutura da parede celular de plantas. Dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (ROSA, 2014).

As rotas de hidrólise mais estudadas são: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. Embora a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e relativamente barata, gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Por isso, a sacarificação enzimática tem sido objeto da maior parte dos estudos (AGUIAR, 2010).

As enzimas celulasas são eficientes na degradação de celulose, sendo as mais comuns no processo. Diversos tipos de microrganismos são potencialmente produtores de celulase, desde que estejam em condições adequadas (RABONATO, 2013).

Uma das formas de se obter celulasas a baixo custo é através da fermentação em estado sólido. A fermentação em estado sólido trata-se do crescimento de microrganismos em substratos sólidos na ausência de água livre, sendo de maior vantagem que a fermentação submersa devido à capacidade de simular o habitat natural de fungos (RODRÍGUES-ZÚÑIGA *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado quimicamente utilizando enzimas produzidas pelo fungo FSDE16 por cultivo em estado sólido.

2.2. Específicos

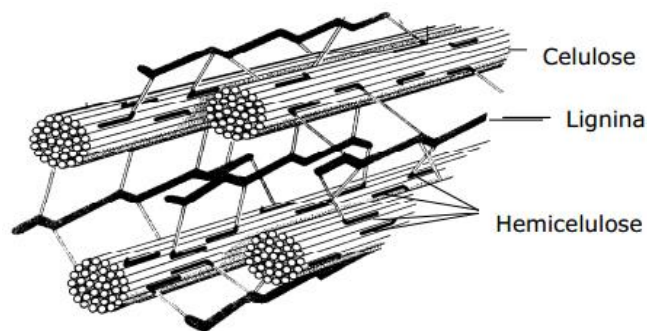
- Repique do fungo FSDE16;
- Produção de enzimas a partir do cultivo do fungo FSDE 16 em meio contendo farelo e bagaço de cana;
- Avaliar a secagem do resíduo fermentado quanto a manutenção da atividade enzimática;
- Realizar pré-tratamento com NaOH do bagaço de cana-de-açúcar utilizado na hidrólise enzimática;
- Avaliar o processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado utilizando o resíduo fermentado seco como carga enzimática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de hemicelulose e celulose, entremeadas por uma macromolécula composta por álcoois aromáticos, lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (VÁSQUEZ, 2007), como mostra a Figura 3.1.

Figura 3.1. Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico



Fonte: VÁSQUEZ, 2007

Dentre as biomassas agroindustriais, destacam-se as de composição lignocelulósica oriundas de vários processos agrícolas e incluem palhas, cascas, cavacos, madeiras duras, madeiras moles, resíduos das indústrias de papel, bagaços diversos, entre outros. São fontes renováveis e disponíveis em grandes quantidades (RABONATO, 2013).

A biomassa lignocelulósica é composta, em média, de 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina, além de pequenas quantidades de outros componentes, tais como extrativos, cerca de 5-20% (AGUIAR, 2010). As características químicas e biológicas destes resíduos são variáveis em função do tipo e idade do vegetal, manejo do cultivo, características do solo e clima e processo industrial (RABONATO, 2013).

Tabela 3.1 – Composição química de alguns resíduos lignocelulósicos

Resíduos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Lignocelulósicos			
Bagaço de cana	32 - 47	27 - 32,7	19 - 26,3
Casca de soja	40 - 53	14 - 33	1 - 8
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Palha de milho	25 - 41,2	34,5	14,1
Palha de arroz	32,1 - 43,5	22 - 24	17,2 - 18
Jornal	40 - 64,4	21,7 - 40	18 - 30
Papel	85 - 99	0	0 - 15
Resíduos Urbanos	40	26	20

Fontes: AGUIAR, 2010; ALMEIDA, 2012; SOUSA, 2014

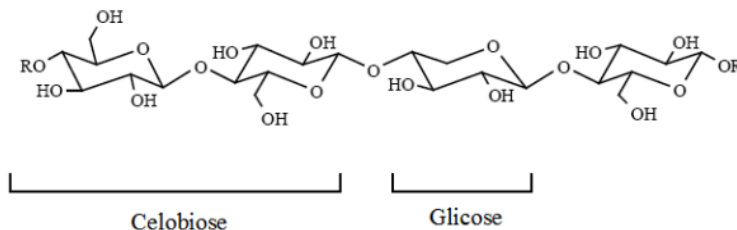
Observando a Tabela 3.1, percebe-se que o bagaço de cana é uma das biomassas residuais que mais dispõe de celulose e hemicelulose. Isso também justifica o fato de utilizá-lo para a produção de etanol de segunda geração.

3.1.1. Celulose

A celulose é o biopolímero de carboidrato existente mais abundante na natureza. É o principal componente da parede celular vegetal e serve como material estrutural, através do qual as plantas terrestres obtêm resistência para ficar na posição vertical (VALADARES, 2013).

A estrutura específica da celulose é formada pela união de moléculas de β -glicose, através de ligações β -1-4-glicosídicas. Nessa estrutura duas unidades de glicose são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre os grupos hidroxílicos, dando origem à molécula da celobiose (RIBEIRO, 2013), como pode ser visto na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular



Fonte: RABELO, 2010.

De uma forma mais detalhada, as cadeias de celulose são mantidas por inúmeras ligações de hidrogênio intra e intermoleculares as quais são responsáveis pela formação de microfibrilas rígidas, insolúveis e cristalinas (PEREIRA, 2013).

As regiões cristalinas são formadas pela configuração paralela das cadeias lineares, contribuindo para a insolubilidade da celulose e sua baixa reatividade, ao mesmo tempo tornando-se mais resistente à hidrólise ácida e enzimática (PINTO, 2010).

A principal vantagem da celulose para uso energético, quando comparada com derivados de petróleo, por exemplo, é sua grande disponibilidade, uma vez que ela provém de matéria-prima renovável (GUILHERME, 2014).

3.1.2. Hemicelulose

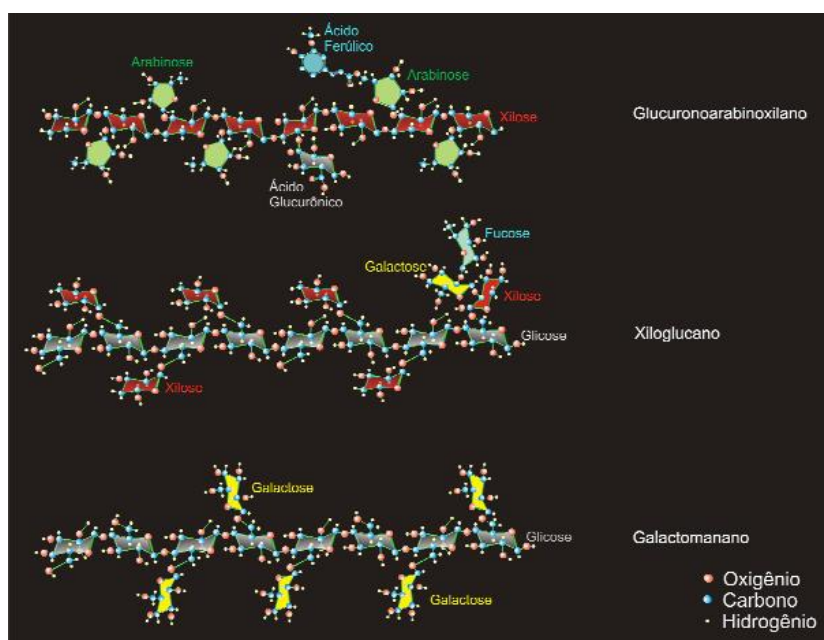
A hemicelulose ocorre em associação íntima com a celulose e a lignina e contribui para a rigidez da parede celular vegetal das plantas dos tecidos lignificados. Tem uma composição heterogênea de várias unidades de açúcares, dependendo do tipo de planta (LORENCINI, 2013).

Quimicamente, as hemiceluloses são heteropolissacarídeos, formados por vários resíduos de açúcares como D-xilose, D-manose, D-arabinose, D-galactose, dentre outros, e por ácidos urônicos. Estes açúcares são ligados entre si, por ligações glicosídicas β -1-4, formando uma estrutura principal composta por um tipo de resíduo, a partir do qual

surtem ramificações laterais de cadeias curtas de outros açúcares (PALMA, 2003). A Figura 3.3 mostra a estrutura química de algumas hemiceluloses.

Podem receber diferentes denominações, como por exemplo, xilanas, mananas, arabinanas, entre outras, conforme a composição e predominância dos monossacarídeos (AGUIAR, 2010). A xilana é o principal componente da hemicelulose e o segundo mais abundante polissacarídeo natural existente (SANTOS, 2012).

Figura 3.3 – Estruturas químicas de algumas hemiceluloses



Fonte: AGUIAR, 2010

As hemiceluloses encontram-se intercaladas às microfibrilas de celulose proporcionando elasticidade e impedindo que as microfibrilas se toquem. (RIBEIRO, 2013). Diferente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molecular e não contém regiões cristalinas, sendo mais solúveis que a celulose e, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas (ANDRADE, 2014).

3.1.3. Lignina

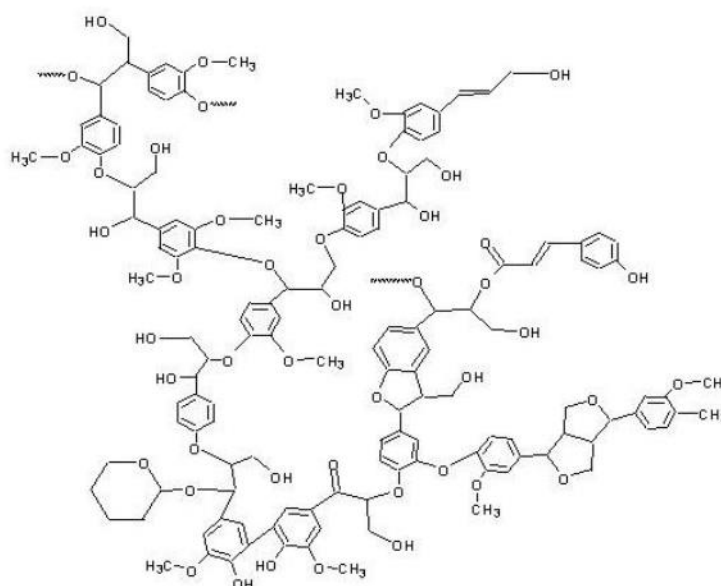
Depois da celulose, a lignina é a substância orgânica polimérica mais abundante nas plantas. É a substância que confere rigidez à parede das plantas, estando associadas

com as hemiceluloses através de interação física e ligações covalentes. A distribuição da lignina nas células e nas plantas não é uniforme, assim como sua contribuição em cada espécie não é a mesma (RUEDA, 2010).

A lignina é o mais complexo dos constituintes do material lignocelulósico, formado por componentes fenólicos e alifáticos. É formada pela polimerização desidrogenativa de alcoóis cumarílico, coniferílico e sinapílico (SIQUEIRA, 2011).

Devido ao fato da lignina apresentar muitas variações com relação à espécie e parte das plantas, época do ano, solo e clima, e também a grande dificuldade de se isolar essa macromolécula sem que seja alterada a estrutura original, não é possível formular sua estrutura química (VIEIRA et al., 2014). Sendo, geralmente, um polímero natural formado basicamente por unidades de fenilpropano que estão ligados entre si. A Figura 3.4 apresenta a estrutura geral da lignina.

Figura 3.4 – Estrutura geral da lignina



Fonte: RUEDA, 2010.

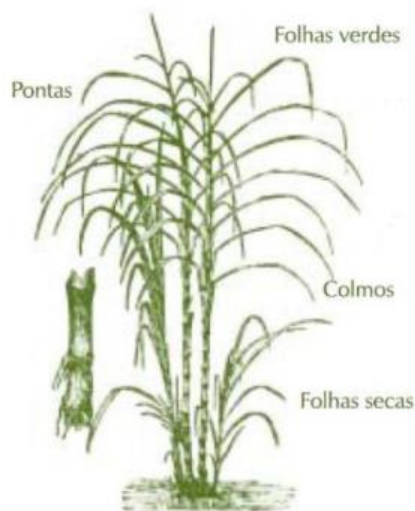
A estrutura bioquímica da fração lignina não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo utilizada, portanto, para a produção de etanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose (ANDRADE, 2014).

Na produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica é necessário eliminar a lignina para que as celulases e as hemiceluloses sejam hidrolisadas. No entanto, a lignina pode servir como ponto de partida para a obtenção de matérias primas para plásticos e outros compostos orgânicos (GONÇALVES, 2009).

3.2. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma das seis espécies do gênero *Saccharum*. É originária da Índia e foi introduzida no Brasil na época colonial, sendo hoje muito cultivada em regiões tropicais e subtropicais do país. A maior parte da cana cultivada é um híbrido da planta original com outras espécies da mesma família (NASCIMENTO, 2011).

Figura 3.5 – Estrutura típica da cana-de-açúcar



Fonte: LOPES, 2015

Podendo atingir de 2 a 5 metros de altura, é composta, principalmente, por água e açúcares que se concentram nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante. As fibras também são abundantes e estão distribuídas por toda a planta, mas com maior presença nas partes duras (LOPES, 2015).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, tendo grande importância para o agronegócio brasileiro. Estima-se para a safra 2017/2018 uma produção de 647,6 milhões

de toneladas de cana-de-açúcar, ante aos 657,1 milhões da safra 2016/2017. Atualmente, a cana-de-açúcar é considerada uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis devido ao grande potencial na produção de etanol e aos respectivos subprodutos (CONAB, 2017).

Dentre os subprodutos da produção de açúcar e álcool destacam-se o bagaço, a vinhaça, a torta de filtro e a levedura. Estes subprodutos vêm sendo reutilizados visando reduzir custos de produção ou até mesmo comercializados com outros setores industriais (PIETROBON, 2008).

3.2.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo gerado em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil. De cada tonelada de cana moída, obtém-se em média 300 Kg de bagaço (AGUIAR E LUCENA, 2011; MORAIS E BROETTO, 2012).

Após extração da sacarose, aproximadamente 75% do bagaço é utilizado na geração de calor e energia para a usina e cerca de 25% é estocado ou disposto em aterros (AGUIAR E LUCENA, 2011). Devido ao excedente deste resíduo que não é utilizado ainda são causados problemas de estocagem e poluição ambiental, se tornando necessário o estudo de alternativas para aproveitamento deste material.

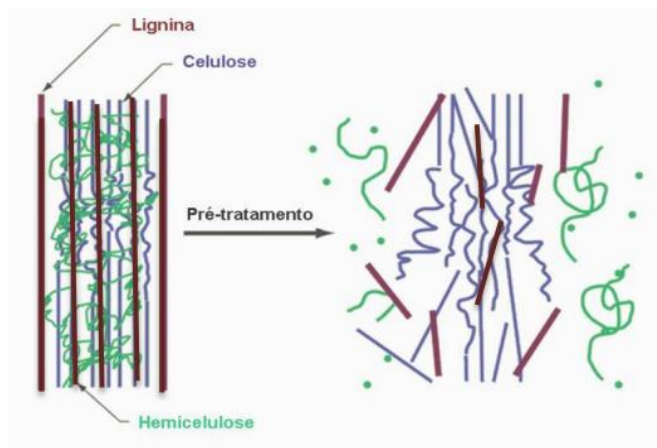
O bagaço de cana como uma fibra vegetal, é constituído por celulose, hemicelulose, lignina e pequena quantidade de extrativos e cinzas (ASSUMPCÃO et al., 2016).

Através de processos biotecnológicos, o bagaço de cana também pode ser utilizado para a produção de etanol e enriquecimento proteico (utilizada na formulação de rações de gado). Este material apresenta a vantagem de já estar processado na saída da moenda, além de custo mínimo com relação ao transporte. Para a produção de etanol, as etapas envolvidas são hidrólise e fermentação (MORAIS E BROETTO, 2012; PIETROBON, 2008).

3.3. Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Para a conversão biológica da biomassa lignocelulósica em açúcares para a produção de etanol e outros produtos, é necessário desenvolver um pré-tratamento eficiente na redução da estrutura rígida e tornar a celulose mais acessível ao ataque das enzimas, que convertem os polímeros de carboidratos em açúcares fermentescíveis. O objetivo de qualquer pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos é o de romper o escudo formado pela lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material facilitando a hidrólise (AFONSO, 2012; SOUSA 2014). Como pode ser visto na Figura 3.6, a qual mostra o efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos.

Figura 3.6 – Efeito do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos



Fonte: MAZIERO, 2013.

Algumas etapas podem ser realizadas para que haja uma degradação e/ou fracionamento do material, facilitando, deste modo, o acesso das enzimas celulolíticas ao material (PHILIPPINI, 2012). Um pré-tratamento eficiente deve reunir os seguintes requisitos: (a) evitar a degradação de carboidratos, (b) evitar a formação de co-produtos inibitórios das etapas subsequentes de hidrólise e fermentação e (c) ter custo efetivo (MORETTI, 2010). Pré-tratamentos para a biomassa lignocelulósica incluem métodos químicos, mecânicos, biológicos e suas várias combinações. Cada procedimento difere em relação ao mecanismo de ação (VALADARES, 2013).

Estudos têm mostrado que o pré-tratamento é a etapa de mais importante e determinante para viabilizar a tecnologia de obtenção de bioetanol a partir de

lignocelulósicos, isto porque esta etapa define o rendimento e o custo o qual os carboidratos de celulose e hemicelulos podem ser convertidos (MAZIERO, 2013).

3.3.1. Pré-tratamento físico

Os métodos físicos ou mecânicos permitem aumentar o tamanho dos poros e a área superficial disponível, diminuindo assim a cristalinidade da celulose e o seu grau de polimerização. Existem vários tipos de processos físicos, como por exemplo: o ultrassom, a irradiação, moinho de bolas, martelos de trituração e cilindros de moagem (GOMES, 2015). Este processo não produz inibidores microbianos e usualmente conduz ao aumento do rendimento do bioetanol (PEREIRA, 2014). O pré-tratamento mecânico por moagem também é bastante utilizado em combinação com o pré-tratamento químico (LORENCINI, 2013).

3.3.2. Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico consiste na utilização de uma substância química seja ela ácida ou básica visando solubilizar a hemicelulose e lignina. Dentre eles: ácidos diluídos e concentrados, hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, ozonólise e organosolv (GOMES, 2015).

Com destaque para as bases que promovem a remoção e a desestruturação da lignina, de forma a aumentar a exposição da celulose a futuros ataques enzimáticos ou químicos (FACUNDES, 2014). O hidróxido de sódio apresenta um resultado mais eficiente em biomassas com teor baixo de lignina de 10 a 18% (MORO, 2015).

O tratamento básico tem a vantagem de requerer condições de temperatura e pressão amenas e a degradação de açúcares é menos intensa quando comparada com o tratamento ácido. Entretanto, demandam um longo tempo de residência de horas e até dias (MORO, 2015).

3.4. Hidrólise Enzimática

Uma das principais aplicações das enzimas do complexo celulolítico está na hidrólise da biomassa lignocelulósica para a obtenção de glicose. A hidrólise é a etapa

mais importante nesse processo de conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis (FACUNDES, 2014).

A hidrólise pode ser ácida ou enzimática, quando é realizada pela ação das enzimas celulases. Trata-se de um complexo enzimático composto por pelo menos três grandes grupos de celulases: as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidades (GOMES, 2015). Os processos enzimáticos apresentam vantagem pois requerem condições brandas, temperaturas próximas a 50°C, pH na faixa 4,5 - 6,0 e operação à pressão atmosférica, permitindo menor destruição de açúcares e menor acúmulo de inibidores de fermentação (RIBEIRO, 2013). Porém, a hidrólise enzimática também tem sua limitação quando comparada com a ácida. O uso de enzimas requer um tempo maior para que ocorra a hidrólise (PINTO, 2010).

A hidrólise enzimática é uma reação heterogênea e requer o contato físico direto entre enzima e substrato. As enzimas difundem-se em solução aquosa na superfície das partículas, através das barreiras físicas, como a lignina, adsorvendo-se na superfície do substrato e, em seguida, catalisam a hidrólise (RIBEIRO, 2013).

Os fatores que afetam a hidrólise da celulose incluem a porosidade (área de superfície acessível) do material lignocelulósico, cristalinidade da fibra de celulose, e o conteúdo de hemicelulose (ANDRADE, 2014).

Atualmente, grande parte da hidrólise enzimática é realizada com enzimas comerciais, porém são enzimas de alto custo. Com a disponibilidade de enzimas de baixo custo e de substratos mais baratos como os lignocelulósicos, alguns microrganismos são capazes de crescerem neste tipo de substrato e produzir enzimas (RODRIGUES, 2016).

As enzimas celulases hidrolisam a celulose à açúcares redutores, que podem ser fermentados por microrganismos a bioetanol. Porém as celulases são proteínas, e estas não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina, o que torna difícil o acesso dessas enzimas às fibras de celulose, por isso, é de extrema importância um pré-tratamento antes da hidrólise (SILVA, 2015).

3.5. As enzimas celulases

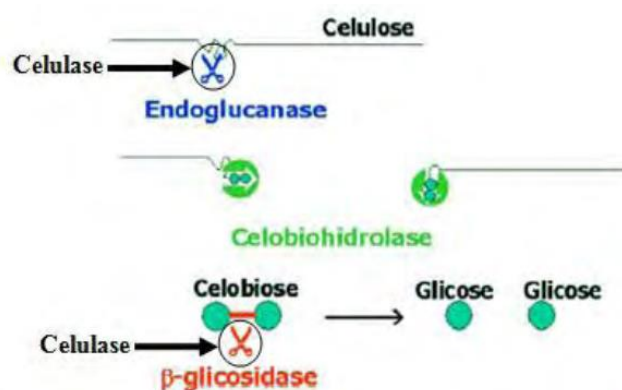
As enzimas do sistema celulolítico foram classificadas com base no modo de catálise sobre a fibra de celulose e em fungos há três classes principais de enzimas hidrolíticas: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidades (CINTRA, 2016).

As endoglucanases degradam regiões menos cristalinizadas na fibra da celulose (ligações internas do polímero), produzindo oligossacarídeos e celobiose. Estas enzimas hidrolisam de forma mais ou menos aleatória as ligações β -(1-4)-glicosídicas nas regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas (SILVA, 2015).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobiohidrolase e glucanohidrolase. As glucanohidrolase são capazes de liberar glicose diretamente da fibra celulósica. Já as celobiohidrolases agem de maneira progressiva em extremidades reductoras e não-reductoras da celulose, e possuem maior afinidade por celulose insolúvel e cristalina ou microcristalina, liberando majoritariamente a celobiose, além de glicose e celobiose como produtos. Estas enzimas normalmente sofrem inibição pelo produto formado, a celobiose (ODISI, 2013).

As β -glicosidades, também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose. Estritamente falando, as β -glicosidades não são celulases legítimas, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo (SANTOS, 2008). A Figura.....

Figura 3.7 – Esquema da ação da celulase sobre a molécula da celulose



Fonte: RABONATO, 2013.

A reação sinérgica ocorre como um resultado da ação sequencial, cooperativa entre os componentes do complexo celulolítico, em que o produto de uma reação enzimática torna-se o substrato para o outro (LUCARINI *et al*, 2017).

A susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática é em grande parte determinada pela acessibilidade das enzimas celulase. Qualquer característica estrutural que limite a acessibilidade das enzimas diminui o rendimento hidrolítico (OGEDA, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1. Produção de celulases

O fungo utilizado nesse estudo foi o FSDE16. Este fungo foi isolado do solo de descanso da Usina Japungu Agroindustrial S.A, localizada no município de Santa Rita, estado da Paraíba, pela pesquisadora Laís Campos Teixeira de Carvalho. O mesmo foi previamente selecionado como produtor de celulases pela medida do halo de degradação em meio contendo carboximetilcelulose (CMC) como fonte de carbono.

Para o inóculo, foi feito o repique dos fungos em placas de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar). Este procedimento foi realizado em uma câmara de segurança biológica do Laboratório de Bioengenharia, no Centro de Tecnologia. Antes do repique, foram esterilizados o meio BDA e placas de Petri em autoclave à 120°C por 15 min. Após, a câmara foi devidamente esterilizada com álcool 70% e luz UV durante 20 minutos. Para o procedimento utilizou-se alça de platina e papel filme. Após o repique, as placas foram incubadas durante 7 dias à 33°C.

Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos em água destilada esterilizada. A suspensão de esporos foi armazenada em tubos previamente esterilizados. Para obtenção do volume de suspensão com a concentração de 10^6 esporos/g, primeiramente foi feita a contagem de esporos em câmara de Neubauer no microscópio eletrônico, obtida pela Equação (1). Posteriormente o volume de inóculo foi obtido pela Equação (2).

$$C = \sum x * 5 * 10^4 * f \quad (1)$$

Onde:

C = Concentração de esporos (esporos/mL);

$\sum x$ = Quantidade de esporos contados na câmara de Neubauer, nas 5 regiões;

f = fator de diluição.

$$V = \frac{Cd * M}{c} \quad (2)$$

Onde:

C_d = Concentração desejada (esporos/g);

V = volume do inóculo (mL);

C = Concentração de esporos (esporos/mL);

M = Massa do substrato (100 g).

O fungo foi cultivado em meio contendo 60% de farelo de trigo com 40% de bagaço de cana como substratos. Antes de iniciar o cultivo, foi necessário fazer o ajuste da umidade do meio para a desejada. Para analisar a umidade dos resíduos, primeiramente determina-se o peso seco das placas de alumínio. As placas foram colocadas em estufa com circulação de ar à 105°C, e após 24 h as mesmas foram retiradas e colocadas em dessecador durante 20 minutos. Após isso, foram pesadas em balança analítica.

Em seguida, as amostras foram pesadas nas placas de alumínio. Posteriormente, as mesmas contendo as amostras de resíduo foram colocadas em estufa à 105°C durante 24 horas. Após isso, foram retiradas, colocadas em dessecador durante 20 minutos e pesou-se as placas contendo as amostras de resíduo seco para determinação do peso final da amostra, obtido conforme Equação (3):

$$P_f = P_t - P_p \quad (3)$$

Onde:

P_f = Peso final da amostra;

P_t = Peso seco total;

P_p = Peso seco das placas.

Após obtenção do peso final, determina-se então a umidade da amostra, através da Equação (4):

$$U = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad (4)$$

Onde:

U = umidade (%);

Pi = Peso inicial da amostra;

Pf = Peso final da amostra.

Em seguida, para obtenção da umidade desejada é necessário preparar a solução de enriquecimento, solução de sulfato de amônio 1% (m/m_{H2O}). Para isto, foi preciso calcular a quantidade de água para adicionar ao meio e deixá-lo na umidade desejada, obtida através da Equação (5). A solução foi então preparada de acordo com o volume de água obtido.

$$m_a = m_r * \frac{u_d - u_r}{1 - u_d} \quad (5)$$

Onde:

m_a = massa de água;

m_r = massa do resíduo;

u_d = umidade desejada;

u_r = umidade do resíduo.

A solução foi preparada adicionando-se 1% de sulfato de amônio à massa de água necessária para umedecer o meio, seguindo a metodologia proposta por CARDOSO (2016). Após o preparo da solução, resíduos foram umedecidos com o volume de solução obtido para o ajuste de umidade de 70%. Foram pesados 60 gramas do farelo de trigo umedecido e 40 gramas de bagaço de cana umedecido, em seguida foram colocados em erlenmeyer de 1000 mL, o procedimento foi repetido preenchendo-se mais três erlenmeyers. Os erlenmeyers foram fechados com algodão, gaze e papel alumínio e colocados em autoclave durante 15 minutos à 121°C para esterilização do meio. Em seguida, foi feita a inoculação utilizando-se uma pipeta automática com o volume de inóculo calculado anteriormente na Equação (2), com a concentração de 10⁶ esporos/g, o meio foi bem homogeneizado para que houvesse crescimento do fungo em todo o meio sólido e os erlenmeyers foram incubados durante 5 dias sob a temperatura de 33°C. Após o período de incubação, todo o substrato fermentado foi armazenado sob refrigeração para posteriores análises de atividade enzimática e desenvolvimento da hidrólise do bagaço de cana com as enzimas obtidas neste cultivo.

4.2. Atividade Enzimática

Para a análise da atividade enzimática de celulase total (FPase), foi obtido o extrato enzimático utilizando-se como solvente água destilada na proporção de 20 mL/g de fermentado. Adicionou-se a água em aproximadamente 1 grama de amostra, a mistura foi homogeneizada e aguardou-se 30 minutos. Após, foi feita a filtração da mistura com papel de filtro, e posteriormente iniciou-se a análise de atividade.

Foi seguida a metodologia proposta por GHOSE (1987) com adaptações. Preparou-se tiras de papel de filtro, cortadas nas medidas de 1cm x 6 cm. Em tubos de ensaio, foram colocadas as tiras de papel enroladas em forma espiral, em seguida adicionou-se 1,0 mL de solução tampão citrato de sódio 50mM, pH 4,8. Posteriormente, foram adicionados aos tubos 0,5 mL do sobrenadante do extrato enzimático, agitou-se levemente em vortex, e os mesmos foram incubados em banho-maria à 50°C durante 60 minutos para ocorrer a reação. Após esse tempo, a estante com os tubos foi colocada em banho de gelo.

Preparou-se o branco das amostras. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1,0 mL de tampão citrato de sódio e em seguida adicionou-se 0,5 mL do sobrenadante do extrato enzimático, a mistura foi homogeneizada em vortex. Preparou-se também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,5 mL de tampão citrato de sódio e 0,5 mL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) em um tubo de ensaio.

Em seguida, transferiu-se 0,5 mL da mistura reacional para tubos contendo 0,5 mL de DNS, a mistura foi homogeneizada em vortex. O mesmo procedimento foi feito para o branco das amostras. Em seguida incubou-se em banho-maria à 100°C durante 5 minutos, e logo depois a estante com os tubos foi colocada em banho de gelo. Após isso, adicionou-se 6,5 mL de água destilada em todos os tubos para diluição, e foi realizada a leitura no espectrofotômetro em absorbância 540 nm. Todo este procedimento foi realizado em duplicata. Para determinação da concentração de açúcares redutores foi construída uma curva padrão. O valor da atividade enzimática pode ser calculado através da Equação (6):

$$FPase = \frac{(A-B) \times f \times d \times 1,5 \times R}{(0,18 \times 60 \times 0,5)} \quad (6)$$

Onde:

FPase = quantidade de celulase total (U/g);

A = absorvância da amostra;

B = absorvância do branco da amostra;

f = fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = diluição da amostra;

1,5 = volume total do meio de reação (mL);

0,18 = fator de conversão de miligramas para μmol de glicose;

60 = tempo de reação (min);

0,5 = volume da enzima no meio de reação (mL);

R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.3. Avaliação da secagem do fermentado e manutenção da atividade enzimática

Foram avaliadas temperaturas de secagem do fermentado nas quais as enzimas pudessem permanecer ativas, porém o microrganismo fosse inativado. As temperaturas estudadas foram: 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C.

Em placas de Petri foi pesado uma amostra com aproximadamente 5 g do fermentado. Em seguida o mesmo foi colocado em estufa sob a temperatura a ser analisada. Após 20 h, foi retirado da estufa uma amostra de aproximadamente 0,5 g para avaliar se o microrganismo permanecia ativo, e em seguida todo o resto foi armazenado sob refrigeração para posterior análise da atividade enzimática seguindo a metodologia descrita no item 4.2.

Para avaliar se o microrganismo estava desativado foi feito o plaqueamento em placas de Petri contendo meio BDA, utilizando-se a diluição com água destilada da amostra do fermentado seco na razão de 1:10 sólido/líquido, então utilizou-se 1 mL dessa diluição para realizar o plaqueamento. Em seguida, as placas foram incubadas à 30°C durante 5 dias para verificar se havia crescimento.

Este procedimento foi repetido para cada temperatura mostrada anteriormente. Após verificar a melhor temperatura, todo o fermentado restante foi disposto em bandeja e colocado em estufa para secagem e armazenado sob refrigeração para posteriormente ser utilizado em hidrólise.

4.4. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

4.4.1. Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi adquirido em um engenho localizado no município de Santa Rita – PB. Em seguida, o mesmo foi disposto em bandejas e colocadas em estufa com circulação de ar sob à temperatura de 60°C para secagem. Após um período de 48 horas, foram retiradas as bandejas da estufa e o bagaço foi triturado em liquidificador doméstico. Em seguida, foi armazenado em recipiente fechado à temperatura ambiente.

4.4.2. Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço-de-cana foi realizado com solução de NaOH em erlenmeyers de 2000 mL em autoclave. As condições de experimento utilizadas foram: solução de NaOH 3% (m/v), temperatura de 120° C, tempo de 90 min e razão sólido/líquido 1:20.

Inicialmente foram pesados 60 g de bagaço de cana, em seguida o mesmo foi colocado em erlenmeyer contendo 1200mL de solução de NaOH, logo após os erlenmeyers foram tampados com gaze e algodão. Este procedimento foi realizado em duplicata. Posteriormente, foram colocados em autoclave durante o tempo determinado. Após isso, os erlenmeyers foram retirados e resfriou-se em água. Em seguida, foi feita a lavagem do bagaço de cana em água corrente utilizando filtro de pano até atingir pH em torno de 6, e então colocou-se o bagaço em bandeja para secagem em estufa sob temperatura de 60°C. Após 24 horas, a bandeja foi retirada da estufa e o bagaço de cana-de-açúcar foi triturado em liquidificador doméstico e armazenado em recipiente fechado sob temperatura ambiente.

4.4.3. Hidrólise enzimática

Para a hidrólise foram analisadas três condições de proporção entre o bagaço de cana pré-tratado e o fermentado seco: 1:1 pré-tratado/fermentado, 2:1 pré-tratado/fermentado e 1:2 pré-tratado/fermentado. As condições de experimento foram:

temperatura de 50°C, razão sólido/líquido de 1:20, velocidade de rotação de 150 rpm e tempo de hidrólise de 48 horas.

Foram pesados 3,0 gramas de sólido de acordo com cada proporção de bagaço pré-tratado e fermentado seco, em seguida foram colocados em erlenmeyers de 150 mL já contendo 60 mL de solução tampão citrato de sódio 50mM em pH 4,8. Os erlenmeyers foram tampados com algodão e gaze. Em seguida, foram colocados em incubadora shaker durante o tempo determinado. Foram retiradas amostras nos tempos de 0h, 1/2h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 24h e 48h para análise de açúcares redutores totais. Este procedimento foi realizado em duplicata.

4.4.4. Análise de Açúcares Redutores Totais (ART)

Para a análise de ART, as amostras foram diluídas em água destilada na proporção de 1:6. Após, seguindo a metodologia proposta por Miller (1959), em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do sobrenadante da amostra com 0,5 mL de DNS, realizado em duplicata, e agitou-se em vortex. Foi preparado também o branco do espectrofotômetro, adicionando-se 0,5 mL de água destilada com 0,5 mL de DNS.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria à 100°C durante 5 minutos. Após esse tempo, a bandeja com os tubos foi colocada em banho com água gelada. Posteriormente, adicionou-se 4 mL de água destilada para diluição, e foi realizada a leitura no espectrofotômetro em absorvância 540 nm. Para determinação da concentração de açúcares redutores totais foi construída uma curva padrão. O valor da concentração pode ser determinado por:

$$Conc. = A \times d \times 4 \times f \quad (7)$$

Onde:

Conc. = concentração de açúcares redutores totais (mg/mL);

A = absorvância da amostra;

f = fator de conversão da curva de calibração (mg/mL);

d = diluição da amostra;

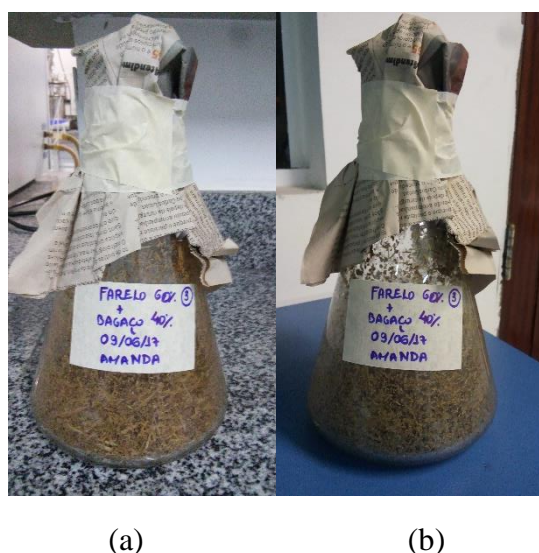
4 = diluição da inversão da sacarose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produção das enzimas

O fungo apresentou bom crescimento em meio contendo farelo de trigo com bagaço de cana, como esperado devido à estudos anteriores realizados de acordo com CARDOSO (2016), em que se utilizou estas fontes indutoras. Na Figura 5.1 está mostrado o desenvolvimento do fungo neste meio.

Figura 5.1 –Crescimento do fungo em meio contendo farelo de trigo com bagaço de cana com (a) 0 horas e (b) 120 horas



Neste cultivo foi obtido um valor de atividade enzimática de FPase de 1,5039 FPU/g em 120 horas de cultivo. O fungo também apresentou bom resultado quanto à síntese de enzimas celulolíticas.

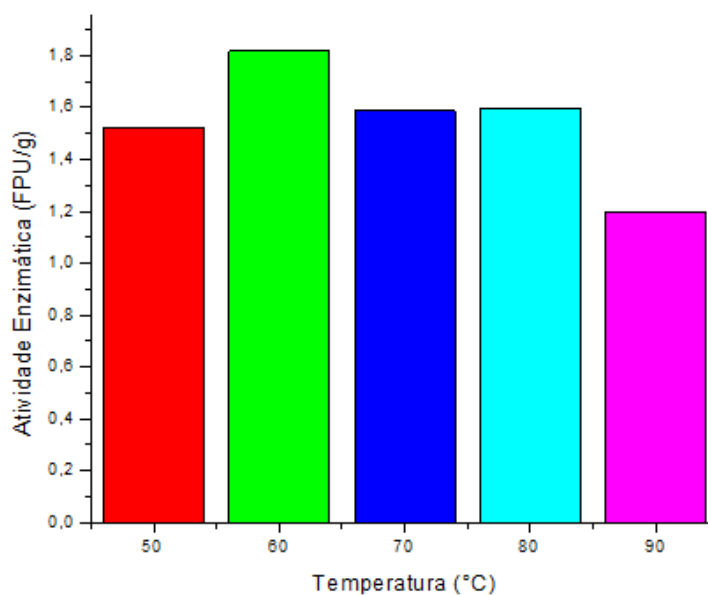
Comparando este resultado com o trabalho de ALMEIDA (2012), com produção de enzimas através do cultivo do fungo *T. reesei* RUT-30 em meio sólido sendo 25% de bagaço de cana e 75% de farelo de trigo, umidade de 70% e temperatura de incubação de 28°C, foi obtido um valor de atividade de 1,342 FPU/g em 7 dias de cultivo, os valores de atividade obtidos podem ser considerados próximos, porém em termos de produtividade no trabalho para 7 dias de cultivo tem-se um valor de 0,19 FPU/g.dia,

enquanto que no presente trabalho para 5 dias de cultivo tem-se um valor de 0,30 FPU/g.dia.

5.2. Secagem do fermentado

Na Figura 5.2, estão os resultados de atividade enzimática de FPase para as temperaturas estudadas, onde se observa o seu comportamento.

Figura 5.2 - Comportamento da atividade de FPase à diferentes faixas de temperatura de secagem do fermentado



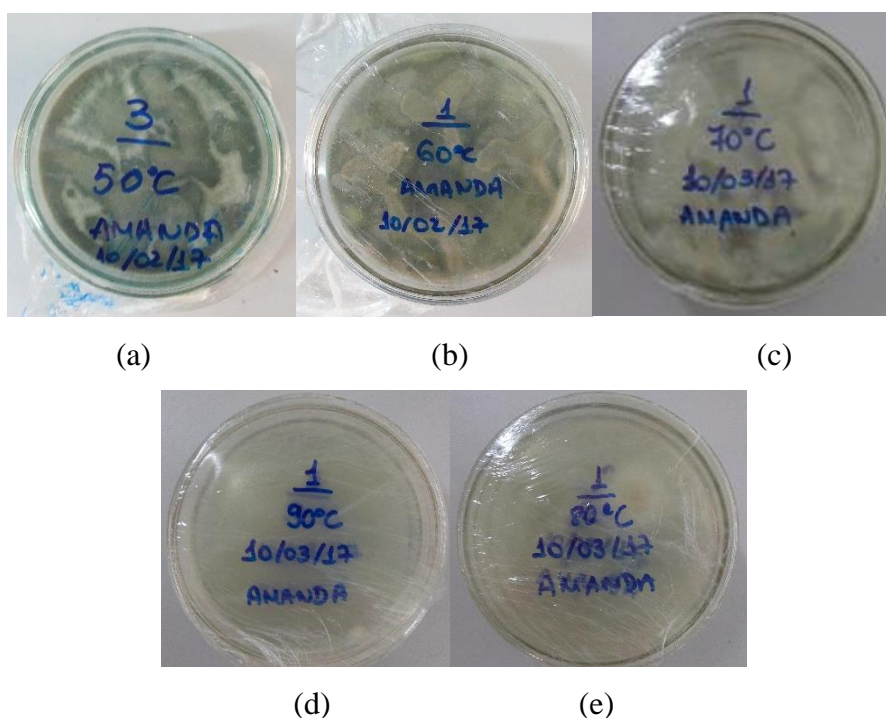
Observando a figura 5.2 percebe-se que a melhor temperatura de secagem em relação à manutenção da atividade enzimática foi 60°C, a partir de 70°C nota-se que a atividade começa a cair tendo o seu menor valor à 90°C. Mas, mesmo com a secagem a 90°C foi possível manter 66% da atividade de FPase.

Isto pode ter ocorrido devido ao fato de que existem condições ótimas de temperatura para a atividade das enzimas. De acordo com o trabalho de PEREIRA (2014), a temperatura ótima para atividade de enzimas FPase, secretadas pelo fungo *A.niger* IFBMD01, foi de 60°C, sendo observado um declínio na atividade a partir de 70°C.

Já o estudo realizado por SOUZA et al (2015), obteve melhor resultado para atividade de FPase, também secretadas por um fungo, na temperatura de 50°C, sendo também observado um declínio à 70°C.

Na Figura 5.3, estão os resultados do estudo do crescimento do microrganismo com relação à temperatura de secagem.

Figura 5.3 - Crescimento do microrganismo após secagem do fermentado à diferentes temperaturas: (a) 50°C, (b) 60°C, (c) 70°C, (d) 90°C e (e) 80°C



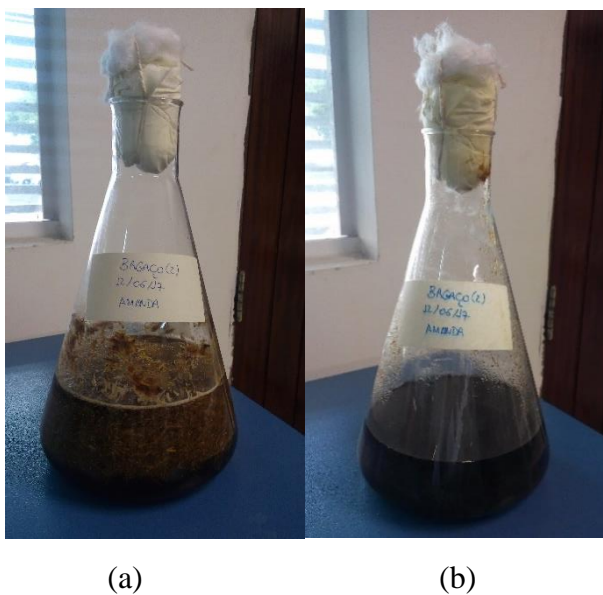
Agora observando o comportamento da temperatura em relação à desativação do microrganismo, vemos na Figura 5.3 que o microrganismo só apresentou pouco crescimento com secagem à 80°C e nenhum crescimento com secagem à 90°C.

Como visto na Figura 5.2, em 90°C houve considerável queda da atividade enzimática, baseado nestes resultados, optou-se por usar o fermentado seco à 60°C como carga enzimática para hidrólise com o pressuposto de que em 48 horas não haveria muito crescimento do fungo.

5.3. Pré-tratamento do bagaço-de-açúcar

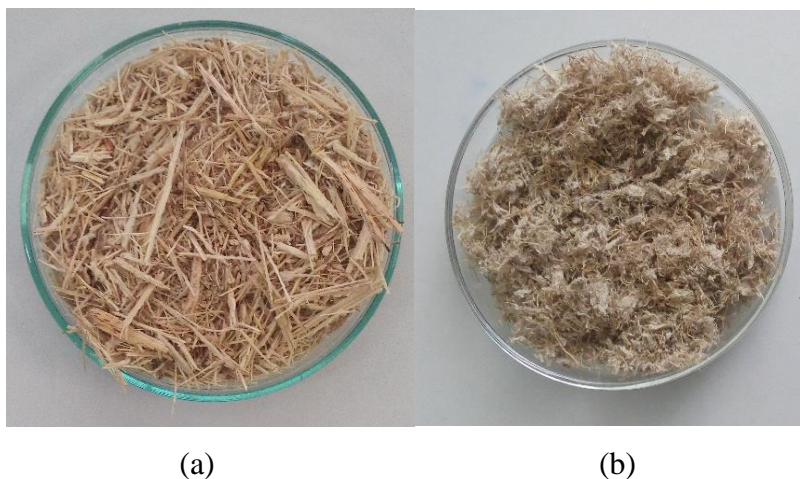
Na Figura 5.4 mostra a comparação de antes e após o pré-tratamento na autoclave, observando a cor do licor após o processo, percebe-se que o líquido está mais escuro indicando que houve remoção de lignina durante o processo.

Figura 5.4 – Comparação do licor (a) antes e (b) após o pré-tratamento em autoclave



Observando a Figura 5.5, e comparando o bagaço de cana antes e após o pré-tratamento, é possível perceber que houve eficiência no método, tendo redução na granulometria e na estrutura física do bagaço.

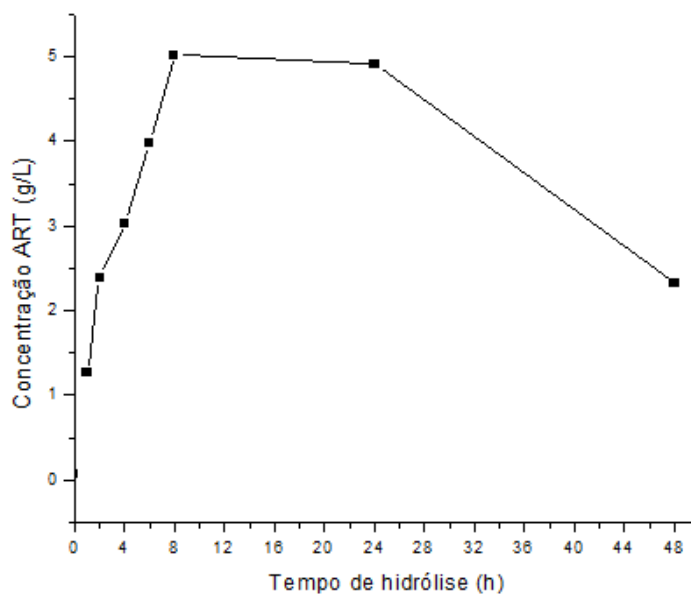
Figura 5.5 – Comparação do bagaço de cana (a) antes e (b) após o pré-tratamento



5.4. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

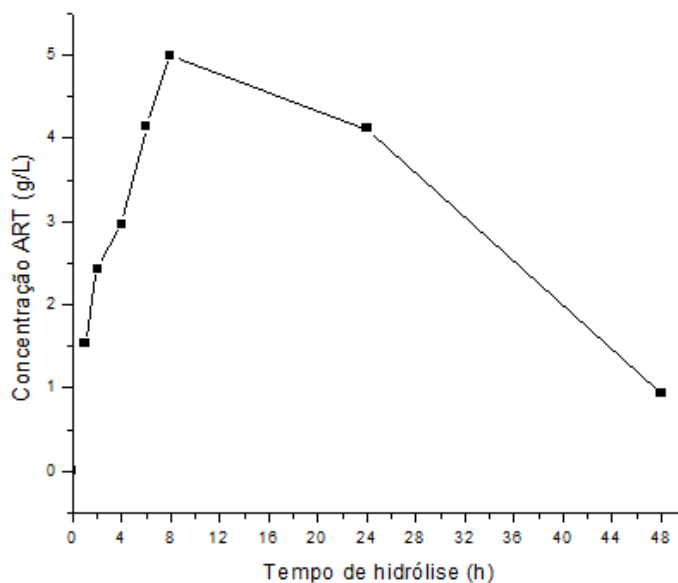
Os resultados nas figuras abaixo mostram o comportamento da liberação de açúcares redutores totais na hidrólise do bagaço de cana ao longo do tempo. Pode ser observado nos três casos o comportamento das curvas de concentração de ART.

Figura 5.6 - Concentração de ART na proporção 1:1 pré-tratado/fermentado



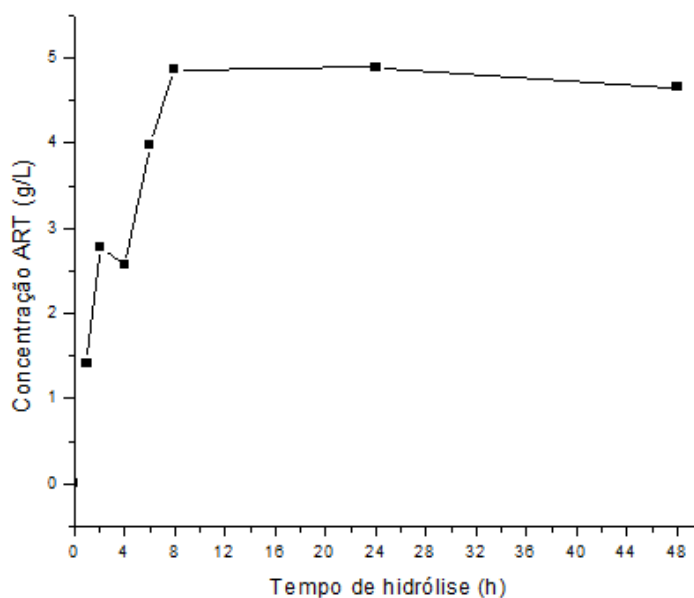
Na Figura 5.6, observamos neste caso que inicialmente a concentração de ART foi aumentando indicando que houve liberação durante a hidrólise, atingiu seu pico máximo de 5,01 g/L no tempo de 8 h e se manteve aproximadamente constante até 24 h, porém após esse tempo a concentração começou a cair chegando no valor de 2,31 g/L em 48 h.

Figura 5.7 - Concentração de ART na proporção 1:2 pré-tratado/fermentado



Neste segundo caso da Figura 5.7, podemos observar um comportamento semelhante ao do primeiro caso mostrado na Figura 5.6, inicialmente a concentração de ART subiu até atingir seu pico máximo em 8 h com um valor de 4,99 g/L, após isto a concentração começou a cair atingindo um valor de 0,93 g/L em 48 h.

Figura 5.8 - Concentração de ART na proporção 2:1 pré-tratado/fermentado



Na Figura 5.8, vemos nos resultados do terceiro caso o comportamento um pouco diferente em relação ao primeiro e segundo caso ao longo do tempo, onde inicialmente a concentração de ART começou a crescer até atingir seu pico máximo de 4,35 g/L em 8 horas, e após esse tempo a concentração se manteve aproximadamente constante até 48 horas, com um valor de 3,92 g/L. Portanto, teve uma leve queda mas quando comparado com os casos anteriores o valor caiu pouco após o pico.

Comparando os resultados de liberação de ART durante hidrólise enzimática com os dos estudos realizados por SILVA (2017), para o bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor e hidróxido de sódio 2% (m/v), com condições de temperatura e agitação iguais, pH de 5,0 e carga enzimática de 10 FPU do complexo enzimático CellicCTec, podemos notar que o comportamento da produção de açúcares redutores totais ao longo do tempo de hidrólise é diferente, a concentração de ART aumenta até o tempo de 72 h enquanto que para os experimentos no presente trabalho, após 8 horas de hidrólise a concentração cai. Outro fato que pode ser comparado são os picos máximos de concentração de ART, para o trabalho mencionado anteriormente o pico de liberação foi 29,92 g/L em 72 horas, enquanto que no presente trabalho para o melhor experimento foi 5,01 g/L em 8 horas, que é 5,97 vezes menor.

É importante salientar que o complexo enzimático CelliCCTec são enzimas comerciais que passam por tratamento de purificação e concentração, enquanto que as utilizadas neste trabalho são extratos enzimáticos brutos provenientes de um cultivo de microrganismos. Este fator também interfere na comparação dos resultados de hidrólise.

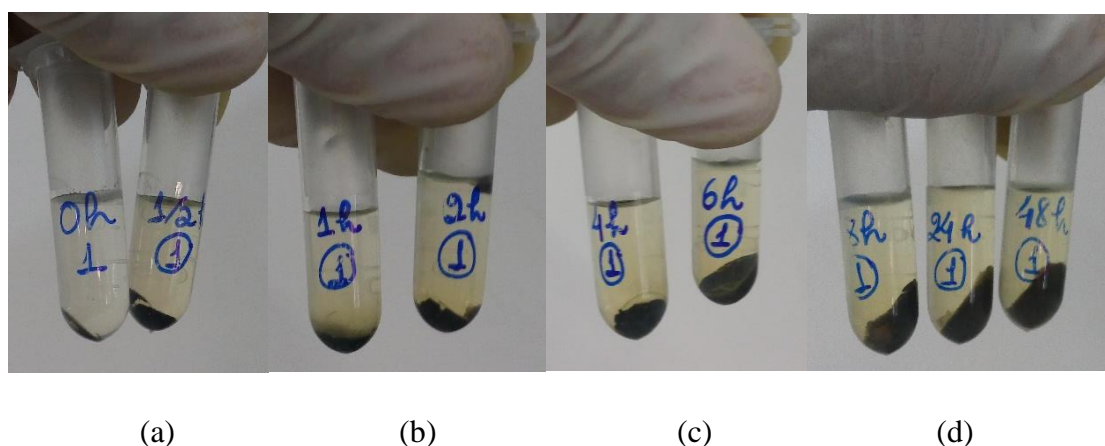
Comparando também os resultados de hidrólise com os do trabalho de RODRIGUES (2016), para o bagaço pré-tratado com hidróxido de sódio 2% (m/v) com mesma condição de agitação e temperatura próxima de 47°C, pH próximo de 5,0, carga enzimática de extrato bruto produzida pelos fungos filamentosos *A. fumigatus* e *A. nigere* concentração próxima de bagaço pré-tratado de 2,2%, o melhor resultado de hidrólise em concentração de ART foi no tempo de 12 horas com um valor de 6,307 g/L, enquanto que no presente trabalho foi de aproximadamente 5,0 g/L em 8 horas, os valores podem ser considerados próximos e é importante levar em consideração que para este trabalho também foi utilizado uma carga enzimática de enzimas brutas.

Observando e comparando os três casos das Figuras 5.6, 5.7 e 5.8, o que pode ter ocorrido para haver a queda da concentração de ART ao longo do tempo de hidrólise, foi que o fungo filamentososo FSDE 16, usado na obtenção do extrato enzimático bruto, conseguiu se manter viável nas condições de secagem do fermentado (60°C por 24 horas). Durante a hidrólise houve crescimento do FSDE 16 e consumo dos açúcares liberados.

Analisando as proporções entre o fermentado e o bagaço pré-tratado para os três casos, no segundo caso, que tem a maior quantidade de fermentado, a concentração de ART ao longo do tempo caiu mais que nos outros casos. No terceiro caso, que tem a menor quantidade de fermentado, a concentração caiu pouco ao longo do tempo comparando com os outros dois, então observou-se que quanto maior a proporção de fermentado mais caiu a concentração.

Na Figura 5.9, estão as amostras retiradas durante a hidrólise após centrifugação, em que podemos notar que o microrganismo cresceu ao longo do tempo. Este é um outro fator que indica que o microrganismo pode ter consumido os açúcares liberados.

Figura 5.9 - Crescimento do microrganismo nos tempos de hidrólise: (a) 0h e ½ h, (b) 1h e 2h, (c) 4h e 6h e (d) 8h, 24h, 48h, respectivamente



Segundo AGUIAR (2010), após certo tempo de hidrólise o microrganismo metaboliza os oligossacarídeos, celobiose e glicose formados durante a degradação da celulose presente no substrato, no seu trabalho foi estudada a avaliação da concentração de ART durante a fermentação com o fungo *Aspergillusniger* em bagaço pré-tratado com hidróxido de sódio 4% (m/v), proporção de 50g/L, pH próximo de 5,0 e temperatura de

30°C. Observa-se que o comportamento da curva de ART ao longo do tempo de fermentação é semelhante ao comportamento mostrado nas Figuras 5.6 e 5.7.

Portanto, os resultados de concentração de ART e do crescimento do microrganismo mostram que não é mais viável continuar com o processo após 8 horas de hidrólise.

6. CONCLUSÕES

O fungo FSDE16 apresentou bom crescimento em meio sólido contendo farelo de trigo com bagaço de cana. Foi possível obter enzimas no cultivo e quantificar a atividade enzimática para realização da hidrólise.

Através da avaliação da secagem do fermentado concluiu-se que para a temperatura de 90°C, onde ocorreu a desativação do microrganismo, a atividade enzimática foi afetada causando sua diminuição, então a melhor temperatura para a atividade de FPase foi 60°C.

O pré-tratamento alcalino com hidróxido de sódio nas condições estudadas se mostrou eficiente em bagaço de cana-de-açúcar.

Foi possível avaliar a utilização do resíduo fermentado seco como carga enzimática para hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado, bem como diferentes proporções. Para quantidades menores de fermentado o declínio de concentração ao longo do tempo na curva de ART foi menor.

Analisando os resultados de hidrólise, conclui-se que o microrganismo cresceu e consumiu os produtos formados durante o processo. Também foi possível concluir que a partir de 8 horas de hidrólise, não se torna mais viável realizá-la pois a concentração de ART começou a cair.

Como sugestões para futuros trabalhos, estudar a temperatura de 60°C para realizar a hidrólise pode trazer melhores resultados, também avaliar outro método para desativação do microrganismo como expor o fermentado à luz UV, pode ser melhor para em tempos superiores a 8 horas de hidrólise, o microrganismo não consuma os produtos formados.

7. REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus Niger*. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2010.

AGUIAR, C. M. de & LUCENA, S. L. de. Produção de celulasas por *Aspergillusnigere* cinética de desativação celulásica, *Acta Scientiarum Technology*, Maringá, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2011.

ALMEIDA, M. C. O. Indução de celulasas e xilanases por *Trichodermareesei* e *Penicillium variabile* em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2012.

ANDRADE, L. F. de. Produção de etanol de segunda geração. Monografia (Especialização). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

ASSUMPCÃO, S. M. N. de; PONTES, L. A. M.; CARVALHO, L. S. de; CAMPOS, L. M. A.; ANDRADE, J. C. F. de; SILVA, E. G. da, Pré-tratamento combinado $H_2SO_4/H_2O_2/NaOH$ para obtenção de frações lignocelulósicas do bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Virtual de Química*, vol. 8, n. 3, p. 803-822, 2016. ISSN 1984- 6385.

AZEVEDO, V. Q. Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de biomassa de arundo, palha e casca de arroz. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Pelotas, Centro de Engenharias. Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, 2014.

CARDOSO, A. L. de C. Produção de celulasas e xilanases por fungos isolados do solo da indústria sucroalcooleira pelo cultivo semissólido. Relatório Final. Programa de Iniciação científica e tecnológica, 2016.

CARVALHO, M. L. Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2011.

CINTRA, L. C. Produção de hemicelulases recombinantes e aplicação na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Universidade de Brasília, Instituto de Biologia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, 2016.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar*, Safra 2017/2018, Brasília, v.4, n.1, p. 1-57, 2017. ISSN 2318-7921.

FACUNDES, B. C. Fungos filamentosos produtores de holoceluloses prospectados em mata de galeria do cerrado tocantinense. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi. Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

GONÇALVES, C. Aplicação de agentes oxidantes no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e sua influência na sacarificação da celulose. Dissertação (mestrado). Instituto Mauá de Tecnologia, Escola de Engenharia, 2009.

GUILHERME, A. de A. Estudo experimental e modelagem do processo de sacarificação e fermentação simultânea utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014.

GHOSE, T. K., Measurement of cellulase activities. *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, v. 59, p. 257-268, 1987.

GOMES, M. A. Destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos visando à obtenção de etanol de 2G. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.

LOPES, E. S. Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química, 2015.

LORENCINI, P. Otimização do pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar para a sua utilização como substrato na produção biológica de hidrogênio. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Programa de Pós-Graduação em Química, 2013.

LUCARINI, A. C.; DELQUIARO, A. C. T.; VIDOCA, L. C. P. T.; BRAZ, R.; Martins, R. M.; ALVES, T. P. Estudo da hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. *The Journal and Engineering and Exact Sciences - JCEC*, vol. 03, n. 02, p. 242-253, 2017. ISSN 2446-9416.

MAZIERO, P. Estudos topoquímicos durante obtenção de etanol a partir de celulose de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, 2013.

MORAIS, A. P. da S. & BROETTO, F. Pré-hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e sua caracterização físico-química. *Revista Energia na Agricultura*, Botucatu, vol. 27, p. 01-12, 2012. ISSN 1808-8759.

MORETTI, M. M. de S. Produção de ligno-hemi-celulases por fermentação em estado sólido e avaliação dos efeitos da aplicação das enzimas na composição química e estrutura do bagaço e da palha de cana. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2013.

MORO, M. K. Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-roscas. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, 2015.

NASCIMENTO, V. M. Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Dissertação (mestrado).

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2011.

NASCIMENTO, M. S. C. Celulases para a produção de etanol de segunda geração. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional. Programa de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira, 2015.

ODISI, E. J. Sacarificação enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio adicionado de álcaliucinzas. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2013.

OGEDA, T. L. Hidrólise enzimática de celuloses pré-tratadas. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, 2011.

PALMA, M. B. Produção de xilanases por *Thermoascus aurantiacus* em cultivo em estado sólido. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2003.

PEREIRA, D. E. P. Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2013.

PEREIRA, D. G. S. Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

PEREIRA, D. L. Produção de combustíveis verdes a partir de resíduos agro-florestais. Tese (mestrado). Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto em Engenharia Química, 2014.

PHILIPPINI, R. R. Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, 2012.

PIETROBON, V. C. Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido e álcali utilizando enzimas microbianas comerciais. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2008.

PINTO, T. O. P. Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Thermoascus aurantiacus* CBMAI 756, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma reesei* QM9414 e *Penicillium viridicatum* RFC3 e aplicação na sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar com diferentes pré-tratamentos. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2010.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química, 2010.

RABONATO, A. C. Linhagens fúngicas na hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2013.

RIBEIRO, M. A. Pré-tratamento do bagaço de cana utilizando o processo de oxidação avançada por feixe de elétrons para hidrólise enzimática da celulose. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2013.

RODRIGUES, P. de O. Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, 2016.

RODRIGUES-ZÚNIGÃ, U. F.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROSA, I. Z. Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana de açúcar. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

RUEDA, S. M. G. Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química, 2010.

SANTOS, E. dos, Utilização de enzimas produzidas por *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2008.

SANTOS, R. S. dos, Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono. Dissertação (mestrado). Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de Pós-Graduação em Química, 2012.

SILVA, G. M. Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol 2G. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, Centro de ciências exatas e tecnológicas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.

SILVA, T. A. L. Avaliação do pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido cítrico e hidróxido de sódio sobre a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, 2017.

SIQUEIRA, G. A. Hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado e distribuição topoquímica da lignina e dos ácidos hidroxicinâmicos na parede celular. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada, 2011.

SOUSA, V. M. Z. Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília. Programa de Graduação em Engenharia de Energia, 2014.

SOUZA, A. B.; Pereira, F. L. L.; Carvalho, I. F. Avaliação do efeito do pH, temperatura ótima, termoestabilidade e parâmetros cinéticos da enzima FPase obtida de uma linhagem de fungo filamentosso pré-selecionada crescida em bagaço de cana-de-açúcar. *Anais da Jornada Científica – Integração: Educação, Sociedade e Tecnologia*, Universidade do Estado do Mato Grosso, 2015.

VALADARES, F. de L. Produção e uso de enzimas derivadas do fungo *Pleurotus ostreatus* na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, 2013.

VÁSQUEZ, M. P. Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2007.

VIEIRA, R. C.; ANTUNES, P. C.; SILVA, M. C. S.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BISPO, V. G. Pré-tratamento do bagaço e de palha de cana-de-açúcar visando a deslignificação para produção de etanol. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.