



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Centro de tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



## DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO  
EXTRATO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO PRODUZIDO POR  
*TRICHODERMA REESEI* ATCC 2768

Josefa Ângela Batista Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos  
Co- Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Gorete Ribeiro de Macedo

Natal/RN  
Setembro/2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Josefa Ângela Batista Ribeiro

Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos utilizando Extrato Enzimático  
Celulolítico produzido por *Trichoderma Reesei* ATCC 2768

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, sob a orientação do Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos.

Natal/RN  
Setembro/2010

Catálogo da Publicação na Fonte.  
UFRN / CT / PPGEQ  
Biblioteca Setorial "Professor Horácio Nicolas Solimo".

Ribeiro, Josefa Ângela Batista.

Hidrólise de resíduos lignocelulósicos utilizando extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768 / Josefa Ângela Batista Ribeiro. - Natal, 2010.

76 f.: il.

Orientador: Everaldo Silvino dos Santos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Hidrólise enzimática - Dissertação. 2. Resíduos lignocelulósicos - Dissertação. 3. Extrato enzimático - Dissertação. 4. *Trichoderma reesei* - Dissertação. I. Santos, Everaldo Silvino dos. II. Título.

RN/UF/BSEQ

CDU542.9(043.3)

**Ribeiro, Josefa Ângela Batista** – HIDRÓLISE DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS UTILIZANDO EXTRATO ENZIMÁTICO CELULOLÍTICO PRODUZIDO POR *TRICHODERMA REESEI* ATCC 2768. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de Concentração: Engenharia de Processos, Natal/RN, Brasil.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. Everaldo Silvino dos Santos

**Co-Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

**RESUMO:** Extrato enzimático celulolítico produzido por *Trichoderma reesei* ATCC 2768 cultivado em incubador rotativo, utilizando-se bagaços de pedúnculo de caju e de casca de coco como substrato, foi utilizado para estudar o processo de hidrólise enzimática dos mesmos resíduos, bagaço do pedúnculo de caju e bagaço de coco, quando esses materiais foram pré-tratados alcalinamente (com NaOH 1M) e por oxidação úmida, e combinando-se esses dois pré-tratamentos. Os ensaios de hidrólise foram realizados em condições de 125 rpm, 50°C e pH inicial 4,8 durante 108 horas. O extrato produzido utilizando como substrato bagaço de caju tratado alcalinamente (1,337 UI/mL de CMC<sub>ase</sub> e 0,074 UI/mL de FP<sub>ase</sub>), quando utilizado nos ensaios de hidrólise, apresentou uma velocidade inicial de hidrólise de 0,094 g de AR/g de substrato.h e rendimento de hidrólise de 96% de açúcares redutores totais (ART's), enquanto que para o extrato obtido utilizando-se bagaço de coco tratado com NaOH 1M (0,640 UI/mL de CMC<sub>ase</sub> e 0,070 UI/mL de FP<sub>ase</sub>) obteve-se uma velocidade inicial de hidrólise de 0,025 g de AR/g de substrato.h e um rendimento de 48% de açúcares redutores totais (ART's). No caso dos bagaços tratados por oxidação úmida, verificou-se que o caldo enzimático obtido utilizando como substrato pedúnculo de caju (0,547 UI/mL de CMC<sub>ase</sub>) apresentou uma velocidade inicial de hidrólise de 0,014 g de AR/g de substrato.h e um menor rendimento 89% de ART's, quando comparado com o método alcalino. O bagaço de coco tratado por oxidação úmida (1,147 UI/mL de CMC<sub>ase</sub> e 0,071 de FP<sub>ase</sub>) apresentou uma velocidade inicial de hidrólise de 0,029 g de AR/g de substrato.h e um rendimento de hidrólise de 91% de açúcares redutores totais (ART's). Entretanto, quando se utilizou os bagaços pedúnculo de caju e casca de coco, submetidos aos dois pré-tratamentos combinados obteve-se um caldo enzimático para o pedúnculo de caju com atividades de (1,154 UI/mL de CMC<sub>ase</sub> e 0,107 de FP<sub>ase</sub>) e para a casca de coco um extrato enzimático com atividades de (0,538 UI/mL de CMC<sub>ase</sub> e 0,013 UI/mL de FP<sub>ase</sub>). Ao se utilizar estes extratos enzimáticos nos processos de hidrólise obteve-se para o pedúnculo de caju uma velocidade inicial de 0,029 g de AR/g de substrato.h. e um rendimento de 94% de açúcares redutores totais (ART's). Para o bagaço de casca de coco obteve-se uma velocidade de hidrólise de 0,018 g de AR/g de substrato.h e um rendimento de 69% de açúcares redutores totais (ART's). Dessa forma, conclui-se que o tratamento preliminar melhora a digestibilidade dos resíduos onde a celulose presente no substrato converte-se em açúcar fermentescível com a ação da enzima, sendo importante para uma posterior fermentação alcoólica.

---

Palavras-chaves: Resíduos lignocelulosicos, Extrato Enzimático e Hidrolise Enzimática

---

**Josefa Ângela Batista Ribeiro**

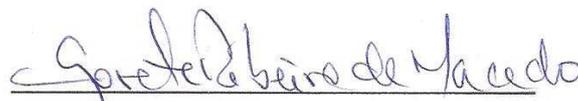
**Hidrólise de Resíduos Lignocelulósicos utilizando Extrato Enzimático  
Celulolítico produzido por *Trichoderma Reesei* ATCC 2768**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

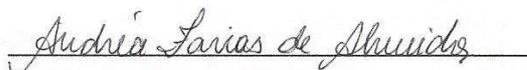
Aprovado (a) em 17 de setembro de 2010



Prof Dr Everaldo Silvano dos Santos  
Orientador - UFRN



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gorete Ribeiro de Macedo  
Co-Orientadora - UFRN



Dr<sup>a</sup> Andrea Farias de Almeida  
Pesquisadora  
(Membro Interno) - CNPq/UFRN



Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francine Ferreira Padilha  
Membro Externo - (UNIT)  
(Universidade Tiradentes)

## **ABSTRACT**

HYDROLISYS OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES USING CELLULOLYTIC ENZYMATIC BROTH BY *TRICHODERMA REESEI* ATCC 2768.

Cellulolytic enzymatic broth by *Trichoderma reesei* ATCC 2768 cultivated in shaker using cashew apple bagasse and coconut shell bagasse, as substrate for fermentation, was used to investigate the enzymatic hydrolysis of these substrates after pre-treatment with 1 M NaOH, wet-oxidation as well as a combination of these treatments. Hydrolysis runs were carried at 125 rpm, 50°C and initial pH of 4.8 for 108 hours. Enzymatic broth produced using cashew apple bagasse treated with 1M NaOH (1.337 UI/mL CMC<sub>ase</sub> and 0.074 UI/mL FP<sub>ase</sub>), showed after the hydrolysis an initial of 0.094 g of reducing sugar/g of substrate.h with 96% yield of total reducing sugars while for the coconut shell bagasse treated using the alkaline process (0.640 UI/mL CMC<sub>ase</sub> and 0.070 UI/mL FP<sub>ase</sub>) exhibited an initial hydrolysis velocity of 0.025 g of reducing sugar/g of substrate.h with 48% yield of total reducing sugars. For the treatment with wet-oxidation using cashew apple bagasse as substrate enzymatic broth (0.547 UI/mL CMC<sub>ase</sub>) exhibited an initial hydrolysis velocity of 0.014 g of reducing sugars/g of substrate.h with a lower yield about 89% of total reducing sugars compared to the alkaline treatment. Enzymatic broth produced using coconut shell treated by wet-oxidation showed an initial hydrolysis velocity of 0.029 g of reducing sugar/g of substrate.h with 91% yield. However, when the combination of these two treatments were used it was obtained an enzymatic broth of 1.154 UI/mL CMC<sub>ase</sub> and 0.107 FP<sub>ase</sub> for the cashew apple bagasse as well as 0.538 UI/mL CMC<sub>ase</sub> and 0,013 UI/mL de FP<sub>ase</sub> for the coconut shell bagasse. After hydrolysis, initial velocity was 0.029 g of reducing sugar/g of substrate.h. with 94% yield for the cashew apple bagasse and 0.018 g de reducing sugar/g of substrate.h with 69% yield for coconut shell bagasse. Preliminary treatment improves residues digestibility showing good yields after hydrolysis. In this case, cellulose from the residue can be converted into glucose by cellulolytic enzymes that can be used for ethanol production.

---

Keyword: Lignocellulosic residues, Enzymatic broth; Enzymatic hydrolysis

---

*"Nunca perca a fé na humanidade, pois ela é como um oceano. Só porque existem algumas gotas de água suja nele, não quer dizer que ele esteja sujo por completo".*

*Mahatma Ghandi*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, em primeiro lugar;*

*Aos meus Pais, por todo o apoio e amor que foram a mim dedicados através de ensinamentos, conselhos, lições de vida, finanças e colaboração em todos os sentidos. Agradeço a vocês por tudo. É a vocês, principalmente, que eu dedico esta conquista;*

*Ao meu esposo Hélio, por todo amor e dedicação, por compartilhar comigo as horas difíceis e as conquistas;*

*A minha querida e amada filha **Maria Júlia**, que mesmo sem entender nada pela sua pouca idade me ajudou muito;*

*As minhas irmãs, que sempre me apoiaram e ajudaram. Vocês são e sempre serão, além de irmãs, minhas melhores amigas.*

*A professora Dra. Gorete Ribeiro de Macedo pela oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.*

*Ao professor Dr. Everaldo Silvino dos Santos pela orientação, paciência, e os ensinamentos.*

*A todos os colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB), pelo apoio, ajuda e companheirismo.*

*A CAPES pelo suporte financeiro.*

*E a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.*

## Sumário

1- Introdução.....	2
2-Revisão Bibliográfica.....	6
2.1.2. Composição química dos materiais lignocelulósicos .....	9
2.2. O Caju.....	12
2.3. O Coqueiro .....	14
2.3.1. Composição do bagaço de coco.....	14
2.3.1.1. Bagaço de coco maduro.....	14
2.3.1.2. Bagaço da casca de Coco Verde.....	15
2.4- Celulose.....	15
2.5- Hemicelulose.....	18
2.6- Lignina .....	19
2.7- Pectina.....	21
2.8- Outros componentes: extrativos.....	21
2.9-Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal .....	22
2.10. Hidrólise .....	24
2.10.1 - Hidrólise enzimática.....	25
2.10.1.1 - As enzimas celulases.....	27
2.10.1.2 - Modo de ação das celulases: sinergismo.....	28
2.10.1.3 – Mecanismos de Síntese de Enzima.....	31
2.11. Pré-tratamento .....	32
2.11.1 - Pré-tratamento mecânico.....	34
2.11.2 - Pré-tratamento térmico.....	34
2.11.2.1.Pré-tratamento a vapor/oxidação úmida.....	36
2.11.2.2. Pré-tratamento por água quente (LHW).....	36
2.11.3. Pré-tratamento ácido.....	38
2.11.4. Pré-tratamento alcalino.....	38
3. Material e Métodos.....	42
3.1 – Matéria Prima .....	42
3.2 – Pré- Tratamentos.....	42
3.2.1 – Pré-tratamento alcalino.....	42

3.2.2 – Pré-tratamento por Oxidação Úmida.....	43
3.2.3 – Pré-tratamento por oxidação úmida e alcalino combinados.....	43
3.3- Obtenção do Extrato.....	44
3.3.1. - Obtenção do Inóculo .....	44
3.3.2 – Cultivo para (Extrato Enzimático).....	44
3.3.3. Avaliação da atividade do extrato obtido .....	45
3.3.3.1 - Determinação da atividade de FPase.....	45
3.3.3.2 - Determinação da atividade de CMCCase .....	46
3.3.3.3 - Cálculo da atividade enzimática.....	46
3.4.1.2 – Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART`s) .....	47
3.4.1.3 – Determinação de Açúcares Redutores (ARs).....	48
3.4.1.4 – Determinação da velocidade inicial (Vo) no processo de hidrólise. ....	48
4. Resultados e Discussão.....	51
5. <i>Conclusão</i> .....	6
6. Referências Bibliográficas.....	65
Anexos.....	75

## Índice de Figuras

<b>Figura 2.1:</b> Composição média dos resíduos lignocelulósicos.....	10
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular.....	15
<b>Figura 2.3:</b> Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semicadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação β-D (1,4) glicosídica.....	16
<b>Figura 2.4:</b> Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a semicadeia do polímero de celulose.....	16
<b>Figura 2.5:</b> Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses.....	18
<b>Figura 2.6:</b> Representação esquemática de uma xilana de gramínia mostrando alguns grupos substituintes: Xyl (1,4—D- xilapiranoose); Ara (L- arabinofuranose); Ac ( Acetil); (4- Me)-GlcA (ácido (4- O- metil)-D-glucopiranurônico); FA ( ácido ferúlico); DDFA (ácido desidroferúlico) .....	20
<b>Figura 2.7:</b> Estrutura da lignina de abeto ( <i>Picea abies</i> ) .....	20
<b>Figura 2.8:</b> Precursores da biossíntese da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico).....	22
<b>Figura 2.9:</b> Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25 μm. S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M.L., lamela média.....	29
<b>Figura 2.10:</b> Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal. Ligações-PL, ligações poliose – lignina.....	32

**Figura 2.11:** Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e  $\beta$ -glicosidasas ( $\beta$ -gluc) de *Trichoderma reesei*. C define a região altamente ordenada (região cristalina), R os grupos terminais redutores (círculos preenchidos), e NR os grupos terminais não redutores (círculos não-preenchidos). EGs ataca as estruturas mais desordenadas da celulose. A ação da  $\beta$ -glicosidase produz a glicose (Rabelo, 2007).....33

**Figura 2. 12:** Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU *et al.*,1980).  
.....54

**Figura 2.13:** Esquema representativo dos passos do pré-tratamento. A transformação entre celulose cristalina (C) e amorfa (C\*) é reversível. Ambas formas rendem oligossacarídeos, na qual hidrolisam obtendo a glicose. A degradação da glicose pode então se transformar em inibidores da fermentação.....55

**Figura 4.2.1** Curva dos hidrolisados do bagaço de pedúnculo de caju tratados alcalinamente com NaOH. ....56

**Figura 4.2.2** Curva dos hidrolisados do bagaço de pedúnculo de caju tratados por oxidação úmida.....57

**Figura 4.2.3** Curva dos hidrolisados do bagaço de pedúnculo de caju tratados alcalinamente com NaOH e oxidação úmida.....58

**Figura 4.2.4** Curva dos hidrolisados do bagaço da casca de coco tratados alcalinamente com NaOH. ....59

**Figura 4.2.5** Curva dos hidrolisados do bagaço da casca de coco tratados por oxidação úmida.....60

**Figura 4.2.6** Curva dos hidrolisados do bagaço casca de coco tratados alcalinamente com NaOH e oxidação úmida .....61

**Figura 4.2.1a** Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju tratados alcalinamente com NaOH. ....61

**Figura 4.2.2a** Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju tratados por oxidação úmida.....62

<b>Figura 4.2.3a</b> Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju tratados alcalinamente com NaOH e oxidação úmida .....	62
<b>Figura 4.2.4a</b> Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço da casca de coco tratados alcalinamente com NaOH. ....	63
<b>Figura 4.2.5a</b> Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço da casca de coco tratada por oxidação úmida.....	63
<b>Figura 4.2.6a</b> Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço da casca de coco tratados alcalinamente com NaOH e oxidação úmida.....	64
<b>Figura 4.2.6b</b> Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de hidrólise do bagaço da casca de coco tratados alcalinamente com NaOH e oxidação úmida .....	64

## Índices de Tabelas

<b>Tabela 2.1-</b> Percentual de compostos extraíveis dos bagaços de pedúnculo de caju e casca de coco com e sem tratamento.....	10
<b>Tabela 2.2-</b> Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis dos bagaços de pedúnculo de caju sem tratamento e pré-tratados.....	11
<b>Tabela 2.3-</b> Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis dos bagaços de pedúnculo de caju sem tratamento e pré-tratados.....	11
<b>Tabela 2.4-</b> Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise .....	24
<b>Tabela 3.1–</b> Meio de Xiong (2004) .....	45
<b>Tabela 4.1.1</b> - Resultados das atividades enzimáticas com o bagaço do Pedúnculo do caju como substrato.....	52
<b>Tabela 4.1.2</b> - Resultados das atividades enzimáticas com o bagaço da casca de coco como substrato.....	53

## **Listas de Abreviaturas**

**(AR`s)** Açúcares redutores

**(ART`S)** Açúcares redutores totais

**(CMC)** Carboximetilcelulase

**(FPase )** papel de filtro

**(CMCase)** carboximetilcelulase

**DNS** ácido dinitrosalicílico

**(FS)** Fermentação Submersa

**(HMF)** Hidroximetilfurfural

**(PDA)** Potato dextrose Agar

**(S)** Substrato

**(P)** Produto

**(S1)** Parede celular secundária 1

**(S2)** Parede celular secundária 2

**(S3)** Parede celular secundária 3

**(UI/mL)** Unidade de atividade Enzimática

---

# CAPÍTULO 1

## *Introdução Geral*

---

# 1-Introdução

A progressiva elevação do preço do petróleo, no cenário mundial, levou o Brasil a buscar novas fontes de energias renováveis de baixo custo. Além disso, o crescente aumento de emissão de gases e os impactos climáticos causado pelo efeito estufa justificam a busca por novas fontes de energias renováveis. Os resíduos lignocelulósicos são materiais com quantidade significativa de celulose, a qual pode ser convertida em glicose fermentável. Na produção de bioetanol de segunda geração, a sacarificação de substratos lignocelulósicos é uma etapa fundamental e dificultada pela presença da hemicelulose e lignina, biopolímeros que se apresentam na parede celular e impedem a ação das celulasas.

No Brasil são gerados diversos tipos de subprodutos e resíduos agroindustriais como: bagaços de pedúnculos de caju, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de coco e outros. A disposição final desses resíduos, ou seja, sua eliminação causa sérios problemas ambientais. Apesar de uma parte ser utilizada para fins diversos, uma grande quantidade ainda permanece sem utilização. Neste sentido, os resíduos de conteúdo lignocelulósico, como os bagaços de pedúnculo de caju e casca coco, constituem uma matéria-prima renovável e abundante cujo aproveitamento é desejável e tem provocado um interesse crescente para o uso na cadeia de produção de etanol de 2<sup>a</sup> geração. O desenvolvimento de alternativas de aproveitamento destes resíduos possibilita a redução da disposição de resíduos sólidos em aterros sanitários e proporciona uma nova opção de rendimento junto aos sítios de produção. A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza. Os órgãos fiscalizadores têm se mobilizado. Constantes revisões têm ocorrido em resoluções ligadas a resíduos, tais como a RDC 306/04, resolução da Anvisa (Brasil, 2004) e a Res 388/05 do Conoma (Brasil, 2005) que classificam e propõem tratamentos, forma de manipulação e descarte dos resíduos. Muito se fala em Gestão Ambiental e certificação da ISO 14000, conjunto de normas que visa o desenvolvimento de atividades dos mais diversos segmentos, sem transgredir as leis ambientais vigentes. Enfim, existe uma preocupação mundial com o meio ambiente e a sustentabilidade do planeta.

O desenvolvimento tecnológico mundial avança cada vez mais no caminho dos processos biotecnológicos, que vai ao encontro das políticas ambientais. Nesse sentido, a substituição de processos químicos convencionais por processos enzimáticos torna o

desenvolvimento e aprimoramento desta tecnologia de suma importância (Coelho, 1993; Cunha, 1999). Enzimas são catalisadores orgânicos, responsáveis pelas milhares de reações bioquímicas envolvidas nos processos biológicos dos sistemas vivos. As enzimas apresentam ampla utilização na indústria alimentícia, farmacêutica e energia.

Uma das alternativas para aproveitamento do pedúnculo do caju e casca de coco poderia ser o seu aproveitamento em processos fermentativos, por exemplo, como substrato para produção de enzimas do complexo celulolítico, as quais podem ser muito importantes na cadeia de produção de etanol de 2<sup>a</sup> geração, o qual utiliza também materiais lignocelulósicos como substrato. E como tal, a produção de etanol a partir de substratos lignocelulósicos demanda uma etapa de hidrólise que antecede a fermentação. Esta hidrólise pode ser ácida ou enzimática, sendo a enzimática a mais adequada em virtude de gerar poucos subprodutos que possam inibir a etapa posterior da fermentação. Como a maioria dos rejeitos agroindustriais o bagaço pedúnculo de caju e casca de coco contêm grandes quantidades de compostos como celulose, hemicelulose, pectina e outros, não havendo necessidade de grandes complementações nutricionais para o adequado desenvolvimento microbiano, (Badhan et al, 2007). Estes compostos funcionam como indutores para a produção de enzimas extracelulares, tais como celulasas, xilanases, pectinases e outras.

O pré-tratamento de uma biomassa lignocelulósica consiste em uma das etapas operacionais mais relevantes em termos de custo direto, além de influenciar consideravelmente os custos das etapas anteriores e subseqüentes do processo. Basicamente, o pré-tratamento relaciona-se às operações de preparação de matéria-prima.

A conversão hidrolítica da celulose tem sido considerada como um dos principais pontos tecnológicos do processo de produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas. Em princípio, as conversões enzimáticas aparecem como opções promissoras, em termos de custo global, em virtude da possibilidade de atingir rendimentos glicosídicos próximos ao teórico, além do fato de se poder contar com as técnicas modernas de microbiologia e engenharia genética, com vistas à otimização das etapas do processo integrado. Deste modo, a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas pode tornar-se competitiva com as demais rotas de produção de bicomustíveis em larga escala.

A hidrólise ácida apresenta vantagens importantes sobre o processo enzimático, em virtude da disponibilidade, garantia de fornecimento e menor custo dos reagentes, além da maturidade tecnológica e reduzidas restrições em termos de propriedade intelectual. Por outro lado, existem desvantagens concernentes à necessidade de sistemas de recuperação de ácido, em processos que utilizam ácido concentrado e maiores custos de materiais de construção dos

equipamentos. Os processos que utilizam ácido diluído apresentam problemas associados ao reduzidos rendimentos em glicose (50%-60%), (Wyman, 1994), além da formação de compostos inibidores da fermentação, resultantes de degradação sacarídica. O processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas à obtenção de rendimentos superiores, sob temperaturas moderadas (40-50°C) e pressão atmosférica (Szczo drak & Fiedurek, 1996; Wyman, 1994; Riley, 2002; Leathers, 2003). Entretanto, aspectos operacionais relacionados ao elevado tempo de processo, desativação catalítica por inibição da atividade enzimática, bem como do elevado custo das enzimas, têm acarretado incertezas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática.

Neste contexto, é de fundamental importância que o Brasil se preocupe em desenvolver processos para produção de enzimas do complexo celulolítico, que se mostrem viável tecnicamente e economicamente. Para tal é importante estudar-se o potencial de substratos baratos amplamente disponíveis, bem como estudar-se o processo de hidrólise em si, incluindo aí a influência de pré- tratamentos distintos no rendimento do processo de hidrólise.

Dessa forma, a presente dissertação tem o objetivo de avaliar o comportamento do processo de hidrólise de pedúnculo de caju e casca de coco, utilizando-se extrato enzimático sintetizado por *Trichoderma reesei* cultivada em meios que continham estes mesmos resíduos como substrato. Avaliou-se também a influência de dois pré- tratamentos isolados e combinados.

---

## **CAPÍTULO 2**

### ***Revisão Bibliográfica***

---

## **2-Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Materiais lignocelulosicos.**

Nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido a incessante demanda das atividades agrícolas. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. A utilização dos resíduos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos, e uma ajuda para solucionar o problema da poluição ambiental (Pandey et al., 2000).

A celulose é o mais abundante composto orgânico renovável da Terra. Muitos estudos estão sendo feitos com a finalidade de encontrar aplicações econômicas para esse resíduo que representa mais de 60% dos resíduos agrícolas. A maioria desses materiais é usada como ração animal ou queimados como fonte de energia. Esse resíduo agrícola contém uma mistura de lignina e hemicelulose ligadas fortemente a celulose dificultando a decomposição enzimática (Kansoh; Essam; Zeinat, 1999). Kirk & Farrel (1987) mencionaram que remover a lignina é necessário para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática e relataram que a bioconversão da celulose depende do grau de cristalização e da força de ligação da mistura de celulose. A remoção de materiais ligados e a degradação da estrutura cristalina podem aumentar a eficiência da bioconversão da celulose (Kansoh et al., 1999).

#### **2.1.1. Hidrólise dos materiais lignocelulósicos**

A utilização dos diferentes componentes passíveis de serem obtidos dos materiais lignocelulósicos necessita inicialmente de uma separação mais seletiva dos mesmos. Desta forma ocorre a necessidade da ruptura do complexo lignina-celulose-poliose bem como a remoção de cada uma destas frações através das técnicas de pré-tratamento bem como de deslignificação. Dentre estas técnicas existem diferentes tipos de separação, oriunda de processos térmicos, químicos, físicos, biológicos e até mesmo a combinação destes conforme o grau de separação requerido para o material em estudo. Segundo a literatura os pré-

tratamentos mais eficientes são os que combinam técnicas físicas e químicas para promover a quebra das paredes celulósicas, sendo ainda sugerido o uso do vapor saturado (oxidação umida) reconhecido como um dos métodos mais promissores para implementação industrial (Focher et al., 1988; Wood & Saddler, 1988; Ghosh & Singh, 1993; Ramos & Sadler, 1994).

O processo de pré-tratamento tem como alvo separar os carboidratos da matriz lignina enquanto minimiza a destruição química dos açúcares fermentáveis essenciais para produção de etanol. Dentre os processos de tratamentos tem-se, água quente e oxidação umida, alcalino e pré-tratamentos com solventes, muito útil para tratamentos ácidos (Mielenz, 2001). Um novo processo, livre de ácido sulfúrico, tem sido explorado principalmente com madeira. Este processo usa peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e soda, o fungo produz uma cobertura brilhante e com alta elasticidade. Além de apresentar deslignificação utilizando EDTA como agente auxiliar (Kansoh et al., 1999). O processo de pré-tratamento inicia com a quebra da estrutura da biomassa e hidrólise parcial dos polímeros de carboidrato tornando-os mais acessíveis para a hidrólise enzimática (Wyman, 1999).

Várias pesquisas foram realizadas em relação a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol nas últimas duas décadas (Sun & Cheng 2002). A conversão inclui dois processos: hidrólise da celulose em materiais lignocelulósicos para fermentação de açúcares redutores e a fermentação do açúcar em etanol. A hidrólise é usualmente catalisada pela celulase e a fermentação é realizada por leveduras ou bactérias. Os fatores que afetam a hidrólise da celulose são a porosidade do bagaço, a cristalinidade da fibra de celulose e quantidade de lignina e hemicelulose. A presença da lignina e hemicelulose dificultam a eficiência da enzima durante a hidrólise. A remoção da lignina e hemicelulose reduz a cristalinidade da celulose, e aumenta a porosidade do bagaço no processo de pré-tratamento com significativa melhora na hidrólise (Mcmillan, 1994). O pré-tratamento tem a vantagem de aumentar a formação de açúcares ou habilidade para subsequente formar açúcar a partir da hidrólise enzimática, evitar degradação ou perda de carboidrato, evitar a formação de produtos inibidores dos processos subsequentes como hidrólise e fermentação, (Sun & Cheng 2002).

Ácidos concentrados como o  $H_2SO_4$  e HCl foram utilizados para o tratamento de materiais lignocelulósicos. Embora eles sejam potentes agentes para a hidrólise celulósica, em altas concentrações são tóxicos, corrosivos, perigosos e requerem reatores que sejam resistentes a corrosão. A recuperação do ácido concentrado adicionado torna o processo possivelmente econômico (Sun, 2002, Sivers & Zacchi, 1995).

O uso de ácido diluído na hidrólise teve sucesso para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. A diluição do ácido sulfúrico no pré-tratamento pode alcançar alta velocidade de reação e significativa melhora na hidrólise da celulose (Esteghlalian et al., 1997). Temperaturas moderadas influenciam diretamente na sacarificação da baixa produção porque há a decomposição de açúcares. Alta temperatura em tratamento com ácido diluído é favorável para a hidrólise da celulose (Mcmillan, 1994). A hidrólise com ácido diluído é um processo que usa condições menos severas e alcança alta taxa de conversão de xilanas a xilose. Para ser um processo econômico é necessário atingir alta conversão de xilanas para xilose, já que a xilana é o terceiro carboidrato em muitos materiais lignocelulósicos (Hinman et al., 1992).

A realização do pré-tratamento alcalino depende do conteúdo de lignina no material (Fan et al., 1987; Mcmillan, 1994). No mecanismo de hidrólise alcalina acredita ser uma saponificação das ligações intermoleculares dos ésteres ligados pela xilana hemicelulose e outros componentes, por exemplo, lignina e outra hemicelulose. Tratamento de materiais lignocelulósicos com NaOH diluído causa inchaço e principalmente aumento da área de superfície interna, um decréscimo no grau de polimerização, diminuição da cristalização, separação estrutural das ligações entre lignina e carboidrato, e ruptura da estrutura de lignina (Fan et al., 1987). A digestibilidade da madeira dura tratada com NaOH aumenta de 14% para 55% com decréscimo do conteúdo de lignina de 24-55% para 20%. No entanto o não efeito da diluição de NaOH foi observado em madeiras moles com conteúdo de lignina de 26% (Millet et al., 1986). Pré-tratamento com NaOH diluído foi ainda efetivo para hidrólises de palhas com conteúdo relativamente baixo de lignina de 10-18% (Bjerre et al., 1996).

A biodegradação da lignina pode ser catalisada pela enzima peroxidase na presença de  $H_2O_2$  (Azzam, 1989). O pré-tratamento do bagaço da cana com  $H_2O_2$  tem um melhor aumento na susceptibilidade para hidrólise enzimática (Sun & Cheng 2002). Aproximadamente 50% da lignina e principalmente hemicelulose são solubilizadas por 2% de  $H_2O_2$  a 30°C por 8h, e com eficiência de 95% de produção de glicose a partir de celulose pela celulase a 45°C durante 24h (Azzam, 1989).

Vários métodos de hidrólise de materiais lignocelulósicos para produção de etanol têm sido descritos (Olsson & Hahn-Hagerdal, 1996). A hidrólise com ácido diluído é rápida e de fácil performance, porém não seletiva na formação dos produtos (Fan et al., 1982). Normalmente, a hidrólise com ácido diluído usa  $H_2SO_4$  ou HCl a uma temperatura entre 120°C e 200°C (Grethlein & Converse, 1991; Torget & Hsu, 1994). A produção de etanol

obtida pela hidrólise com ácido diluído e fermentação é apenas 50-60% dos valores teóricos (Wyman, 1994).

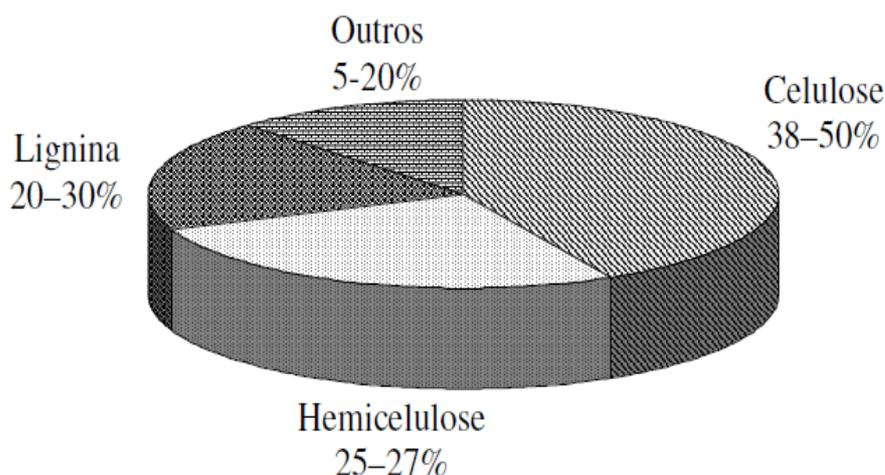
A hidrólise enzimática da celulose é feita usando enzimas celulolíticas. A celulase é composta de endo- $\beta$ -1,4-glucohidrolase, exo- $\beta$ -1,4-glucocelobiohidrolase (celulases) e  $\beta$ -glicosidase (Parisi, 1989). A celulase quebra a celulose e a celobiose, a qual é subsequente quebrada a glicose pela  $\beta$ -glicosidase. A celulase e a  $\beta$ -glicosidase são inibidas pela celobiose e glicose, respectivamente (Philippidis et al., 1993). Produtos inibidores das enzimas diminuem a eficiência da hidrólise.

Na hidrólise enzimática há maior produção de monossacarídeos do que na hidrólise com ácido diluído, porque a celulase catalisa somente as reações de hidrólise e não reações de degradação de açúcares (Parisi, 1992).

Os resíduos lignocelulósicos são uma grande alternativa para a geração de energia, devido a sua grande disponibilidade na natureza. Atualmente, os maiores usos da lignocelulose concentram-se nas polpas e indústrias de papel, proteína para ração, em meios tecnológicos de alimentação, além de poderem gerar energia através da produção de etanol (Ballesteros, 2001).

### **2.1.2. Composição química dos materiais lignocelulósicos**

A biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose e lignina, pectina além de pequenas quantidades de outros componentes. Estes constituintes possuem características químicas semelhantes à madeira, que são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento (Fengel e Wegener, 1989). A composição média de materiais lignocelulósicos pode ser vista na Figura 2.1. Conforme se observa nessa figura, embora a quantidade de celulose seja predominante, observa-se uma considerável quantidade de hemicelulose e lignina.



**Figura 2.1.** Composição média dos materiais lignocelulósicos (Fengel e Wegener, 1989)

Foi realizado um estudo prévio de caracterização dos bagaços de pedúnculo de caju e de casca de coco (Guedes, 2010). As tabelas abaixo indicam o percentual de compostos de extraíveis para os dois tipos de bagaço. Foram utilizados bagaços de pedúnculo de caju e casca de coco sem tratamento e pré-tratados.

### 2.1.2.1. Composição dos resíduos dos bagaços pedúnculo de caju e casca de coco

Tabela 2.1- Percentual de compostos extraíveis dos bagaços do pedúnculo de caju e casca de coco sem tratamento e pré-tratados.

<b>Bagaço</b>	<b>Sem tratamento (%)</b>	<b>Pré-tratado com NaOH 1M (%)</b>	<b>Oxidação Úmida (%)</b>	<b>Pré-tratamento combinado (%)</b>
Pedúnculo de caju	6,21 ± 1,10	3,31 ± 0,65	3,22 ± 0,76	3,09 ± 0,61
Casca de coco	2,22 ± 0,26	0,81 ± 0,10	0,66 ± 0,22%	0,50 ± 0,38

Fonte: (Guedes, 2010).

Tabela 2.2-Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis dos bagaços de pedúnculo de caju sem tratamento e pré-tratados .

<b>Componente</b>	<b>Bagaço sem tratamento (%)</b>	<b>Pré-tratado com NaOH 1M (%)</b>	<b>Oxidação Úmida (%)</b>	<b>Pré-tratamento combinado (%)</b>
Glicose	21,65 ± 11,15	44,95 ± 2,52	25,71 ± 2,63	37,05 ± 1,72
Xilose	8,29 ± 2,42	11,66 ± 0,22	9,01 ± 0,24	11,49 ± 0,24
Arabinose	2,78 ± 0,84	2,56 ± 0,08	2,57 ± 0,27	3,69 ± 0,16
Ác. Acético	0,48 ± 0,10	0,15 ± 0,01	0,41 ± 0,08	0,13 ± 0,02
Ác. Fórmico	0,79 ± 0,23	0,77 ± 0,13	0,64 ± 0,01	1,58 ± 0,80
Lignina total	30,75 ± 1,95	17,25 ± 0,53	39,76 ± 0,56	24,64 ± 2,41
Furfural	1,83 ± 0,04	1,95 ± 0,02	–	–
Cinzas	0,77 ± 0,36	2,75 ± 0,41	1,28 ± 0,59	2,04 ± 1,03
Pectina	4,30 ± 0,35	3,75 ± 1,06	3,13 ± 0,31	1,44 ± 0,50
<b>Total</b>	<b>71,64</b>	<b>85,79</b>	<b>82,51</b>	<b>82,06</b>

Fonte: (Guedes, 2010).

Tabela 2.3- Percentual mássico dos componentes constituintes das amostras secas e livres de extraíveis dos bagaços de coco sem tratamento e pré-tratados

Componente	Bagaço sem tratamento (%)	Pré-tratado com NaOH 1M (%)	Oxidação Úmida (%)	Pré-tratamento combinado (%)
Glicose	21,28 ± 1,72	47,31 ± 5,85	28,03 ± 0,35	37,30 ± 6,79
Xilose	9,60 ± 0,97	16,36 ± 5,59	15,03 ± 0,10	15,77 ± 0,69
Arabinose	1,70 ± 0,05	1,22 ± 0,37	0,84 ± 0,07	0,17 ± 0,01
Ácido acético	0,76 ± 0,07	0,96 ± 0,30	1,11 ± 0,11	–
Ácido fórmico	1,49 ± 0,46	0,14 ± 0,02	0,96 ± 0,12	–
Lignina total	43,71 ± 0,50	29,26 ± 1,77	17,74 ± 0,49	18,73 ± 0,42
Furfural	2,02 ± 0,10	2,31 ± 0,26	–	–
Cinzas	2,27 ± 0,18	1,14 ± 0,03	2,95 ± 0,35	2,43 ± 0,4
Pectina	0,82 ± 0,15	0,60 ± 0,36	–	–
Total	83,65	99,30	66,66	74,40

Fonte (Guedes, 2010).

## 2.2. O Caju

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Na Amazônia tropical, as árvores apresentam porte bastante elevado; nos Estados do Nordeste brasileiro, a principal espécie de ocorrência é o *Anacardium occidentale* L., cujas árvores apresentam pequeno e médio porte, sendo a única espécie do gênero que é cultivada com finalidade comercial, enquanto que as demais espécies são exploradas apenas por extrativismo (Sancho, 2006).

O cajueiro é considerado uma das culturas de maior importância econômica do Nordeste, sendo cultivada principalmente nos Estados do Ceará (68%), Rio Grande do Norte (11%) e Piauí (8%) (Maia et al. 2001). Em nível mundial é cultivado em vários países, destacando-se pela produção Índia, Brasil, Moçambique e Tanzânia (Pertinari & Tarsitano, 2002).

Dentre as frutas cultivadas no Nordeste, o caju merece destaque tendo em vista sua importância sócio-econômica para o país, em função da exploração de quase 1 milhão de

hectares de cajueiros, que mobilizam no campo cerca de 280 mil pessoas e proporcionam uma produção de 217.062 toneladas de castanha e 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano (Oliveira & Andrade, 2004).

O caju é a mais importante cultura de sequeiro do Rio Grande do Norte e possui exploração auto-sustentável e de valor sócio-econômico. A área cultivada no Estado é superior a 120 mil hectares concentrando-se mais de 96% em propriedades de até 100 hectares, estabelecidas no extrato de agricultores familiares e pequenos produtores rurais. As exportações de amêndoas de castanha de caju alcançaram em 2004 um montante de 32,8 milhões de dólares posicionando-se como o terceiro produto agropecuário mais exportado.

É a castanha de caju que representa grande valor comercial tanto no Brasil como no exterior, desta forma, o pseudofruto ou pedúnculo acaba por ser subutilizado. Este, que apresenta cerca de 10 vezes o peso da castanha, representa uma quantidade enorme de matéria-prima perdida anualmente, valores que chegam a mais de 350 mil toneladas anuais no Estado do Rio Grande do Norte, que detém uma produção anual estimada em 441 mil toneladas de pedúnculo de caju (Sancho, 2006).

### **2.2.1. Composição dos componentes do caju e seus produtos.**

O caju compõe-se da castanha – o verdadeiro fruto – e de um pedúnculo hipertrofiado o pseudofruto. A castanha é um aquênio reniforme que corresponde a 10% do peso do caju. O peso de uma castanha pode variar desde 2g até 30g. A maioria das castanhas que chegam às indústrias apresenta um peso médio em torno de 7,0g. A castanha é constituída de três partes: casca, película e amêndoa. A casca, que representa de 65% a 70% do peso da castanha, é constituída por um epicarpo coriáceo, atravessado por um mesocarpo esponjoso, cujos alvéolos são preenchidos por um líquido cáustico e inflamável – o LCC ( líquido da casca da castanha). A película ou tegumento da amêndoa que representa cerca de 3% do peso da castanha é rica em tanino. A amêndoa da castanha de caju apresenta grande valor nutritivo. É considerada fonte de proteína de alta qualidade, rica em ácidos graxos poliinsaturados e altamente energéticos, rica em gorduras e carboidratos ( Oliveira & Andrade , 2004).

## **2.3. O Coqueiro**

O coqueiro (*Coccus nucifera* L.) é uma planta de grande importância socioeconômica, que além de produzir a água-de-coco, o albúmen sólido para indústria de alimentos e de óleos, gera ainda uma grande quantidade de subprodutos e resíduos.

O fruto do coqueiro é constituído por albúmen líquido (água-de-coco), albúmen sólido ou amêndoa, endocarpo conhecido popularmente como “Quenga” e casca. A casca representa em torno de 57% do fruto sendo composta pelo mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo (camada mais externa da casca).

A casca de coco é constituída por uma fração de fibras e outra fração denominada pó, que se apresenta agregada às fibras. O pó da casca de coco é o material residual do processamento da casca de coco maduro para obtenção da fibra longa. Atualmente, o resíduo ou pó da casca de coco maduro tem sido indicado como substrato agrícola, principalmente por apresentar uma estrutura física vantajosa proporcionando alta porosidade, alto potencial de retenção de umidade e por ser biodegradável. É um meio de cultivo 100% natural e indicado para germinação de sementes, propagação de plantas em viveiros e no cultivo de flores e hortaliças. Como o preço da turfa está cada vez mais elevado e as extratoras de turfas foram fechadas, o pó da casca de coco surge como uma das alternativas. (Apcc, 1996).

### **2.3.1. Composição do bagaço de coco**

#### **2.3.1.1. Bagaço de coco maduro**

Em geral, do peso total de um coco maduro, 65% correspondem à noz e seu conteúdo (albúmen sólido e água), enquanto os 35% restantes correspondem à parte fibrosa (casca), constituída por uma fração de fibras e uma fração denominada pó, que se apresenta agregada às fibras. Aragão (2002). Durante o processamento da casca de coco maduro para obtenção da fibra longa, há geração de um material residual, pó da casca de coco e fibras excessivamente curtas. Estima-se que para cada quilo de fibra produzida sejam gerados cerca de 2 kg de pó e fibras curtas (Apcc, 1996). Essa grande quantidade de resíduo se acumula nas proximidades das fábricas de fibras, ocupando terras produtivas e criando problemas ambientais. Nos últimos anos, tem-se percebido a utilização do resíduo de fibras como um substrato agrícola comercialmente competitivo. Sabe-se que tanto a origem do material quanto o processo

industrial aplicado em sua obtenção influenciam as características e as propriedades do produto final resultante Aragão (2002).

### **2.3.1.2. Bagaço da casca de Coco Verde.**

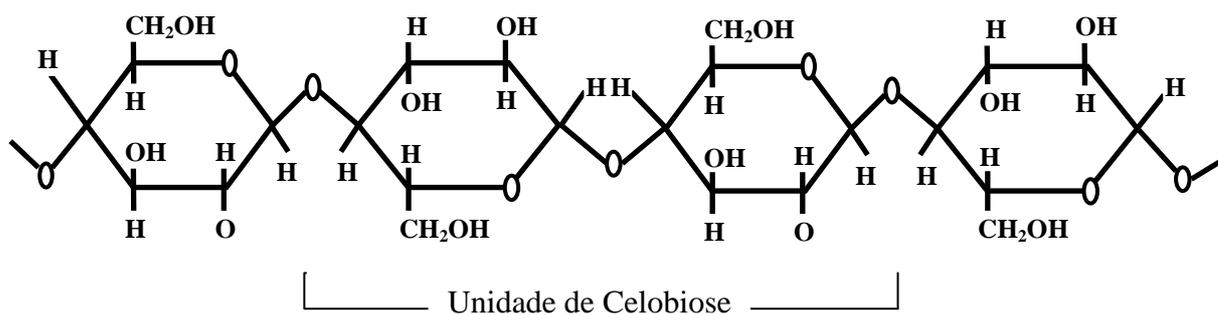
Diferentemente do coco maduro, as fibras do coco verde não são beneficiadas pela indústria de fibra e as cascas são inteiramente depositadas em lixões, aterros sanitários, bem como nos pátios das indústrias de processamento de água-de-coco. Nesse sentido, a Embrapa Agroindústria Tropical vem desenvolvendo pesquisa, buscando dar uma alternativa de aproveitamento à casca de coco verde. Por meio de uma seqüência de operações, incluindo etapas de dilaceração, moagem e secagem, é obtido um material possível de utilização como substrato (Projar, 1996).

A composição química da casca de coco varia amplamente, conforme a fonte, época do ano e quantidade de chuvas (Kampf & Fermino, 2000). Uma caracterização química do pó de coco verde foi realizada no Laboratório de Solos da Embrapa Agroindústria Tropical (SILVA, 1999). Foram determinados, também, o pH e a condutividade elétrica do material.

## **2.4- Celulose**

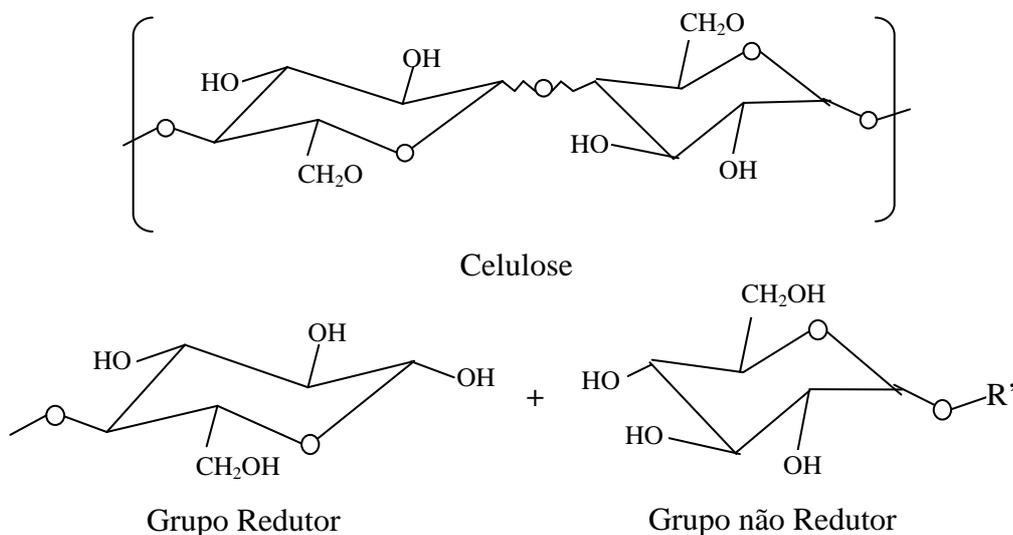
A celulose responde isoladamente por aproximadamente 40% de toda reserva de carbono disponível na biosfera. Está presente em todas as plantas desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99%.

A estrutura física e morfológica nativa da celulose é complexa, e os detalhes da estrutura são dificilmente determinados experimentalmente (O'SULLIVAN, 1997). Este polímero natural é um homopolissacarídeo linear cuja unidade repetitiva é a celobiose ou anidroglicose sindiotática (Figura 2.2) que é formada por anéis de  $\beta$ -Dglicopiranosose unidas por ligações do tipo  $\beta$  - D (1-4) glicosídicas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , proporcionando assim um crescimento linear da cadeia macromolecular levando a uma elevada massa molecular, considerável grau de cristalinidade, insolubilidade em água e estrutura rígida.



**Figura 2.2.** Estrutura da celulose, parte central da cadeia molecular (Fengel & Wegener, 1989).

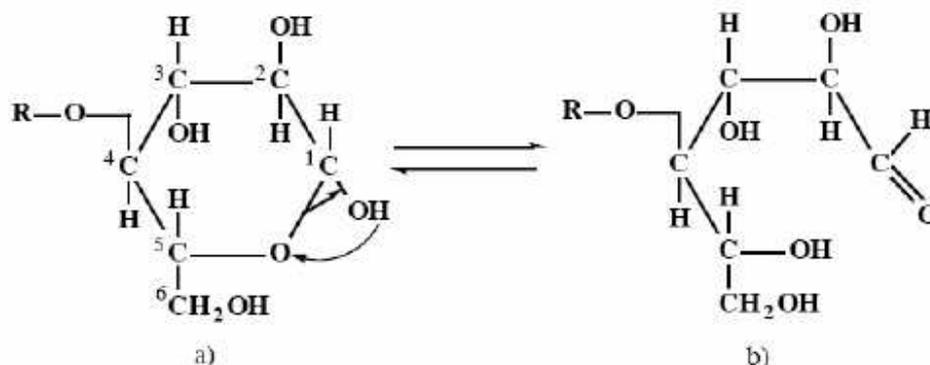
O comprimento da cadeia varia entre 100 a 14000 resíduos conforme a origem da celulose. Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais redutoras e não redutoras (Figura 2.3) que, após hidrólises mais extensas, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.



**Figura 2.3.** Reações de hidrólise da celulose. R e R' são as semicadeias do polímero de celulose. A ligação em zig-zag representa a ligação  $\beta$ -D (1,4) glicosídica.

A cada quebra da ligação  $\beta$ -D (1,4) glicosídica há a formação de uma cadeia redutora e outra não redutora. Apesar das duas extremidades da cadeia serem grupos hidroxílicos, o grupo C1-OH terminal da cadeia redutora é um grupo aldeído hidratado, derivado da

formação do anel piranose por ligação intramolecular hemiacetal (Figura 2.4). Este grupo tem poder redutor, ao contrário do grupo alcoólico C4–OH terminal (grupo não redutor).



**Figura 2.4.** Representação do hemiacetal (a) e do aldeído (b) do grupo terminal redutor. R é a semicadeia do polímero de celulose.

Apesar da sua simplicidade química, a diversidade de origem e dos processamentos tecnológicos subsequentes a que a biomassa celulósica é sujeita conduz a uma complexa gama de formas físicas de celulose. A descrição destes substratos inclui propriedades como o tamanho, a forma, a porosidade, o grau de polimerização, a área superficial, a associação com compostos não celulósicos, a conformação molecular e cristalinidade, sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (Beguin & Aubert, 1994).

As estruturas da celulose podem ser definidas em termos de três níveis organizacionais (Atalla *et al.*, 1993). O primeiro é definido pela seqüência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de anidroglicose com ligações  $\beta$ -D (1,4). O segundo nível descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intramoleculares. O terceiro nível define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina.

Muitos estudos sobre a hidrólise enzimática consideram a existência da celulose nativa em duas formas extremas: amorfa e cristalina. As duas formas ocorrem em proporções características em celulosos de diferentes origens, e o ataque enzimático pode ser preferencial num dos tipos de estrutura (Gama, 1996).

As moléculas de celulose tendem a formar ligações hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose da mesma molécula) e intermoleculares (entre unidades de glicose de moléculas adjacentes). O primeiro tipo de interação é responsável por certa rigidez das

cadeias unitárias e o segundo pela formação da fibra vegetal (Fengel & Wegener, 1989). Devido às suas fortes ligações de hidrogênio, a celulose é praticamente insolúvel em água e em solventes orgânicos comuns (Hon, 1996).

As fibras de celulose, quando colocadas em contato com a água e certos solventes orgânicos, sofrem intumescimento. A extensão do intumescimento da celulose pode ser intercrystalino ou intracrystalino. No primeiro caso o agente intumescedor penetra nas regiões desordenadas (amorfas) da microfibrila de celulose e nos espaços entre elas. O caso mais comum de intumescimento intercrystalino é o inchamento da celulose em água. No segundo caso o agente intumescedor penetra nas regiões ordenadas (cristalinas) das microfibrilas. O intumescimento intracrystalino pode ser efetuado pelo uso de soluções concentradas de ácidos e bases fortes e de soluções de alguns sais (D.Almeida, 1988).

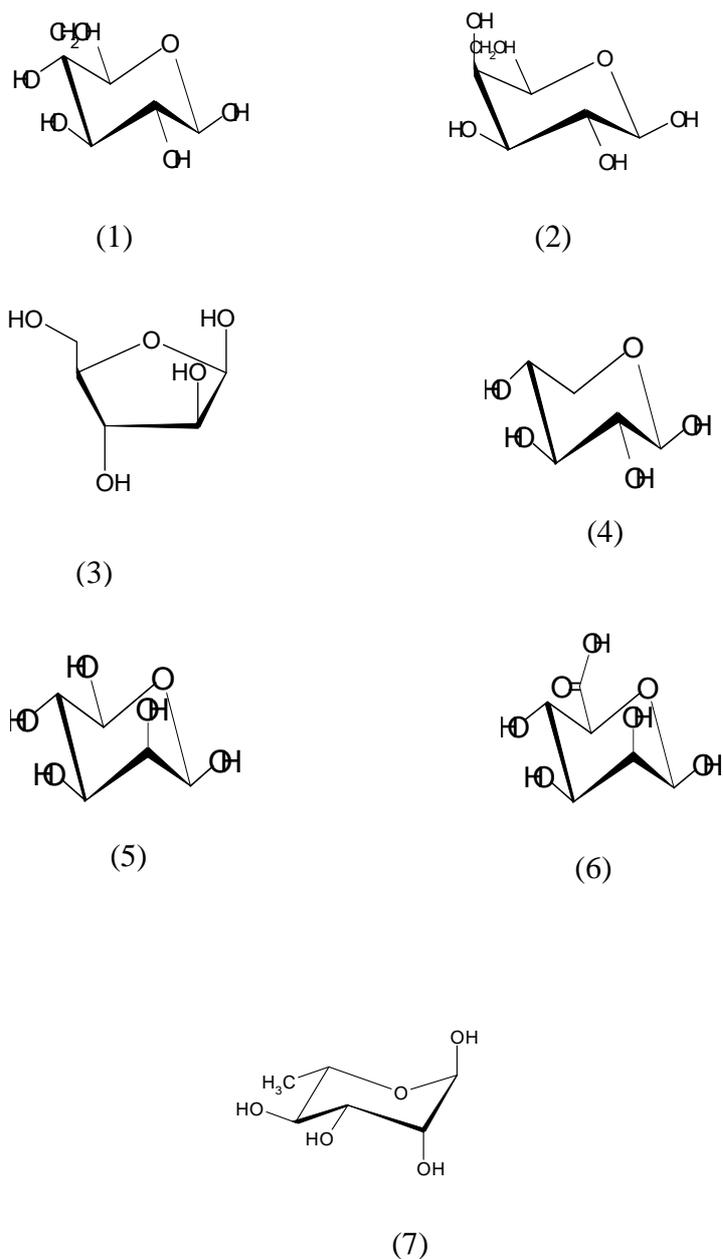
A principal vantagem da celulose, como fonte de energia, quando comparada com derivados de petróleo, por exemplo, é sua grande disponibilidade, uma vez que ela provém de matéria-prima renovável.

## **2.5- Hemicelulose**

As hemiceluloses, também chamada de polioses, estão intimamente associadas à celulose na parede da célula vegetal e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas (Fengel & Wegener, 1989). As estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses são mostrados na Figura 2.5.

Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de vegetais.

As hemiceluloses apresentam-se na forma de homopolímeros como, por exemplo, a xilana, formada por xiloses ou heteropolímeros como, por exemplo, a glico-manana formada por glicose e manose. As madeiras moles (coníferas) apresentam maior proporção de galactoglico-mananas do que de xilanas, enquanto as madeiras duras (folhosas) são ricas em xilanas. O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais é bastante variável, com um valor médio de 20% .(Sjostrom, 1992).

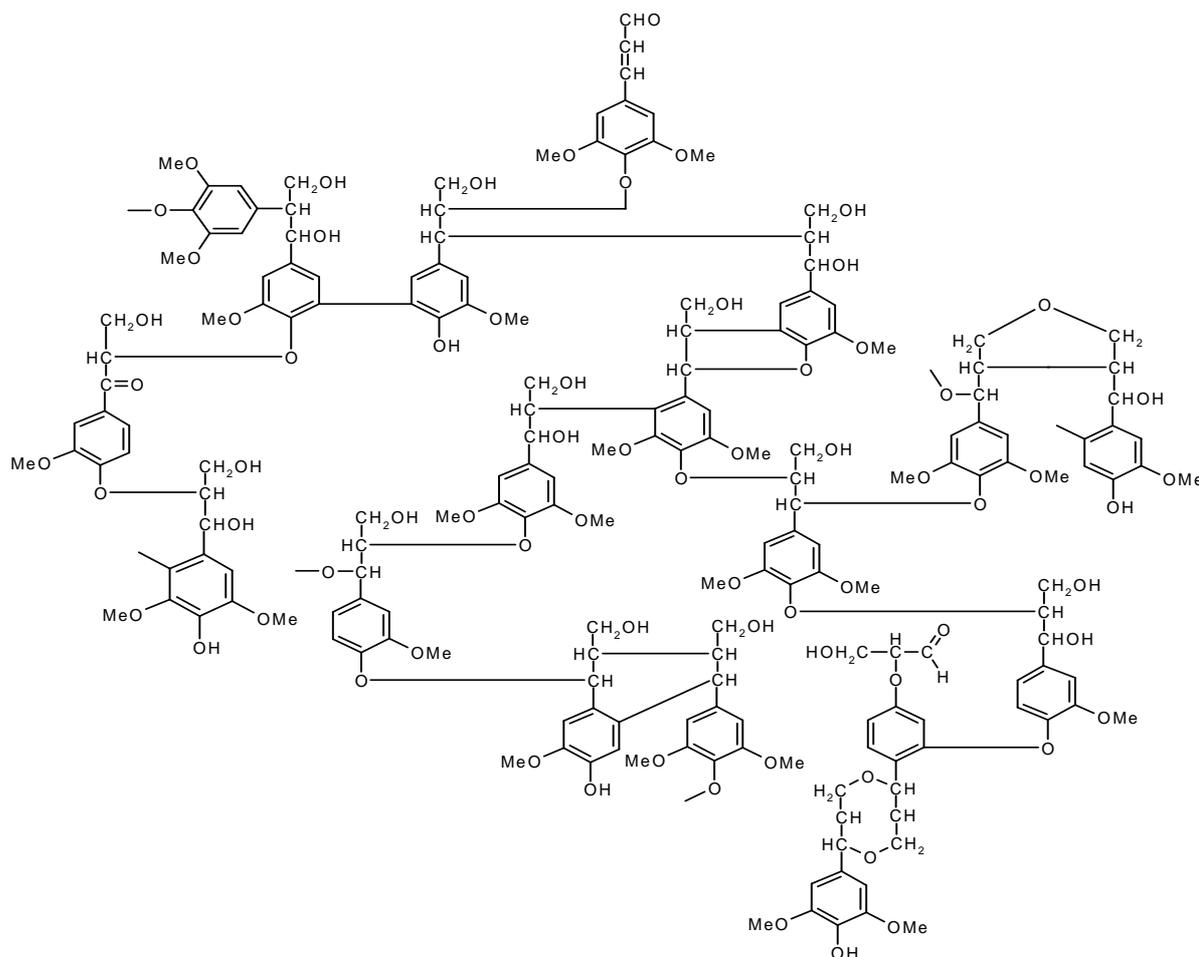


**Figura. 2.5.** Estrutura dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (Sjostrom, 1992).

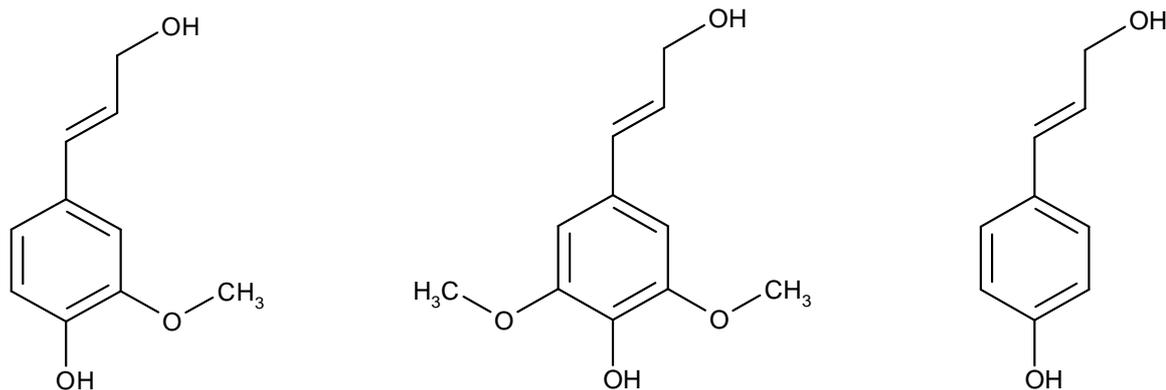
## 2.6- Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa (Figura 2.7). A lignina representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. (Dence & Lin, 1992)

O acoplamento das unidades fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo da biossíntese da lignina. Esta se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores: álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura.2.8), que geram unidades p-hidroxibenzílicas guaiacílicas e siringílicas, respectivamente.



**Figura 2.6.** Estrutura da lignina de abeto (*Picea abies*) proposta por Adler (Fengel & Wegener, 1989).



Álcool Coniferílico (G)

Álcool Sinapílico (S)

Álcool *p*-Cumárico (H)

**Figura 2.7:** Estrutura dos álcoois precursores da lignina (Sojostrom, 1992).

## 2.7- Pectina

A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído principalmente de ácido galacturônico, ramnose arabinose e galactose. É um dos principais componentes da parede celular das plantas e o principal componente da lamela média.

A pectina é um ácido poligacturônico parcialmente esterificado com grupos metoxila.

A pectina com alto grau de metoxilação tem DM maior que 0.5. Em altas concentrações de açúcar, tanto as pectinas de alta quanto as de baixa metoxilação podem formar gel, mas se a concentração de açúcar é baixa, apenas as de baixa metoxilação formam gel e, ainda, somente na presença de certos cátions, sendo o cálcio o mais utilizado. (Fengel & Wegener, 1989).

## 2.8- Outros componentes: extrativos.

Ramos (2003) observou que os componentes de menor massa molar presentes na fitobiomassa incluem uma variedade de compostos orgânicos, cuja presença relativa é governada por uma série de fatores, entre os quais os de natureza genética e climática. Esses componentes não residem na parede celular da planta e dividem-se, basicamente, em duas classes. A primeira classe engloba materiais conhecidos como extrativos por serem solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor. A segunda classe engloba

materiais que não são comumente extraíveis com os agentes mencionados, como, por exemplo, compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécicas (Pitarelo, 2003).

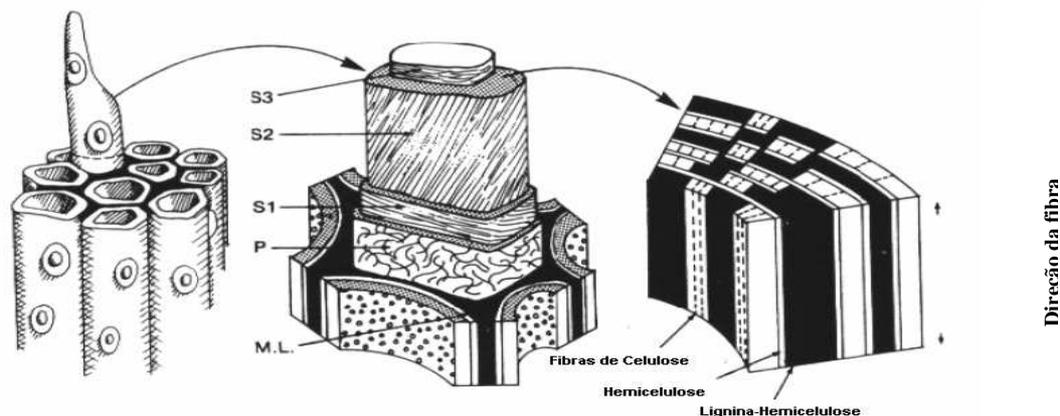
## **2.9-Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal**

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em parede primária (P), parede secundária (S1, S2 e S3) e parede terciária (T). Essas camadas (P, S1, S2, S3 e T) são compostas predominantemente por celulose com espessura da ordem de 5  $\mu\text{m}$  e as células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina (máximo 1  $\mu\text{m}$  de espessura), composta por elevada concentração de lignina. A parede primária (P) é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células (menor do que 0,1  $\mu\text{m}$  de espessura) (Fengel & Wegener, 1989).

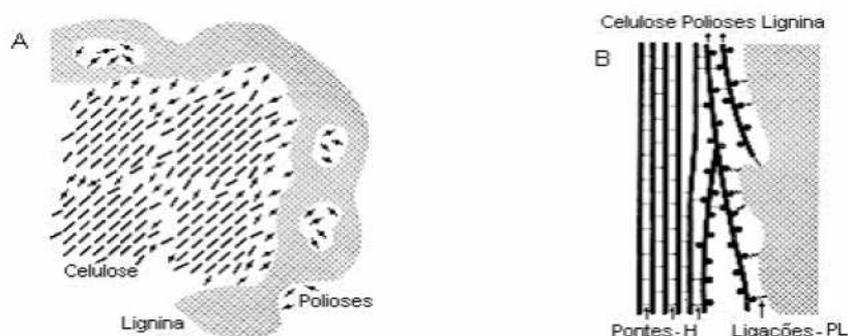
A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina variam consideravelmente entre essas camadas (Fengel & Wegener, 1989).

A Figura 2.9 mostra as várias camadas da parede celular e ilustra como a lignina envolve as células.

A Figura 2.10 apresenta o esquema da associação dos três principais componentes na parede celular vegetal: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose existe na forma de microfibrilas, e os microcapilares que circundam a armação da parede celular são preenchidos com hemicelulose e lignina. A Figura 2.10 (A) mostra a vista transversal, isso ocorre quando a seção é perpendicular ao eixo longitudinal da fibra e a Figura 10 (B) mostra a vista longitudinal em relação ao comprimento da fibra (Fengel & Wegener, 1989).



**Figura 2.8.** Ilustração esquemática morfológica da célula, parede secundária e a relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. Diâmetro da célula de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . S1-S3, paredes secundárias da célula; P, parede primária; M.L., lamela média (Kirk & Culler, 1998).



**Figura 2.9.** Esquema da associação celulose-hemicelulose-lignina na parede celular vegetal: (A) vista transversal e (B) vista longitudinal (Fengel & Wegener, 1989). Ligações-PL, ligações poliose – lignina.

A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio as microfibrilas da celulose, dando assim forma a uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença da lignina em algumas paredes celulares dá uma força adicional, e fornece a resistência às pestes e às doenças. A celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis (Hinman *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1998; Taherzadeh *et al.*, 1999; Sreenath e Jeffries, 2000). A presença da lignina na parede celular, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos carboidratos.

## 2.10. Hidrólise

Para as celulases, enzimas envolvidas na hidrólise enzimática de biomassas de origem vegetal, ainda está reservada uma função de grande importância biotecnológica, a qual deverá utilizar anualmente muitas toneladas destas enzimas. Trata-se da hidrólise de biomassa vegetal presente em resíduos lignocelulósicos da agricultura, com a finalidade de obter xaropes de açúcares fermentescíveis. Esta aplicação é de grande importância para os países de base agroindustriais, visto que poderiam aumentar o rendimento econômico de suas culturas, sem a expansão da área plantada.

Existem basicamente três técnicas para a obtenção de açúcares fermentescíveis provenientes de materiais lignocelulósicos: hidrólise com ácido concentrado, hidrólise com ácidos diluídos e hidrólise enzimática.

Na hidrólise com ácido concentrado, a hemicelulose e celulose presentes na biomassa são quebradas usando soluções aquosas de ácidos minerais fortes, tais como ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico, em baixas temperaturas (<100°C). A principal desvantagem dessa técnica é que requer equipamentos altamente resistentes à corrosão, aumentando assim o custo do produto. Tipicamente, a fração de hemicelulose é hidrolisada mais rapidamente que a fração de celulose, e os monossacarídeos liberados da hemicelulose são expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva a degradação e perda desses açúcares. A recuperação do ácido usado no processo é essencial por razões econômicas e devido a problemas ambientais (Szengyel, 2000).

No processo com ácido diluído, parte da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. A hemicelulose hidrolisada pode ser removida após o primeiro passo da hidrólise. Desta forma, as condições de hidrólise tanto para a hemicelulose quanto para a celulose podem ser otimizadas. Porém, devido às altas temperaturas aplicadas no segundo passo (aproximadamente 200°C), uma quantidade considerável de açúcares e lignina solúvel são degradadas levando a uma inibição durante o processo de fermentação (Clark & Mackei, 1984; Wyman, 1994; Larsson *et al.*, 1998).

No processo enzimático, a biomassa lignocelulósica é primeiramente pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque enzimático. Durante o pré-tratamento, a hemicelulose é hidrolisada em um processo similar ao primeiro passo da hidrólise com ácido diluído. No segundo passo, a hidrólise propriamente dita, a celulose é quebrada através das enzimas celulases. Devido a condições mais suaves aplicadas durante o processo, uma menor

quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis. Porém, para atingir uma alta conversão da celulose é necessário altas concentrações da enzima, o que aumenta o custo de produção (Eklund *et al.*, 1990).

As condições de cada processo e os seus desempenhos aproximados são mostrados na Tabela 2.4.

**Tabela 2.4:** Comparação das condições e desempenho dos três processos de hidrólise (Hamelinck *et al.*, 2005).

---

	<b>Consumo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Rendimento de Glicose</b>
Ácido diluído	<1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	215	3 min	50-70%
Ácido Concentrado	30-70% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40	2-6 h	90%
Enzimática	celulase	70	1,5 dias	75-95%

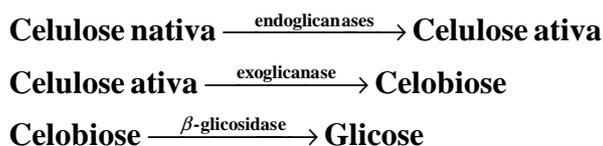
---

### 2.10.1 - Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática da celulose é realizada pelas enzimas celulases, as quais são altamente específicas. O produto da hidrólise são usualmente açúcares redutores, incluindo a glicose. O custo da hidrólise enzimática é muitas vezes baixo se comparado com a hidrólise ácida porque a hidrólise é usualmente conduzida em condições suaves (pH 4,8; e temperatura 45-50°C), além de não apresentar problemas de corrosão nos equipamentos (Duff & Murray, 1996).

Ao contrário dos catalisadores comuns, as enzimas apresentam uma elevada especificidade em relação ao substrato e sua utilização reduz a obtenção de subprodutos indesejáveis na reação, diminuindo assim os custos de separação dos produtos, bem como os problemas de tratamento de efluente (Segel, 1975). No caso da hidrólise enzimática, a especificidade da enzima evita ainda que ocorra degradação da glicose, o que pode ocorrer na hidrólise ácida (Contiero, 1992).

Ao longo dos anos, vários mecanismos diferentes foram propostos para a conversão de celulose a glicose. Petterson *et al.* (1978) descreveram um esquema hipotético para a degradação da celulose em 3 etapas:



O rendimento da hidrólise é governado por muitos fatores, tais como: tipo de pré-tratamento do substrato, inibição da atividade enzimática pelos produtos finais da biodegradação, termoestabilidade das enzimas, concentração e adsorção do substrato, tempo de duração da hidrólise, pH do meio, concentração de substrato no meio e taxa de agitação. Conseqüentemente é necessário otimizar as condições de hidrólise para conseguir o funcionamento satisfatório dos processos de sacarificação (Vallander & Eriksson, 1985).

Ao se efetuar uma comparação entre os processos de hidrólise pode-se perceber que a hidrólise enzimática conduz a rendimentos mais elevados de monossacarídeos do que a hidrólise ácida, porque as enzimas celulasas catalisam somente as reações de hidrólise e não as reações da degradação do açúcar (Parisi, 1989).

Alguns autores vêm mostrando a eficiência da hidrólise enzimática em relação à hidrólise ácida. Segundo Krishna et al. (1998), aproximadamente 75 e 65% da sacarificação foram conseguidas com 7,5% (p/p) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e HCl, respectivamente, a 15 psi em 45 minutos. No caso da hidrólise enzimática, o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar foi essencial, mas altas pressões não foram requeridas. O hidrolisado enzimático apresentou uma conversão de 92% do substrato quando usado no bagaço o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino a 2,5% (p/v). A formação dos açúcares foi conseguida a 50°C e pH 4,5, usando celulase de *T. reesei* com 40 FPU/g substrato em 48 h. A produção de álcool foi mais elevada realizando a fermentação do hidrolisado enzimático do que do hidrolisado ácido.

Embora os processos de hidrólise ácida estejam mais desenvolvidos tecnologicamente e tenham maiores chances de se tornarem economicamente viáveis em um futuro próximo, espera-se que os processos enzimáticos tenham seus custos bastante reduzidos com o avanço da tecnologia envolvida e venham a ser a melhor opção no futuro (Rabelo, 2007).

### 2.10.1.1 - As enzimas celulases

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (Bayer e Lamed, 1992). A degradação microbiana da celulose é total e específica, e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem (Lynch *et al.* 1981).

A celulase refere-se a uma classe de enzimas que são produzidas essencialmente por fungos, bactérias e protozoários e catalisam a hidrólise da celulose. As celulases surgiram como subprodutos da Segunda Guerra Mundial. Preocupados com o excessivo desgaste de roupas e equipamentos nas selvas do Pacífico Sul, em 1944, militares norte-americanos recolheram amostras de microrganismos suspeitos de serem os responsáveis pelo prejuízo e as levaram ao laboratório de pesquisas do exército, em Natick, Massachusetts. De milhares de amostras, uma, recolhida na Nova Guiné, mostrou conter um fungo – *Trichoderma viride* (atualmente denominado *T. reesei*, em homenagem ao seu descobridor, Elwyn Reese) – capaz de converter celulose em seus monômeros (Ereno, 2007; Hassuani, 2005; Fengel & Wegener, 1989). O fungo só voltou a despertar interesse na década de 60, quando se descobriu que preparados de enzimas extracelulares eram responsáveis pela ação hidrolítica. A idéia de aproveitar essas enzimas na conversão de resíduos celulósicos em produtos de interesse alimentar e energético surgiu em 1973, e em 1979, a equipe de Natick anunciava o isolamento de cepas mutantes de *T. reesei* com poder hidrolítico vinte vezes superior ao da cepa nativa.

A hidrólise da celulose por celulases resulta na produção final de glicose. As celulases porém, por serem proteínas, não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui o principal problema para desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann *et al.*, 1980). Logo, a necessidade do pré-tratamento antes da etapa da hidrólise é de suma importância.

As enzimas celulases representam um fator relevante durante o processo de hidrólise, já que estas apresentam alto custo. Dentre os vários meios de reduzir os custos da produção das celulases, uma opção seria incluir tentativas de reciclá-las e recuperá-las do hidrolisado da celulose (Ramos *et al.*, 1993a), imobilização (Rogalski *et al.*, 1985; Woodward, 1989) ou o uso de métodos mais eficazes de cultivo dos microrganismos para a síntese destas enzimas, tais como culturas em batelada alimentada (Persson *et al.*, 1991) ou fermentação sólida (Rouso *et al.*, 1993).

Os fungos são os principais microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas (Menezes, 1997) e os principais celulolíticos produtores de celulasas e xilanases incluem: *Trichoderma reesei* (também denominado *Trichoderma viride*), *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Sporotrichum pulverulentum* (também denominado *Chrysosporium lignorum*), *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Aspergillus* sp, *Schizophyllum* sp, *Chaetomium* sp (Bisaria & Ghose, 1981) e *Humicola* sp (Da Silva et al., 1994). Algumas leveduras como as do gênero *Trichosporium* sp também são produtoras de xilanases e celulasas, assim como diversas espécies de *Aspergillus* produzem altos níveis de  $\beta$ -glicosidase (Stevens & Payne, 1977).

Uma das possibilidades na degradação de materiais lignocelulolíticos é o uso de microrganismos que produzem enzimas específicas que hidrolisam a celulose, como a avicelase, carboximetilcelulase e  $\beta$ -glicosidase (Celulasas) enzimas que atuam sobre a porção celulósica, as xilanases, mananases, glucanases e galactanases (Hemicelulasas) que atuam sobre a porção hemicelulósica e as enzimas oxidativas como a lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase, definidas como fenoloxidasas, que atuam sobre a lignina (Tuor et al., 1995; Wood & Garcia-Campayo, 1990).

A existência de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos é de grande interesse para a biorremediação, sendo os fungos de decomposição branca um dos grupos que tem obtido maior notoriedade em estudos relacionados a esta área (Chandra & Rustgi, 1998). Os fungos de podridão branca, ou seja, os degradadores de lignina, têm obtido crescente êxito em pesquisas relacionadas a biodegradação de poluentes, pois estes são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos através da ação de suas enzimas extracelulares (Clemente, 2002).

#### **2.10.1.2 - Modo de ação das celulasas: sinergismo.**

Apesar das discordâncias apresentadas por alguns autores, relacionadas com a especificidade das diferentes celulasas e o seu modo de ação, é geralmente reconhecida a existência de três tipos de celulasas nos sistemas completos: endoglicanases, exoglicanases ou celobiohidrolases e  $\beta$ -glicosidase ou celobiase (Gan et al., 2003).

As moléculas de celulose são lineares e associam-se umas as outras formando feixes fibrosos. Estes feixes apresentam duas regiões bastante distintas: uma região bastante

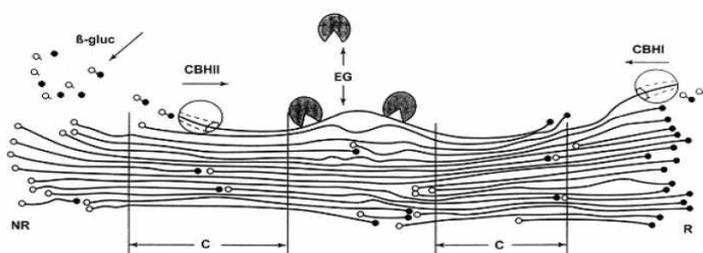
organizada apresentando grandes quantidades de ligações de hidrogênio, chamada de região cristalina, dificultando bastante o processo de hidrólise, e outra completamente desorganizada, chamada de amorfa (Figura 2.11). Cada tipo de celulase acaba atacando preferencialmente uma região específica da celulose.

As endoglicanases (EGs, E.C. 3.2.1.4) hidrolisam preferencialmente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo oligossacarídeos de menor peso molecular, chamados de celodextrinas, além de celobiose, resultando em uma rápida diminuição da viscosidade e aumento relativamente pequeno do poder redutor (Wood, 1989; Heikinheimo, 2002). A região catalítica da enzima é dada pela forma que permite a ligação da enzima e a hidrólise na parte média da fibra da celulose (Divne et al., 1994). Assim, as endoglicanases atacam de forma mais ou menos aleatória as ligações  $\beta$ -(1-4)- glicosídicas em regiões amorfas da celulose ou na superfície das microfibrilas.

As exoglicanases ou celobiohidrolases (CBHs, E.C. 3.2.1.91) iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose. CBH I e CBH II quebram as unidades de celobiose das extremidades redutora e não redutora do polímero, respectivamente. Logo, as exoglicanases liberam a celobiose rompendo as ligações  $\beta$ -(1-4)-glicosídicas (Heikinheimo, 2002).

As celobiasas ou  $\beta$ -glicosidades (E.C. 3.2.1.21) completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glicose. Portanto, as celobiasas hidrolisam a celobiose e as celodextrinas solúveis em água à glicose.

A Figura 2.10 mostra uma representação esquemática da hidrólise da celulose e a ação das endoglicanases, exoglicanases e  $\beta$ -glicosidades de *Trichoderma reesei*.



**Figura 2.10:** Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e  $\beta$ -glicosidades ( $\beta$ -gluc) de *Trichoderma reesei*. C define a região altamente ordenada (região cristalina), R os grupos terminais redutores (círculos preenchidos), e NR os grupos terminais não redutores (círculos não-preenchidos). EGs ataca as estruturas mais desordenadas da celulose. A ação da  $\beta$ -glicosidase produz a glicose (Rabelo, 2007).

Dusterhoft et al. (1993) mostraram que, embora a composição do complexo enzimático influencie na extensão da solubilização, os fatores limitantes da hidrólise são: os tipos de açúcares liberados, o local do ataque enzimático dentro do polímero e a acessibilidade do substrato.

A celulose cristalina é altamente resistente ao ataque enzimático. A maioria das ligações glicosídicas na microfibrila são inacessíveis às enzimas, e todas as ligações clivadas pela ação das endoglicanases podem prontamente ser reformadas devido à orientação estável das ligações glicosídicas. Conseqüentemente, a degradação da celulose cristalina requer a ação sinérgica da endoglicanase e exoglicanase. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exoglicanases na mistura e depende do tipo de substrato usado (Reinikainen, 1994).

As exoglicanases removem rapidamente as unidades de celobiose das extremidades recentemente criadas pela ação das endoglicanases, impedindo assim a reformação das ligações glicosídicas. As duas enzimas podem agir consecutivamente ou em harmonia. As exo e endoglicanases são inibidas pela celobiose, e a ação da  $\beta$ -glicosidade é freqüentemente a etapa limitante na degradação da celulose (Lee, 1997).

O efeito do complexo da enzima celulase é expresso pela ação sinérgica destas três enzimas diferentes na celulose e este sistema complexo de enzimas necessita ser mantido estável para a atividade celulolítica elevada. Em conseqüência da ação dos primeiros dois grupos de enzimas (endo e exoglicanases) na celulose, a celobiose e a glicose são obtidas, e enquanto sua concentração no meio reacional aumenta gradualmente, as atividades das celulases respectivas são inibidas por estes produtos, tendo por resultado uma diminuição final na taxa e no rendimento do processo de sacarificação. A celobiose apresenta um poder de inibição maior no complexo celulolítico sendo mais expressivo que a inibição por glicose (Rabelo, 2007).

O mercado atual oferece muitos complexos de celulase que contêm níveis baixos de  $\beta$ -glicosidase, conduzindo a um aumento do acúmulo de celobiose nos hidrolisados enzimáticos de celulose. Já que a celobiose apresenta um poder inibidor mais forte do que a glicose, e sua hidrólise ocorre através da ação das enzimas  $\beta$ -glicosidases, é indicado que se adicione no meio reacional uma certa quantidade desta enzima proveniente de outras fontes de complexos enzimáticos. Desta forma há uma diminuição da concentração de celobiose no meio reacional, ocasionando diminuição da inibição e aumento na eficiência da hidrólise enzimática (Sun e Cheng, 2002).

A produção da  $\beta$ -glicosidade é altamente dependente das condições da cultura, sendo que um relativo aumento do pH pode aumentar a produção de  $\beta$ -glicosidade pelos microrganismos. Alguns autores sugerem que *T. reesei* produz mais de um tipo de  $\beta$ -glicosidade e que esta tem uma importante função indutora na formação da endo e exoglicanase (Kubicek & Penttila, 1998).

O padrão de inibição das enzimas celulasas tem sido objeto de vários estudos. Alguns autores sugerem que a inibição competitiva é dominante, outros que a inibição não-competitiva é observada, enquanto outros ainda reportam uma combinação de ambas (Gan *et al.*, 2003).

### **2.10.1.3 – Mecanismos de Síntese de Enzima**

Existem enzimas chamadas de enzimas constitutivas, cuja síntese ocorre independentemente do substrato empregado. Ao lado destas existem as enzimas chamadas indutivas, cuja síntese é bastante incrementada quando o substrato da enzima está presente no meio de cultura. Para estas últimas não significa que nenhuma síntese ocorre na ausência do substrato, mas que a velocidade da síntese é aumentada na presença do indutor (substrato ou sub-produto da reação enzimática, ou ainda um análogo ao substrato).

Exemplos de enzimas indutivas (ou de indução), são aquelas responsáveis pela hidrólise de polissacarídeo, caso em que se entenda perfeitamente a necessidade da célula manter certo nível de síntese, pois um polímero de alta massa molecular não consegue passar através da membrana celular, mas uma vez hidrolisado parcialmente a compostos de menor massa molecular esta passagem se torna possível, ocorrendo então o efeito indutivo.

A síntese de enzimas conta ainda com a retro inibição e a retro repressão. A retro inibição significa a inibição de uma certa enzima, de uma seqüência metabólica (normalmente a primeira), pelo metabolismo final desta seqüência. Trata-se, portanto, da inibição da ação de uma enzima, com a conseqüente diminuição da concentração dos compostos seguintes, que causam a indução das correspondentes enzimas.

A retro- repressão é o fenômeno da repressão direta da síntese das enzimas responsáveis pela seqüência de reações, causada pelo produto final.

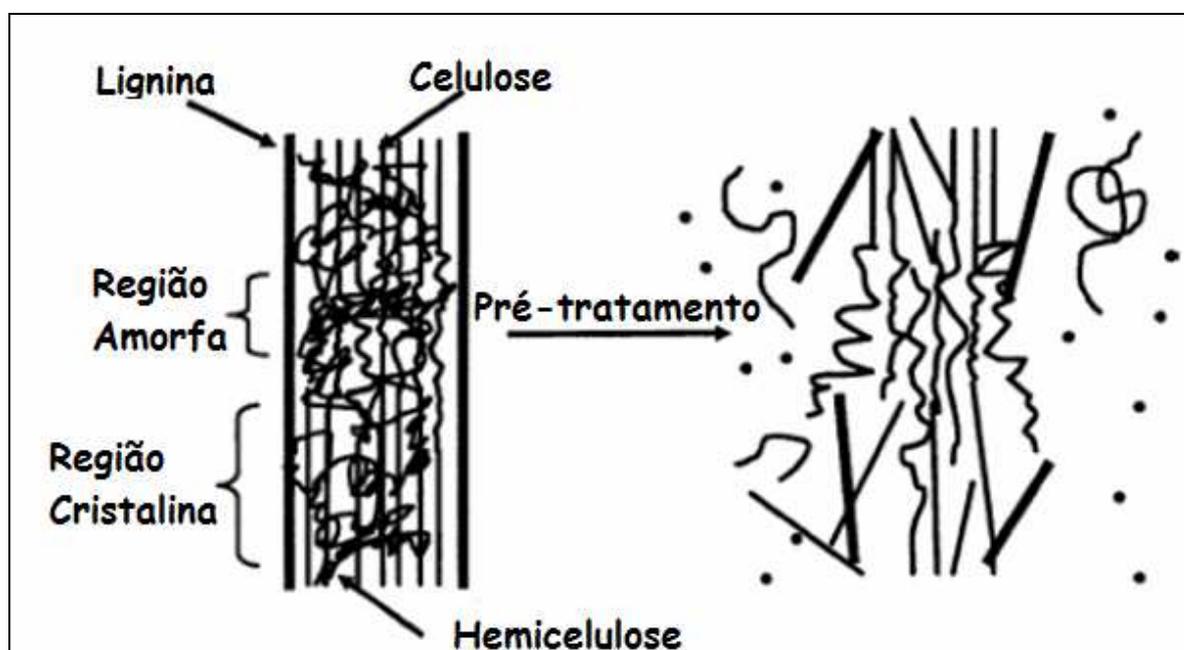
Estes fenômenos de retroinibição e retro- repressão estão mais frequentemente ligados a regulação de enzimas envolvidas em reações metabólicas intermediárias, que levam a

construção de macromoléculas . Por outro lado , a síntese de enzimas que degradam polímeros é normalmente regulada pela indução e pela chamada repressão catabólica.

## 2.11. Pré-tratamento

A biomassa lignocelulósica, no geral, é relativamente resistente à bioconversão e o bagaço de pendúnculo de caju e casca coco não é uma exceção. A utilização da biomassa como uma fonte de carboidrato para produtos químicos e combustíveis tem sido severamente dificultada pela baixa eficiência da população microbiana celulolítica.

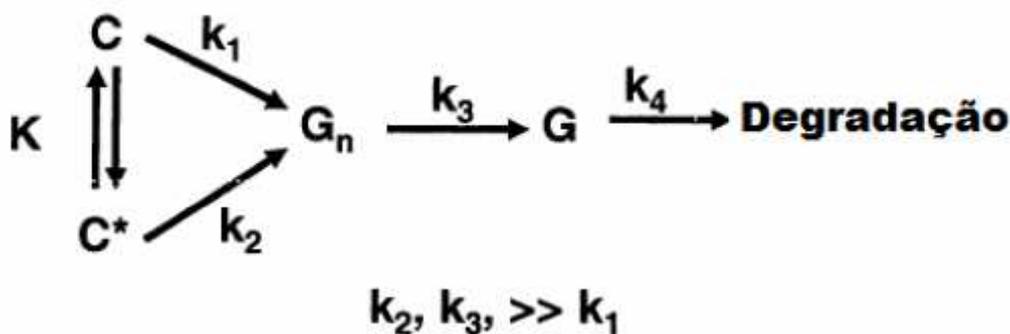
Além disso, a menos que um excesso muito grande de enzimas seja usado, a digestibilidade enzimática da celulose na biomassa nativa é baixa (< 20% de rendimento), devido à característica estrutural do material lignocelulósico. Em vista disso, resíduos agrícolas requerem um pré-tratamento para aumentar a digestibilidade da biomassa e fazer com que a celulose torne-se mais acessível às enzimas que convertem os carboidratos em açúcares fermentescíveis (Chang *et al.*, 1998), como representado no diagrama esquemático da Figura 2.11.



**Figura 2.11.** Pré-tratamento nos materiais lignocelulósicos (adaptado por HSU *et al.*, 1980).

A cristalinidade da celulose, área de superfície acessível, proteção da celulose pela lignina, o caráter heterogêneo das partículas da biomassa, e o fato da celulose estar revestida pela hemicelulose contribuem para a resistência da biomassa lignocelulósica a hidrólise (Rydholm, 1965; Wenzel, 1970; Hsu *et al.*, 1980; Hsu, 1996; Chang e Holtzaplle, 2000). A cristalinidade sozinha é insuficiente para impedir a hidrólise significativa se uma quantidade de enzima suficiente for usada. Sendo assim, a soma de todos estes fatores deve ser levada em consideração.

Os relacionamentos entre os fatores estruturais e composicionais refletem a complexidade dos materiais lignocelulósicos. A variabilidade nestas características explica a digestibilidade variando entre fontes diferentes de biomassa. No princípio, um pré-tratamento eficaz causa o rompimento destas barreiras de modo que as enzimas hidrolíticas possam penetrar e causar a hidrólise (Figura 2. 12) e minimiza também a degradação evitando a perda do açúcar (Figura 2.13) (Ladisich *et al.*, 1983; Lynd *et al.*, 1991; Holtzapple, 1993; Mosier *et al.*, 1999).



**Figura 2.12:** Esquema representativo dos passos do pré-tratamento. A transformação entre celulose cristalina (C) e amorfa (C\*) é reversível. Ambas formas rendem oligossacarídeos, na qual hidrolisam obtendo a glicose. A degradação da glicose pode então se transformar em inibidores da fermentação (Weil, 1992).

O objetivo do pré-tratamento é quebrar o elo da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose. Um pré-tratamento eficaz é caracterizado por diversos critérios: evitar a necessidade de reduzir o tamanho das partículas da biomassa, limitar a formação dos produtos da degradação que inibem o crescimento dos microrganismos fermentativos, minimizar a demanda de energia (National Reserch Council, 1999). Estas propriedades, junto com outras, incluindo o baixo custo do reagente de pré-tratamento, a possibilidade de ser reciclável e a

geração de co-produtos da lignina de alto valor agregado são uma base de comparação para as várias opções de pré-tratamento (Ladisich *et al.*, 1983, Lynd *et al.*, 1996; Delgenes *et al.*, 1996; Wyman, 1994; O pré-tratamento resulta na ampliação da área superficial interna das partículas do substrato, realizada através da solubilização e/ou pela degradação parcial da hemicelulose e da lignina. Isto conduz ao fracionamento dos três componentes e leva à abertura da estrutura da celulose (Pandey *et al.*, 2000).

O pré-tratamento foi visto como uma das etapas do processo mais caras na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Por isso, esta etapa apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento (Lee *et al.*, 1994; Lynd *et al.*; 1996; Mosier *et al.*, 2003a, b).

### **2.11.1 - Pré-tratamento mecânico**

Moagem (corte da biomassa lignocelulósica em pequenos pedaços) é um pré-tratamento mecânico da lignocelulose. O objetivo deste pré-tratamento é a redução da dimensão das partículas e da cristalinidade. Este processo conduz a um aumento da superfície específica disponível e uma redução do grau de polimerização (DP) (Palmowski & Muller, 1999).

Na maioria dos casos o aumento da superfície específica e a redução do grau de polimerização (DP) são fatores que aumentam o rendimento da hidrólise total da lignocelulose, em torno de 5 a 25% (dependendo do tipo de biomassa, tipo de moagem, e da duração da moagem), mas também reduz o tempo de digestão para 23 a 59% (portanto, um aumento na taxa de hidrólise) (Delgenes *et al.*, 2002, Hartmann *et al.*, 1999). Uma redução da granulometria inferior a 40 mesh, porém, tem pouco efeito sobre o rendimento de hidrólise, bem como a taxa de hidrólise da biomassa (Holzapfel & Chang, 2000).

### **2.11.2 - Pré-tratamento térmico**

Durante este pré-tratamento a biomassa lignocelulósica é aquecida. Se a temperatura aumenta acima de 150-180°C, partes da lignocelulose, primeiramente a hemicelulose e logo depois a lignina, começarão a solubilizar (Bolleter, 1994; Garrote *et al.*, 1999). A composição da estrutura hemicelulósica e os grupos ramificados determinam a estabilidade térmica, ácida

e alcalina das hemiceluloses. Dos dois componentes que fazem parte da estrutura da hemicelulose (xilanas e glucanas), as xilanas são termicamente mais estáveis, mas a diferença com as glucanas é pequena. Acima de 180°C uma reação exotérmica (provavelmente solubilização) da hemicelulose é iniciada. Esta temperatura de 180°C é provavelmente uma indicação da temperatura em que uma reação exotérmica começa, porque a reatividade térmica da biomassa lignocelulósica depende intrinsecamente de sua composição (Fengel & Wegener, 1984; Hon & Shiraishi, 1991).

Durante estes processos uma parte da hemicelulose é hidrolisada e forma ácidos. Estes ácidos são responsáveis por catalisar a hidrólise da hemicelulose (Gregg & Saddler, 1996). Liu & Wyman (2003) & Zhu et al. (2004, 2005) concluem que outros fatores, até agora desconhecidos tal como o efeito da catálise *in situ* formando ácidos, desempenham um papel na solubilização da hemicelulose.

O pré-tratamento térmico em temperaturas iguais ou superiores a 160°C promove, além da solubilização da hemicelulose, também a solubilização da lignina. Os compostos produzidos são quase sempre compostos fenólicos e, em muitos casos, têm um efeito tóxico ou inibidor sobre as bactérias, leveduras e fungos (Gossett *et al.*, 1982). Estes compostos, provenientes da lignina solúvel, são muito reativos e irá, se não forem removidos rapidamente, precipitar na biomassa (Liu & Wyman, 2003).

Durante este tratamento há o risco de formação de compostos fenólicos e heterocíclicos, como a vanilina, álcoois, furfural e HMF, especialmente em ambientes ácidos (Ramos, 2003). Estes compostos formados podem ser inibidores. Quando a concentração de sólidos é maior ou igual a 3% e a temperatura exceder 220°C durante um tempo de pré-tratamento de 2 min, a produção de etanol é quase totalmente inibida, devido à formação de furfural e outros compostos (provavelmente compostos da lignina solúvel) (LASER et al., 2002).

Temperaturas superiores a 250°C devem ser evitadas durante o tratamento prévio, uma vez que reações indesejáveis como pirólise começam a ter lugar em tais temperaturas (Brownell *et al.*, 1986).

### 2.11.2.1. Pré-tratamento a vapor/oxidação úmida

Durante o pré-tratamento a vapor/oxidação úmida a biomassa é inserida em um grande reator a vapor a temperaturas e pressões elevadas (temperaturas até 240°C), na qual esta é digerida por alguns minutos. Depois de um tempo definido, o vapor é liberado e a biomassa é rapidamente arrefecida. O objetivo deste tratamento é a solubilização da hemicelulose para tornar a celulose mais acessível para hidrólise enzimática e evitar a formação de inibidores.

A diferença entre o pré-tratamento a vapor e por oxidação úmida é a despressurização e esfriamento rápido da biomassa ao final do pré-tratamento por oxidação úmida, o que faz com que a água na biomassa chegue a "explodir". No entanto, o impacto na estrutura da biomassa, causado pela explosão sobre a digestibilidade, é ainda duvidoso (Brownell *et al.*, 1986).

Durante o pré-tratamento a vapor partes da hemicelulose são hidrolisadas formando ácidos, o que poderia catalisar a hidrólise da hemicelulose. Este processo, no qual a formação de ácidos *in situ* catalisa o processo em si, é chamado de “auto-decomposição”. O papel dos ácidos, no entanto não é catalisar a solubilização da hemicelulose, mas catalisar a hidrólise dos oligômeros solúveis (Bobleter *et al.*, 1991, Mok & Antal, 1992).

Durante este processo o teor de umidade da biomassa influencia no tempo necessário de pré-tratamento. Quanto maior o teor de umidade, maior o tempo de pré-tratamento ótimo (Brownell *et al.*, 1986).

O pré-tratamento a vapor de baixa pressão (2 bar, 120°C e tempo de pré-tratamento de até 300 min), não têm um grande efeito sobre a composição de resíduos lignocelulósicos, de acordo com Lawther *et al.* (1996), embora nenhum processo de hidrólise enzimática foi realizado para determinar o efeito sobre a digestibilidade de tais materiais.

### 2.11.2.2. Pré-tratamento por água quente (LHW)

Outro tipo de pré-tratamento térmico é aquele realizado com água quente. Neste caso, água quente (LHW) é utilizada em vez de vapor. O objetivo deste processo é principalmente solubilizar a hemicelulose para tornar a celulose mais acessível e evitar a formação de inibidores. Para evitar a formação de inibidores, o pH deve ser mantido entre 4 e 7 durante o tratamento. Nesta faixa de pH a formação de monossacarídeos é minimizada, e, por conseguinte, também a formação dos produtos de degradação que podem ainda catalisar a

hidrólise do material celulósico durante o pré-tratamento (Kohlmann et al., 1995; Mosier et al., 2005; Weil *et al.*, 1997). A degradação catalítica dos açúcares resulta em uma série de reações que são difíceis de controlar, e resultam em produtos secundários indesejáveis. Ao manter o pH entre 4 e 7, a formação auto-catalítica de inibidores na fermentação são evitados durante o pré-tratamento.

A diferença entre o LHW e o pré-tratamento a vapor é a quantidade e concentração de produtos solubilizados. No LHW o montante de produtos solubilizados é maior, enquanto a concentração destes produtos é menor comparado ao pré-tratamento a vapor (Bobleter, 1994). Isto é provavelmente causado pela maior inserção de água no LHW comparado ao pré-tratamento a vapor. O rendimento de xilanas solubilizadas (monoméricas) geralmente é mais elevado para o pré-tratamento LHW, embora este resultado diminua quando a concentração de sólidos aumenta, porque as xilanas (monoméricas) são mais degradadas por reações hidrolíticas, por exemplo, xilose e furfural. A desvantagem deste processo está relacionada com grande consumo de água, que produzem hidrolisados muito diluídos, gerando problemas nas etapas subsequentes de bioconversão (Laser *et al.*., 2002).

Yang & Wyman, (2004) descobriram que a hemicelulose e a lignina do milho Stover fluem através de sistemas menos interligados do que em sistemas descontínuos, nos mesmos fatores de severidade. Além disso, a adição de um ácido durante o processo através de escoamento causou maior desprendimento da hemicelulose e da lignina, enquanto que nos testes de batelada, a adição de um ácido causou menor desprendimento da lignina; em maiores tempos de reação a temperaturas acima de 200°C a remoção da lignina Klason diminuiu (ácido-lignina insolúvel). Concluiu-se que o ácido promoveu a solubilização mais rápida da lignina, mas também a sua precipitação. O maior desprendimento de hemicelulose e lignina, com a adição de um ácido durante os ensaios de pré-tratamento está em conflito com as conclusões do Bobleter et al. (1991), Jacobsen & Wyman (2002) & Liu & Wyman (2003), que afirmam que os ácidos não têm efeito real ou não são o único fator que afeta a solubilização da hemicelulose e lignina e que deve haver outras razões para a solubilização destes compostos durante os ensaios de pré-tratamento.

### 2.11.3. Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento da lignocelulose com ácidos a temperatura ambiente é feito para melhorar a digestão anaeróbia. O objetivo consiste em solubilizar a hemicelulose, e por isso, tornar a celulose mais acessível.

O pré-tratamento pode ser feito com ácidos fortes ou diluídos. A principal reação que ocorre durante o pré-tratamento ácido é a hidrólise da hemicelulose. A hemicelulose solubilizada (oligômeros) pode ser submetida a reações hidrolíticas produzindo monômeros, furfural, HMF e outros produtos (voláteis) em ambientes ácidos (Fengel & Wegener, 1984; Ramos, 2003). Durante este pré-tratamento a lignina solubilizada é rapidamente condensada e precipitada em meio ácido (Liu & Wyman, 2003; Shevchenko *et al.*, 1999). A solubilização da hemicelulose e a precipitação da lignina são mais pronunciadas durante o pré-tratamento com ácido forte em comparação ao pré-tratamento com ácido diluído.

Clarkson & Xião (1997) mostraram que a adição de ácido nítrico durante este tipo de pré-tratamento tem um enorme efeito sobre a solubilização da lignina de jornais.

### 2.11.4. Pré-tratamento alcalino.

Algumas bases também podem ser utilizadas para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e o efeito deste processo depende da quantidade de lignina presente nestes materiais (Mc Millan, 1994). Processos alcalinos de pré-tratamento utilizam condições moderadas de operação (temperatura e pressão), em comparação com sistemas ácidos. Segundo Baudel (2006), o principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior reatividade da fibra. O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um inchamento da biomassa, de modo que a cristalinidade da celulose decresce, enquanto ocorre um incremento da superfície específica de contato e da porosidade da mesma. O tratamento de madeira de folhosas com hidróxido de sódio (NaOH) aumentou a digestibilidade de 14% para 55% com a diminuição de 24-55% para 20% de lignina no material pré-tratado (Sun & Cheng, 2002). A desvantagem do sistema alcalino está parcialmente associada à dificuldade de recuperação dos álcalis, de modo a garantir a necessária economicidade do processo.

O processo AFEX consiste na versão alcalina do processo de pré-tratamento por oxidação úmida. Neste caso, a biomassa é submetida à ação de amônia líquida (2 Kg/Kg de

amônia seca) a 160-180°C, sob pressão de 9 a 17 bar e por um período de 10 a 20 min. Dentre as vantagens deste método, está a elevada reatividade da fibra, a geração mínima de inibidores de fermentação além da facilidade na recuperação da amônia. Entretanto, este processo não promove uma elevada solubilização das hemiceluloses como os processos ácidos, sendo difícil a recuperação das mesmas (Holtzapfle *et al.*, 1991).

No pré-tratamento alcalino oxidativo a biomassa é tratada com água quente e oxigênio a temperaturas superiores a 120°C. O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) também pode ser utilizado como agente oxidante, sob temperaturas entre 30-70°C, com tempos de reação que variam de 2 a 8h. Neste processo, carbonato de sódio, hidróxido de cálcio ou hidróxido de sódio são utilizados como agentes de hidrólise e deslignificação. São produzidas neste pré-tratamento polpas com elevada reatividade da fibra. O uso da oxidação alcalina úmida para o tratamento da palha de trigo (20g de palha/L, 170°C, 5-10 min) alcançou índices de sacarificação enzimática da celulose de 85%. Um dos problemas associados a esse processo é a geração de inibidores de fermentação nos hidrolisados, tais como ácidos orgânicos e compostos fenólicos (Martin *et al.*, 2007).

---

## **CAPÍTULO 3**

### ***Material e Métodos***

---



## **3. Material e Métodos**

Este capítulo apresenta os procedimentos empregados nas diversas etapas no estudo da hidrólise.

### **3.1 – Matéria Prima**

A matéria prima utilizada neste trabalho foi o bagaço de pedúnculo caju e bagaço de coco, sendo bagaço de caju, resultante da produção de polpas de frutas fabricada na Indústria Delícia da Fruta LTDA, Natal RN e o bagaço do coco proveniente da Indústria e Comercio de Beneficiamento de Coco LTDA Parnamirim RN. Após coletado em recipientes plásticos, foi transportado para o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

### **3.2 – Pré – Tratamentos**

#### **3.2.1 – Pré-tratamento alcalino**

Em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio 1 M inseriu-se uma quantidade conhecida do bagaço do pedúnculo de caju (30 g) ou do bagaço de coco (10 g) triturados em peneiras de 20 mesh. Em seguida, os Erlenmeyer com os bagaços em solução alcalina foram levados à autoclave a temperatura de 121°C por 30 minutos. Ao término do processo, deixou-se chegar à temperatura ambiente para, em seguida, realizar-se dez lavagens com água destilada até neutralização. Após as lavagens, os bagaços, ainda úmidos, foram colocados em bandejas e levados para secagem em estufa com circulação de ar forçado a 60°C por 24 horas para depois serem novamente triturados.

### 3.2.2 – Pré-tratamento por Oxidação Úmida

O tratamento por oxidação úmida foi realizado em um reator do tipo *slurry* (leito de lama) dotado de controle de temperatura, pressão e velocidade de agitação. O reator construído de aço inoxidável, com volume de 500 mL, foi adquirido pelo laboratório de Termodinâmica e Reatores da Universidade Federal do Rio Grande do Norte da *Autoclave Engineers Inc.* – USA. O mesmo é composto de um forno cilíndrico cuja finalidade é de aquecer o meio reacional. No copo do reator foi inserida uma quantidade conhecida dos bagaços em questão em 400 mL de água destilada para evitar queima do material. Após inserção do material no reator deixou-se atingir a temperatura de 200°C, onde, em seguida, injetou-se oxigênio até pressão de 20 atm, deixando-se digerir por 10 minutos. Ao término do tratamento abriu-se a válvula de saída do gás para a rápida descompressão do sistema. Em seguida, procedeu-se com a descarga do material para sucessivas lavagens (no mínimo dez) com água destilada a fim de remover os açúcares residuais e compostos inibidores resultantes da explosão dos bagaços no reator. O material seguiu para secagem a 60°C por 24 horas em estufa dotada de circulação de ar forçada para depois ser triturado.

### 3.2.3 – Pré-tratamento por oxidação úmida e alcalino combinados

Nesta etapa do pré-tratamento foi realizado primeiramente todo o procedimento descrito para o tratamento por oxidação úmida dos dois bagaços. Após a descarga do reator o material foi seco em estufa e na sequência em contato com 100 mL de uma solução de hidróxido de sódio 1 M em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos com os bagaços foram então transferidos para uma autoclave a 121°C por 30 minutos para depois serem sucessivamente lavados com água destilada e depois secos em estufa com circulação de ar forçada a 60°C por 24 horas.

### 3.2.4- Peneiração

Os bagaços triturados foram peneirados em uma peneira de 20 mesh, de acordo com a metodologia proposta em NREL 42620- Preparation of Samples for Compositional Analysis (Hames et al., 2008). A porção do bagaço que passou pela peneira de 20 mesh era novamente peneirada numa tela de 80 mesh.

### 3.3- Obtenção do Extrato

Para a obtenção dos extratos de celulasas foi utilizado uma cultura de *Trichoderma reesei* (ATCC 2768) obtida da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello que foi mantida em meio sólido PDA vertido em Placas de Petri. A renovação das culturas foi feita por suspensão dos esporos no meio utilizando água destilada estéril e incubação à 30°C por 5 – 7 dias. Após incubação esta cultura foi devidamente identificada e estocada à 5°C em geladeira. Os substratos utilizados foram resíduos de Pendúnculo de caju e casca de coco.

#### 3.3.1. - Obtenção do Inóculo

Em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, contendo 150 mL do meio de cultura e lacrados com rodilhões de algodão e gases, foram esterilizados em autoclave à 121°C por 20 minutos. Após a esterilização esperava-se atingir a temperatura ambiente. Os Erlenmeyers eram levados à câmara de fluxo laminar, onde 2mL de suspensão de esporos oriundas do meio de manutenção eram transferidas assepticamente para os frascos contendo o meio de cultura. Os frascos foram colocados num *shaker*, 27°C, 175 rpm em 48 horas, sendo esta cultura utilizada como inóculo nos ensaios para produção das enzimas celulasas.

#### 3.3.2 – Cultivo para (Extrato Enzimático)

A cepa *Trichoderma reesei* (ATCC 2768) obtida da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello foi utilizada nos ensaios para produção dos extratos de celulasas. Quatro Erlenmeyers com capacidade para 1000mL contendo 450mL do meio, com 5g de bagaço(caju ou coco) (Tabela 3.1), pH inicial corrigido para 4.8, foram lacrados e esterilizados à 121°C, e em seguida deixados atingir a temperatura ambiente. Na câmara de fluxo laminar estes frascos foram inoculados com 10% v/v do pré-inóculo previamente preparado. Após a inoculação, os frascos foram levados ao incubador rotativo (*shaker*), a temperatura de 27°C e rotação de 175 rpm, por um período de 120 horas, (Guedes, 2010). Ao final do 5<sup>o</sup> dia o caldo fermentado foi coletado e centrifugado a 3400 x g e do sobrenadante retirava-se uma amostra para determinação das atividades enzimáticas CMC<sub>ase</sub> e Fp<sub>ase</sub> e, em seguida, conduzia-se os ensaios de Hidrólise.

**Tabela 3.1** - Meio de Xiong (2004)

Componentes	Unidade	Concentração	
		Inóculo	Produção de celulase
<b>Solução de Sais</b>			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	5.0	5.0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	g/L	0.8	0.8
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	g/L	0.6	0.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L	5.0	5.0
<b>Micronutrientes</b>			
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	mg/L	5.0	5.0
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	mg/L	1.6	1.6
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	mg/L	1.4	1.4
CoCl <sub>2</sub>	mg/L	2.0	2.0
Tween 80	mL/L	0.2	0.2
Peptona	g/L	0.75	0.75
Extrato de Levedura	g/L	0.3	0.3
Bagaço (caju, coco)	g/L	10	10

### 3.3.3. Avaliação da atividade do extrato obtido

#### 3.3.3.1 - Determinação da atividade de FPase

Esse método determina a atividade conhecida como FPase no sobrenadante das culturas através da determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro. Este método foi adaptado do procedimento descrito por Ghose (1986).

Tiras de aproximadamente 1,0 x 6,0 cm (50mg) de papel de filtro Whatman nº1, enroladas em forma espiral, foram imersas em tubos de ensaio contendo previamente 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50,0 mM, em pH 4,8. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 1 min, antes da adição do sobrenadante (solução de enzima) para equilíbrio da

temperatura. Em seguida, 1 mL da solução de enzima foi adicionada em cada tubo, onde reagiu por 60 min e a 50°C. Após o tempo de incubação, 0,5 mL da mistura reacional foi transferida para tubos contendo 2,5mL do reagente DNS e colocada em água fervente por exatamente 5 min, para em seguida, ser resfriada em banho de gelo completando o volume a 5,5 mL com água destilada em cada tubo. A absorbância da solução foi medida em 540nm e a concentração de açúcares redutores foi determinada através de uma curva de calibração onde a glicose é utilizada como padrão.

### 3.3.3.2 - Determinação da atividade de CMCase

Esse método determina a atividade conhecida como CMCase, no sobrenadante das culturas, através da determinação da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação da carboximetilcelulose (CMC).

Em tubos de ensaio foi colocado 1,0 mL de solução de CMC 4,0 % (Carboximetilcelulose) preparada em tampão citrato de sódio 50,0 mM. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C por 1 min, antes da adição do sobrenadante (solução de enzima) para equilíbrio da temperatura. Em seguida 1mL da solução de enzima foi adicionada em cada tubo, para reagir a 50°C por 15min. Após esse tempo, 0,5 mL da amostra reacional foi retirada e misturada a tubos contendo 2,5mL de DNS, onde realizava-se o procedimento de determinação de açúcares redutores.

### 3.3.3.3 - Cálculo da atividade enzimática

A atividade enzimática das celulases foi calculada em UI/mL através da equação 1 abaixo. Uma unidade das atividades de FPase e CMCCase são definidas como a quantidade de enzimas que liberarão o equivalente a 1,0 µmol de glicose a partir do papel de filtro Whatman n ° 1 e carboximetilcelulose (CMC) em 1 min, respectivamente. Uma unidade da atividade de β-glicosidase foi definida como a quantidade de enzima conversora em 1 µmol de celobiose para produzir 2 µmol de glicose em 1 min.

$$UI / mL = \frac{E_{dil} * \Delta Abs * F (\mu mol / mL) * V_T (mL)}{t(\min) * V_S (mL)} \quad (1)$$

onde  $E_{dil}$  corresponde a diluição quando necessário,  $F$  é o fator da curva padrão de glicídios redutores,  $V_T$  é o volume total da mistura racional,  $t$  é o tempo de reação e  $V_s$  é o volume de sobrenadante.

### **3.4 - Processo de Hidrólise Enzimática.**

Foram realizadas hidrólises enzimáticas com dois tipos de bagaço (bagaço de coco e pedúnculo de caju). Nos ensaios de hidrólise foram utilizados bagaços pré-tratados por deslignificação com NaOH 1M, por oxidação úmida e os dois combinados.

Depois dos bagaços serem pré-tratados, eram preparados os ensaios para análise da cinética de hidrólise enzimática. Vinte frascos erlenmeyers com capacidade de 250 ml, contendo 0,5 g de bagaço e 45 ml de extrato enzimático, foram lacrados e levados ao incubador rotativo (*shaker*) a temperatura de 50<sup>0</sup>C, 125 rpm e pH 4,8, durante 108 h. Nas primeiras 12 h as amostras foram coletadas e transferidas para tubos de capacidade de 50 ml, nos intervalos de tempo zero, 3h, 6h, 12h e depois deste instante foram coletadas apenas a cada 12 h. Estas amostras foram centrifugadas a 3400 x g e o sobrenadante recolhido para determinação açúcares redutores (AR) e o que restava nos tubos foi colocado para secar em estufa de circulação de ar forçada para determinação dos açúcares redutores totais (ART`s).

#### **3.4.1 – Análises para Acompanhamento no processo de Hidrólise**

##### **3.4.1.1-Determinação de pH.**

Nos ensaios de hidrolise o pH inicial do meio a ser hidrolisado foi medido utilizando o potenciômetro Digimed DM-21.

##### **3.4.1.2 – Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART`s).**

As amostras de bagaço, não hidrolisados foram tratadas com uma solução de ácido sulfúrico 72,0%. Para isso as amostra de bagaço foram tratadas com 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72,0%, sob vigorosa agitação, por 7 minutos, em banho termostaticado a 45,0 ± 0,5°C.

A reação foi interrompida com 40 mL de água destilada e o material hidrolisado foi filtrado, utilizando-se papel de filtro. Após esta etapa o hidrolisado era recolhido em balão volumétrico de 500 mL. Os açúcares redutores totais foram medidos pelo método de DNS

(ácido dinitrosalicílico) cuja curva de calibração está representada nas Figuras A.8 e A.9 (Anexo).

Para o cálculo de rendimento da variação de açúcares redutores totais no processo de hidrólise para os dois bagaços foi utilizada a seguinte equação 2.

$$\text{Variação de ART's} = \frac{\text{ART}_{\text{inicial}} - \text{ART}_{\text{final}}}{\text{ART}_{\text{inicial}}} * 100 \quad (2)$$

### 3.4.1.3 – Determinação de Açúcares Redutores (ARs)

Os açúcares redutores formados durante a hidrólise dos bagaços de pedúnculo de caju e casca de coco foram medidos transferindo-se 0,5 mL dos sobrenadantes em tubos contendo 2,5 mL do reagente DNS. Após passarem 10 minutos em banho fervente e, após resfriados, completava-se o volume dos tubos para 5,5 mL com água destilada, onde a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de AR's obtida pela curva padrão.

### 3.4.1.4 – Determinação da velocidade inicial (Vo) no processo de hidrólise.

Para o cálculo da velocidade inicial (Vo) da hidrólise, traçaram-se curvas da evolução dos açúcares redutores em função do tempo. Procedeu-se um ajuste linear da curva que descreve a variação de açúcares redutores na região ascendente da curva e determinou-se o coeficiente angular da reta ajustada pelo método dos mínimos quadrados, equações no Anexo 2.

---

## **CAPÍTULO 4**

### ***Resultados e Discussão***

---

## 4. Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados obtidos e sua discussão. A primeira etapa do trabalho foi a obtenção do Extrato Enzimático celulolítico sintetizado por *Trichoderma reesei* ATCC 2768 cultivada em incubador rotativo utilizando dois resíduos lignocelulósicos, bagaço do pedúnculo de caju e bagaço de coco. A segunda etapa consistiu em estudar-se o comportamento do processo de hidrólise utilizando este extrato enzimático com os mesmos resíduos, bagaço de pedúnculo de caju e casca de coco, submetidos aos pré-tratamentos alcalino com NaOH 1M, oxidação úmida e os dois combinados, a fim de analisar como se dá a hidrólise durante o processo de síntese de Enzima, hidrólise esta catalisada pelo próprio extrato produzido, mecanismo que deve ser controlado em processos de síntese de enzimas de indução, caso de enzimas do complexo celulolítico.

### 4.1. Obtenção dos Extratos Enzimáticos

Antes de realizar as hidrólises enzimáticas, foi necessário medir a atividade da preparação enzimática para poder conhecer as quantidades de enzima que seriam utilizadas nas hidrólises. A partir dos resultados das atividades enzimáticas para cada bagaço, foi possível verificar se a quantidade de enzima calculada para as hidrólises, compreendiam a dosagem de enzima comumente utilizada nos processos de hidrólises que estão na faixa entre 7 e 33 FPU/g substrato (Sun & Cheng, 2002).

Sun et al. (2008), utilizando *Trichoderma reesei* RUT- C30 para produção de celulases em meio contendo palha de arroz como substrato lignocelulósico pré- tratado com NaOH 10%, obtiveram 1,07 UI/mL de FPase.

Oliveira et al (2009) conseguiram obter, utilizando casca de coco verde sem tratamento e avicel como substrato controle, em meio submerso de *Aspergillus heteromorphus* URM 269, atividades enzimáticas de 0,32 UI/mL e 1,51 UI/mL de Fpase e CMcase respectivamente.

Awafo et AL. (2000) utilizando palha de trigo como substrato lignocelulósico tratados com NaOH 1M seguido de explosão a vapor, com vapor a temperatura de 170 °C e tempo de residência do resíduo no reator de 6,5 min, para produção de celulase por duas linhagens de

*Trichoderma reesei* QMY-1 e MCG 80 obtiveram atividade FPase de 7,80 UI/mL e 6,85 UI/mL, respectivamente, em fermentação semi- sólida.

Os extratos enzimáticos sintetizados pela linhagem *Trichoderma reesei* cultivada em meio à base de pedúnculo de caju e casca de coco apresentaram atividades enzimáticas CMCase e Fpase. Verificou-se que a maiores atividades CMCase foram obtidas ao se utilizar como substrato o pedúnculo de caju tratado alcalinamente. Já quando se utilizou o bagaço de coco, as melhores atividades foram obtidas nos cultivos que se utilizou como substrato, o bagaço de coco tratado por oxidação úmida.

Com relação atividade FPase obteve-se melhor resultado quando utilizou como substrato o bagaço de pedúnculo de caju submetido aos dois tratamentos combinados. Quando se utilizou o pedúnculo de caju apenas a oxidação úmida não foi observado atividade FPase. Nos ensaios em que se utilizou a casca do coco como substrato as atividades de FPase foram praticamente iguais independente do pré- tratamento adotado alcalino ou a oxidação úmida.

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os resultados de atividades enzimáticas CMCase e Fpase, dos extratos enzimáticos para as diferentes condições estudadas.

**Tabela 4.1. Resultados das atividades enzimáticas dos extratos obtidos com o bagaço de Pedúnculo de caju como substrato.**

<b>Extrato Enzimático</b>	<b>CMCase (UI/mL)</b>	<b>Fpase (UI/mL)</b>
Bagaço do pedúnculo de caju (Tratamento alcalino)	1, 34	0, 072
Bagaço do pedúnculo de caju (Tratamento por oxidação úmida)	0, 55	***
Bagaço do pedúnculo de caju (Os dois tratamentos combinados)	1, 16	0, 11

**Tabela 4.2. Resultados das atividades enzimáticas dos extratos obtidos com o bagaço de coco como substrato.**

<b>Extrato Enzimático</b>	<b>CMCase (UI/mL)</b>	<b>Fpase (UI/mL)</b>
Bagaço da casca do coco (Tratamento alcalino)	0, 65	0, 045
Bagaço da casca do coco (Tratamento por oxidação úmida)	1, 15	0, 042
Bagaço da casca do coco (Os dois tratamentos combinados)	0, 54	0, 013

#### 4.2. Hidrólise Enzimática

Os ensaios para avaliação de hidrólise enzimática dos bagaços de pedúnculo de caju e casca de coco foram realizados em incubador rotativo (*shaker*), a temperatura de 50<sup>0</sup>C, 125 rpm e pH 4.8, por um período de 108 h, utilizando extratos enzimáticos sintetizados por *Trichoderma reesie*, cultivada em meios contendo os mesmos resíduos como substrato. As figuras abaixo indicam os perfis de variação ao longo do tempo de açúcares no processo de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju e casca de coco. Os resultados sugerem que os pré-tratamentos alcalino, oxidação úmida e combinados, favorecem a hidrólise enzimática, o que já era esperado, tendo em vista que estes pré- tratamentos proporcionam maior suscetibilização da celulose à ação das enzimas, resultando em maiores conversões de açúcares redutores totais. O pré-tratamento com NaOH 1M facilita a hidrólise devido à redução na quantidade de lignina da biomassa, e o tratamento por oxidação úmida provoca um inchamento na celulose, aumentando a disponibilidade de acesso as enzimas. Os resultados mostram que as maiores porcentagens dos hidrolisados foram alcançadas quando o bagaço de pedúnculo de caju era submetido ao tratamento alcalino, igualmente observou-se que nos cultivos para obtenção de extratos enzimáticos nesta condição, também obteve-se a melhor atividade enzimática de 1,134 UI/mL de CMcase e 0,072 UI/mL de FPase. Entretanto quando realizou-se os dois tratamentos combinados no bagaço de pedúnculo de caju resultou em boas porcentagens de hidrolisados, como também nos cultivos de obtenção do extrato nesta mesma condição obteve-se bom resultado de atividade de 1,16 UI/mL de CMcase. No caso do bagaço da casca de coco, quando submetido a oxidação úmida obteve-se melhores atividades enzimática de 1,15 UI/mL de CMcase e 0,043 UI/mL de FPase, para essa mesma condição

verificou-se as maiores porcentagens dos hidrolisados do bagaço de casca de coco, o que indica que estes pré- tratamentos melhoram o aproveitamento do conteúdo celulósico do bagaço.

As Figuras 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, mostram a quantificação de açúcares redutores dos hidrolisados de pedúnculo de caju e bagaço de casca de coco, respectivamente, tratados alcalinamente com NaOH, por oxidação úmida e os dois combinados, e as figuras 4.1a, 4.2a, 4.3a, 4.4a, 4.5a, 4.6a e 4.6.b, indicam os ajustes lineares para o processo de hidrólise dos bagaços de pedúnculo de caju e bagaço de casca de coco quando tratados por deslignificação com NaOH 1M, oxidação úmida e os dois combinados.

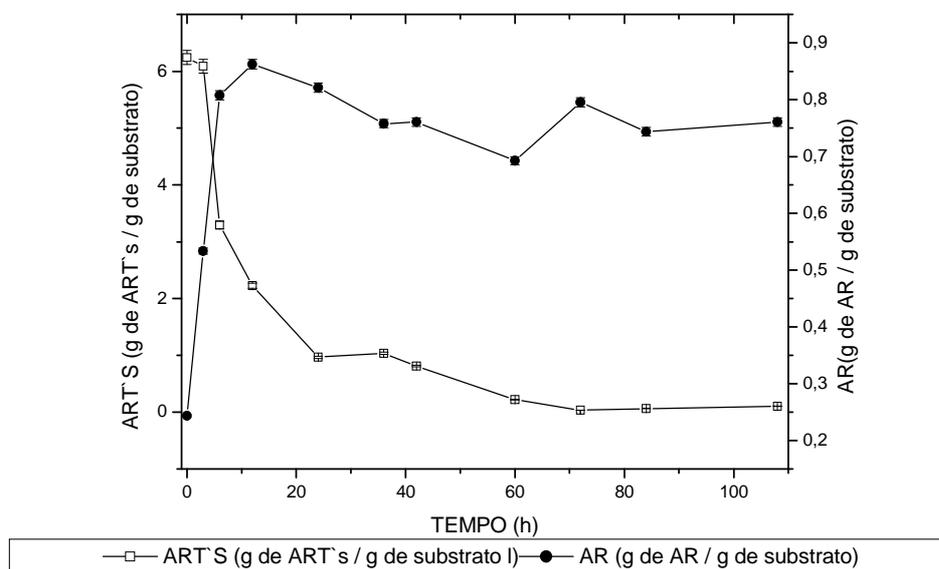


Figura 4.1 – Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de Pedúnculo de caju tratado alcalinamente com NaOH 1M

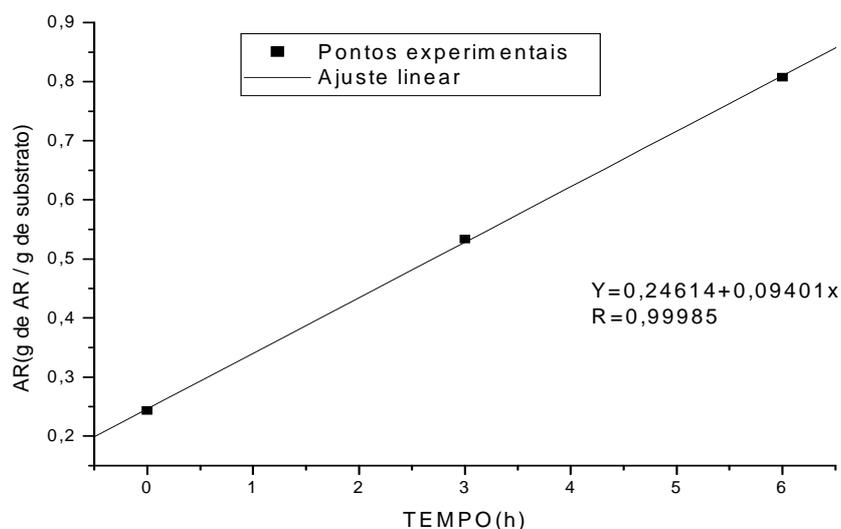


Figura 4.1a. indica os ajustes linear para o cálculo da velocidade inicial no processo de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju deslignificado com NaOH 1M. Observa-se que a hidrólise efetiva ocorre nas 6 primeiras horas do processo.

A Figura 4.1, indica o comportamento do processo de hidrólise do pedúnculo de caju tratado alcalinamente com NaOH, utilizando extrato enzimático de atividade de 1,34 UI/mL de CMcase e 0,072 UI/mL de FPase. Neste ensaio verifica-se no instante inicial uma concentração de açúcares redutores totais de 6,24 g de ART `s/ g de substrato e açúcares redutores de 0,243 g de AR/ g de substrato, observa-se desde o instante inicial uma eficiente hidrólise, onde se obtêm rapidamente uma velocidade inicial de hidrólise de 0,094 g de AR/g de substrato.h nas primeiras 6 horas processo. Observa-se que às 20 horas de processo já existe maior presença de açúcares redutores do que os açúcares redutores totais. Neste caso obteve-se uma variação de rendimento dos açúcares redutores totais, decorrente do processo de hidrólise, de aproximadamente 96%.

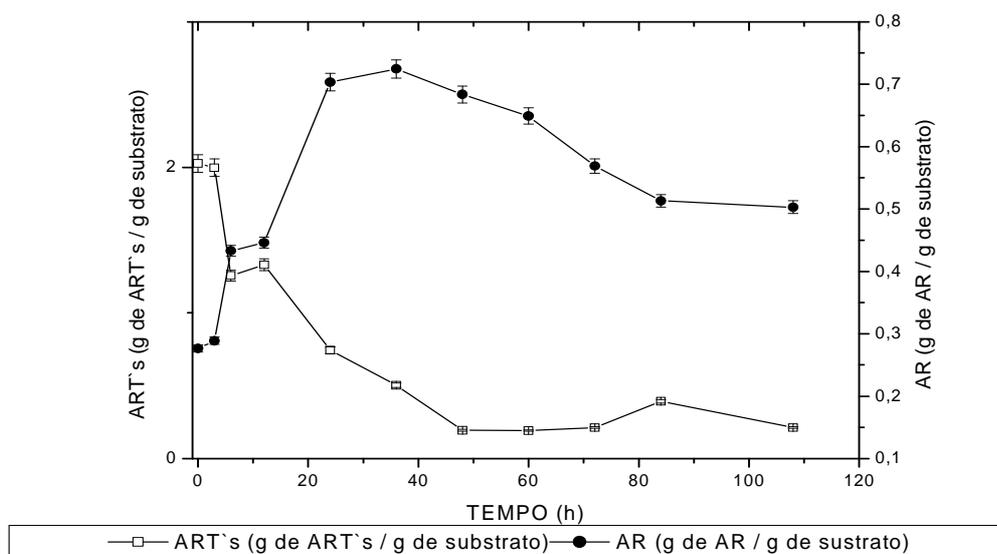


Figura 4.2. Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de Pedúnculo de caju tratado por oxidação úmida.

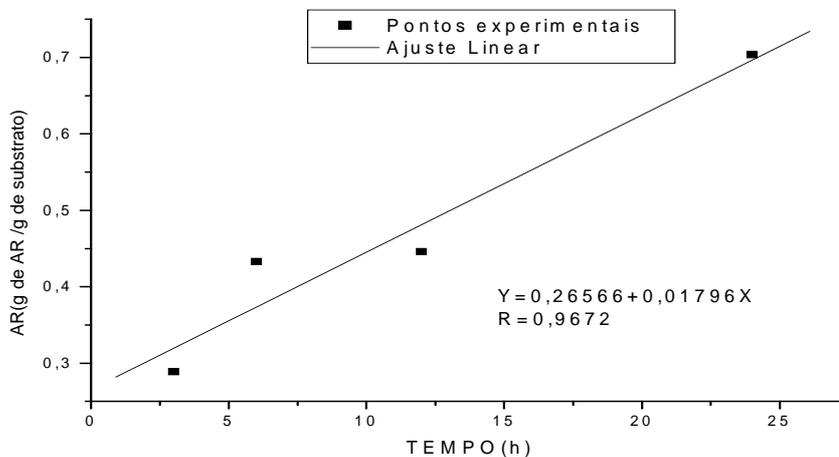


Figura 4.2a representa o ajuste linear para o cálculo da velocidade inicial no processo de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju tratado por oxidação úmida. Observa-se que a hidrólise efetiva ocorre nas 20 primeiras horas do processo.

Na Figura 4.2, apresenta o perfil de hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju tratado por oxidação úmida, utilizando extrato enzimático de atividade de 0,55 UI/mL de CMcase. Os resultados indicam também uma eficiente hidrólise desde o início do processo, onde observa-se rapidamente uma velocidade inicial de hidrólise na ordem de 0,01363 g de AR/ g de substrato.h nas primeiras 20 horas do processo, onde têm-se uma concentração inicial de açúcares redutores e açúcares redutores totais de 0,207 g de AR/ g de substrato e 2,026 g de ART`s/ g de substrato, respectivamente. Igualmente observa-se que no instante de 20 horas de processo já se tem mais concentração de açúcares redutores do que açúcares redutores totais. Neste caso obteve-se uma variação de rendimento dos açúcares redutores totais no processo de hidrólise de 89 % para o bagaço de pendúnculo de caju.

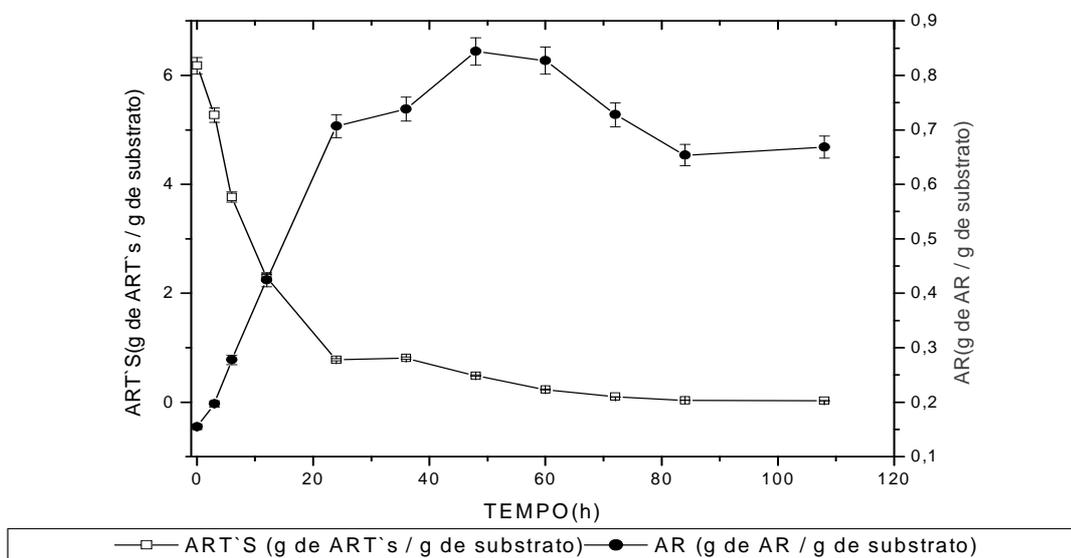


Figura 4.3. Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de Pedúnculo de caju submetido a tratamento combinado, alcalino e oxidação úmida.

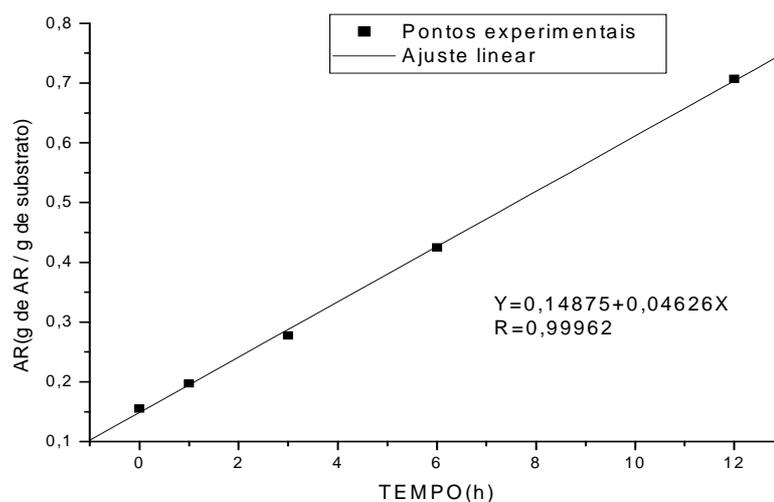


Figura 4.3a, mostra o ajuste linear para o cálculo da velocidade inicial dos bagaços de pedúnculo de caju tratados por oxidação úmida e deslignificado com NaOH, combinados. Observa-se que a hidrólise efetiva ocorre nas 12 primeiras horas do processo.

A Figura 4.3, mostra o comportamento do processo de hidrólise do pedúnculo de caju submetido aos tratamentos combinados, alcalino e oxidação úmida, utilizando extrato enzimático de atividade de 1,15 UI/mL de CMCase e 0,107 UI/mL de FPase. No instante inicial tinha uma concentração de açúcares redutores totais de 6,19 g de ART's/ g de substrato, e já havia uma pequena quantidade de concentração açúcares redutores de 0,16 g de AR/ g de substrato, observa-se uma velocidade inicial de hidrólise 0,04626 g de AR/ g de substrato .h o que ocorreu nas primeiras 12 horas do processo. Às 25 horas do processo, já se nota uma maior presença de açúcares redutores do que de açúcares redutores totais. Neste caso obteve-se uma variação de rendimento dos açúcares redutores totais de 94 % para o processo de hidrólise.

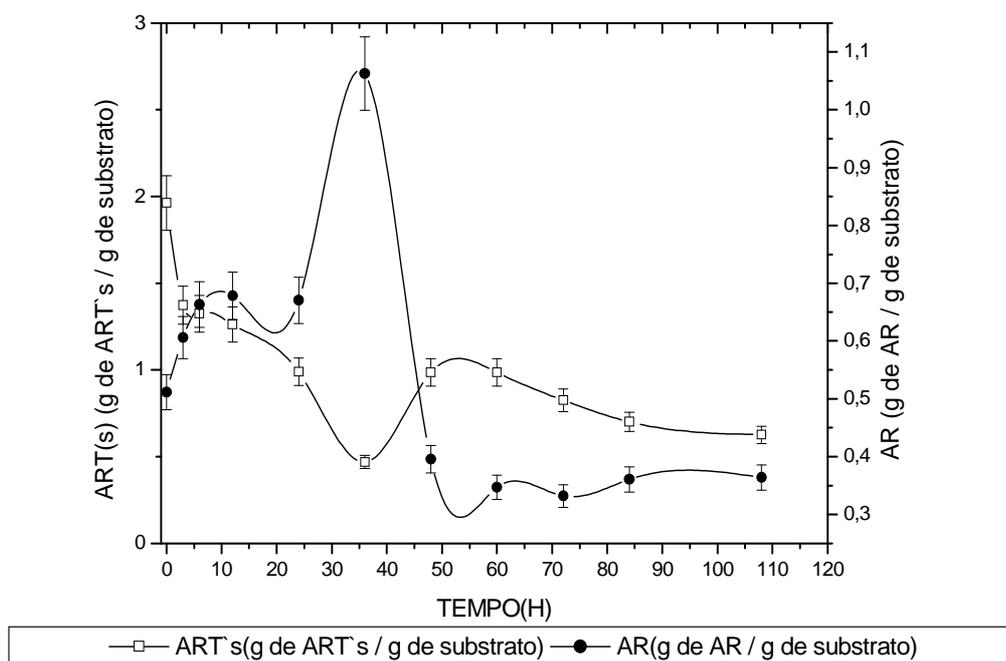


Figura – 4.4 - Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de coco Tratados alcalinamente com NaOH 1M

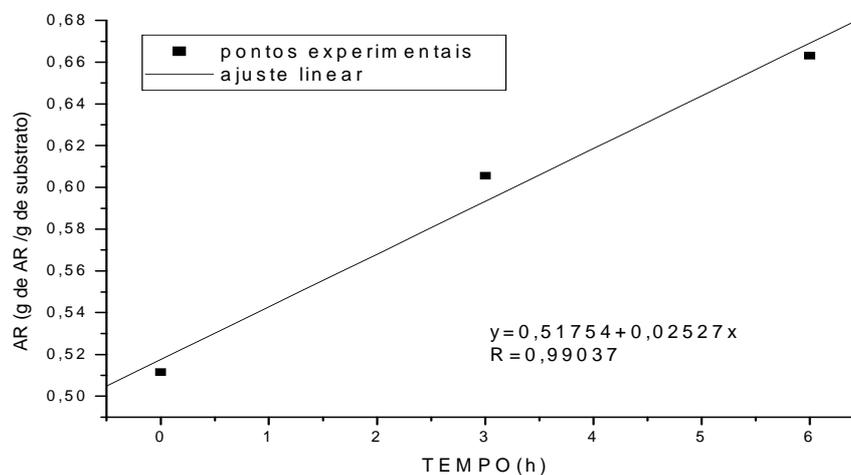


Figura 4.4a, indica os ajustes linear para o cálculo da velocidade inicial no processo de hidrólise do bagaço de coco deslignificado com NaOH 1M. Observa-se que a hidrólise efetiva ocorre nas 6 primeiras horas do processo.

A Figura 4.4 apresenta os resultados obtidos no ensaio de hidrólise do bagaço de coco tratado alcalinamente com NaOH 1M, utilizando um extrato enzimático de atividade 0,65 UI/mL de CMcase e 0,045 UI/mL de FPase. Observa-se que no início do processo tinha-se uma concentração de açúcares redutores totais de 1,96 g de ART`s/ g de substrato e uma concentração inicial de açúcares redutores de 0,511 g de AR/ g de substrato, sendo importante notar que nas primeiras 6 horas do processo a velocidade de hidrólise parece ainda baixa na ordem de 0,02527 g de AR/ g de substrato.h, entretanto, entre 20 e 40 horas de processo parece ocorrer a velocidade máxima de hidrólise. Nestes instantes, a concentração de açúcares redutores já passa ser superior a de açúcares redutores totais, porém após as 50 horas de processo, os açúcares redutores mantiveram-se constantes, mas surpreendentemente os açúcares redutores totais também mantiveram- se praticamente constante até o final. Pode-se levantar a hipótese que como o bagaço de coco apresenta bastante lignina em sua composição pode está havendo uma interferência nos métodos de análises de açúcares. Neste caso, obteve-se uma variação de rendimento dos açúcares redutores totais de apenas 48%.

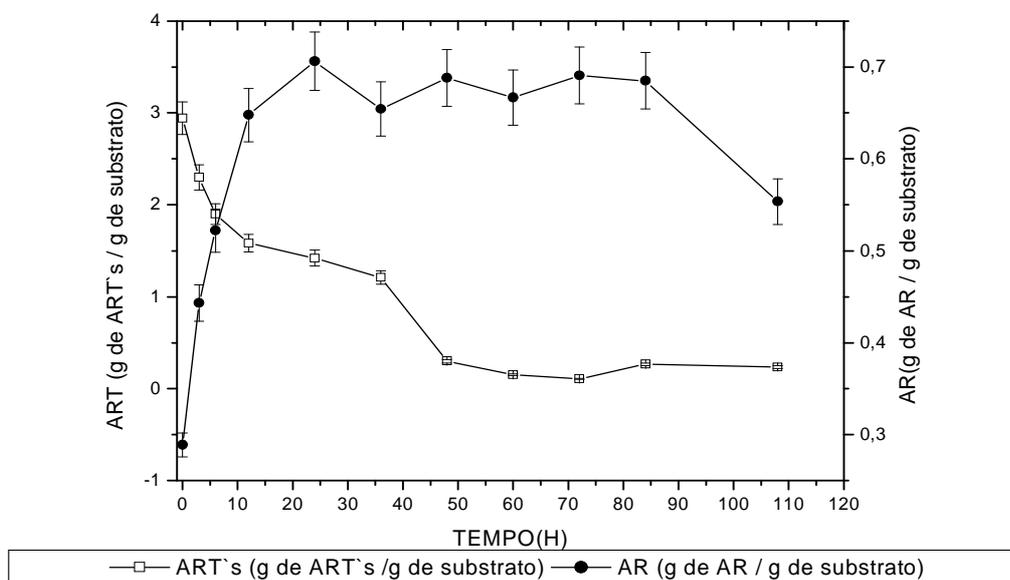


Figura 4.5. Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de coco Tratado por oxidação úmida

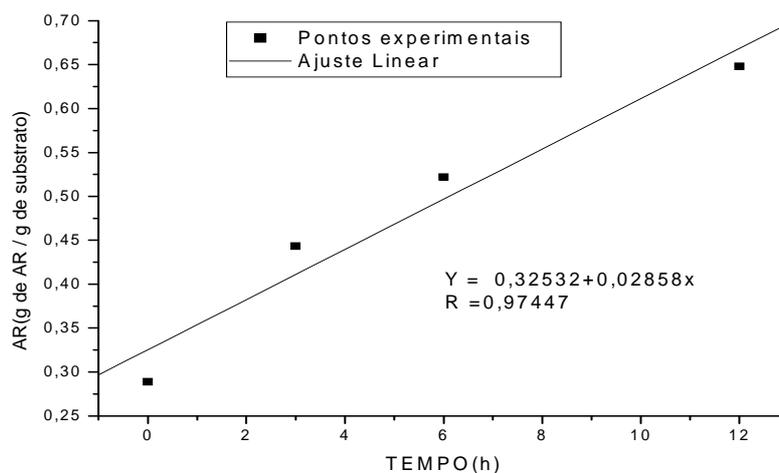


Figura 4.5a, apresenta o ajuste linear para o cálculo da velocidade inicial no processo de hidrólise do bagaço de coco submetido a oxidação úmida. Observa-se que a hidrólise efetiva ocorre nas 12 primeiras horas do processo.

A figura 4.5 apresenta o perfil de hidrólise do bagaço de coco tratado por oxidação úmida, utilizando um extrato enzimático de atividade 1,15 UI/mL de CMcase e 0,043 UI/mL de FPase. Observa-se que ao comparar esta figura com a 4.4, que representa uma baixa eficiência no processo de hidrólise, nota-se a nítida diferença do efeito provocado pelos dois diferentes tratamentos, alcalino e oxidação úmida no bagaço de coco. Quando se adotou a oxidação úmida verificou-se que mais rapidamente ocorre a velocidade inicial de hidrólise na ordem de 0,0286 g de AR/ g de substrato. h, no instante de 12 horas. No instante inicial havia uma concentração de açúcares redutores totais de 2,942 g de ART`s/ g de substrato e açúcares redutores de 0,28 g de AR/ g de substrato, e no instante de 20 horas já se observa maior presença de açúcares redutores do que de açúcares redutores totais, a partir deste instante os açúcares redutores cresce até atingir um estado pré- estacionário, indicando que o tratamento por oxidação úmida melhorou ainda mais a digestibilidade da fibra do coco, resultando num rendimento total de variação de açúcares redutores totais no final do processo de 91%.

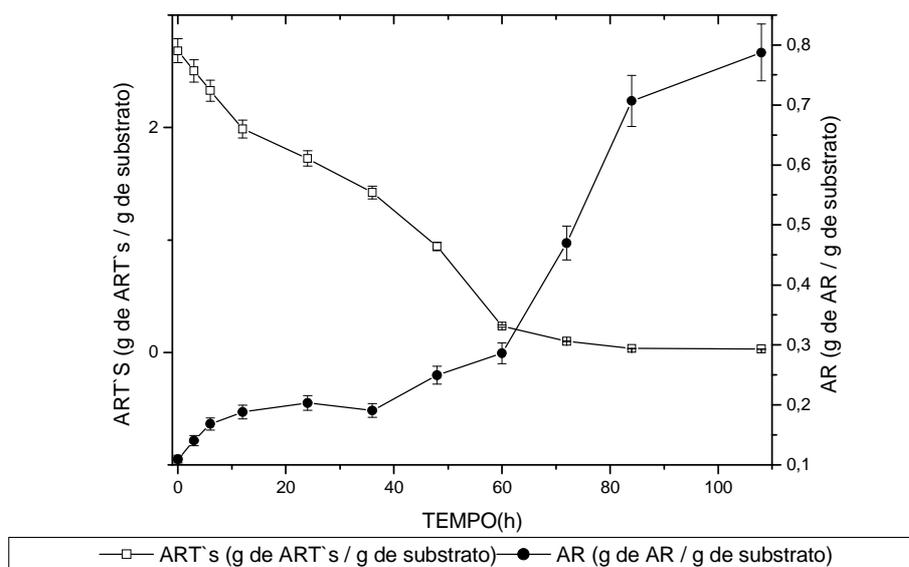


Figura 4.6 Variação dos açúcares ao longo do processo de hidrólise do bagaço de coco Tratado por oxidação úmida e alcalino, combinados.

Nas figuras 4.6a e 4.6b apresentam ajustes linear para o processo de hidrólise quando o bagaço de coco era submetido a oxidação úmida e deslignificado com NaOH, combinados. Observa-se que a hidrólise efetiva neste caso ocorre em dois momentos nos instantes até 6 horas e após as 60 horas do processo.

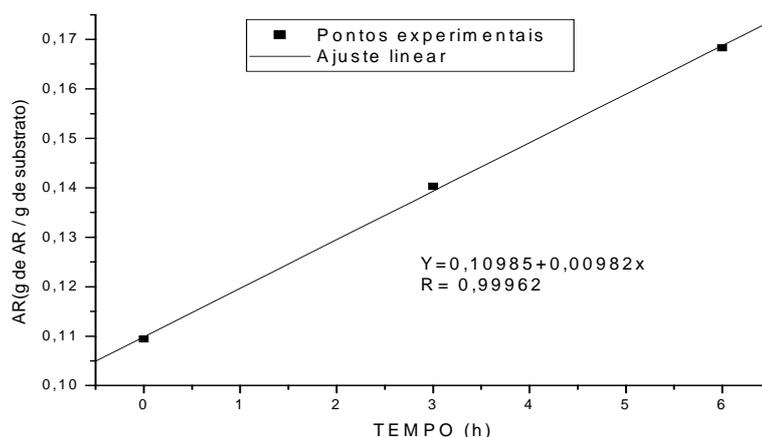


Figura 4.2.6a Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de Hidrólise do bagaço de coco submetido a oxidação úmida e alcalino com NaOH, combinados.

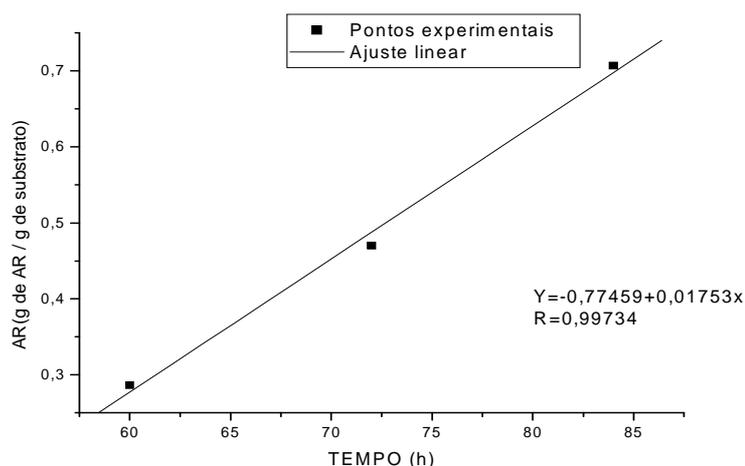


Figura 4.6b Ajuste para o cálculo da velocidade inicial de Hidrólise do bagaço de coco submetido a oxidação úmida e alcalino com NaOH, combinados.

Na figura 4.6 apresenta o perfil de hidrólise do bagaço de coco tratado alcalinamente e por explosão a alta pressão, utilizando um extrato enzimático de atividade 0,54 UI/mL de CMcase e 0,013 UI/mL de FPase Os resultados indicam que parece haver dois momentos no processo de hidrólise, observa-se que logo no início do processo teve-se uma velocidade inicial de hidrólise ainda muito baixa na ordem de 0,0098 g de AR/ g de substrato.h, porém depois do instante de 80 horas, a velocidade de hidrólise aumenta para 0,01753 g de AR/ g de substrato.h e a concentração de açúcares redutores passa ser maior do que os açúcares redutores totais, neste caso observou-se um rendimento de variação de açúcares redutores totais de 69%.

---

## **CAPÍTULO 5**

### *Conclusões*

---

## 5. Conclusões

Os extratos enzimáticos sintetizados pela linhagem *Trichoderma reesei* cultivada em meio à base de pedúnculo de caju e casca de coco apresentaram atividades enzimáticas CMCase e FPase. Verificou-se que a maiores atividades CMCase foram obtidas ao se utilizar como substrato o pedúnculo de caju tratado alcalinamente. Já quando se utilizou o bagaço de coco, as melhores atividades foram obtidas nos cultivos que se utilizou como substrato, o bagaço de coco tratado por oxidação úmida.

Com relação atividade FPase obteve-se melhor resultado quando utilizou como substrato o bagaço de pedúnculo de caju submetido aos dois tratamentos combinados. Quando se utilizou o pedúnculo de caju apenas a oxidação úmida não foi observado atividade FPase. Nos ensaios em que se utilizou a casca do coco como substrato as atividades de FPase foram praticamente iguais independente do pré- tratamento adotado alcalino ou a oxidação úmida.

No processo de hidrólise enzimática dos resíduos de pedúnculo de caju e casca de coco, utilizando o extrato enzimático, cultivada em meios contendo os mesmos resíduos como substrato, obtiveram bons resultados de velocidade inicial e rendimento de hidrólise. Quando se utilizou o bagaço de pedúnculo de caju tratado alcalinamente com NaOH ou ainda com os dois tratamentos combinados, oxidação úmida e alcalino, observou-se maiores velocidades iniciais de hidrólise e maiores rendimento. Entretanto, para o bagaço de casca de coco, os melhores resultados de velocidade inicial e rendimento de hidrólise, foram obtidos, quando se utilizou o tratamento de oxidação úmida.

---

## **CAPÍTULO 6**

### ***Referências Bibliográficas***

---

## 6. Referências Bibliográficas

APCC. Coconut Statistical Yearbook. Jakarta: Asian and Pacific Coconut Community, 1996, 273 p.

ADSUL, M. G.; GHULEB, J. E.; SINGHB, R.; SHAIKHB, H. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 67-72, 2004.

ARAGÃO, W. M. (Ed.) COCO: pós-colheita. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2002. 76 p. il.; color (Frutas do Brasil, 29).

AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen-peroxide for enzymatic-hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, v. 24 (4), p. 421-433, 1989.

BALLESTEROS, M. Estado del desarrollo tecnológico del aprovechamiento de biomassa: Biocombustibles para el sector del transporte. *Energía*, v.161, p.29-34, 2001.

Badhan, A.K.; Chadha, B.S.; Kaur, J.; Saini, H.S.; Bhat, M.K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 504-510, 2007.

BISARIA, VS; GHOSE, TK. Biodegradation of cellulosic materials - substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 3, ed. 2, p. 90-104, 1981.

BJERRE, A.B., OLESEN, A.B., FERNQVIST, T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, p. 568-577, 1996.

CAMPOS, A.R.N. Enriquecimento protéico do bagaço do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação semi-sólida. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campina Grande, Brasil, 2003.

DILLON, A. J. P. Celulases. In: *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. p. 243-269.

ERENO, D. Álcool de Celulose. *Pesquisa Fapesp*, 133, p. 29-31, 2007

FAN, L.T., LEE, Y.H., GHARPURAY, M.M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochemistry Eng* v. 23, p.158-187, 1982.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. In: *Cellulose Hydrolysis Biotechnology Monographs*. Springer, Berlin, p. 57, 1987.

FOCHER, B.; MARZETTI, A.; CRESCENZI, V. *Steam Explosion Techniques: Fundamentals and Industrial Applications*. Gordon and Breach, Reading, UK, p. 413, 1988.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

GRETHLEIN, H. E.; CONVERSE, A. O. Common aspects of acid prehydrolysis and steam explosion for pretreating wood. *Bioresource Technology*, v. 36, p. 77-82, 1991.

GHOSH, P.; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. *Adv. Applied Microbiology*, v. 39, p. 295-333, 1993.

GUEDES, R. C. *Estudo da influência de pré-tratamentos de dois resíduos lignocelulósicos (bagaço do pedúnculo de caju e casca de coco) utilizados como substrato na indução à síntese de enzimas celulolíticas*. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado na área de engenharia química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

HASSUANI, S. J. Biomass power generation: sugar cane bagasse and trash/Suleiman José Hassuani, Manoel Regis Lima Verde Leal, Isaías de Carvalho Macedo – Piracicaba: *PNUD-CTC*, 2005. p.217. (Série Caminhos para Sustentabilidade).

HINMAN, N.D.; SCHELL, D.J.; RILEY, C.J.; BERGERON, P.W.; WALTER, P.J. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Applied and Biochemistry Biotechnology*, v. 34/35, p. 639–649, 1992

KANSOH, A. L.; ESSAM, S. A.; ZEINAT, A. N. Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reesei*. *Polymer Degradation and Stability*, v. 63, p. 273-278, 1999.

KISS, J. Reforma na casa. *Revista Global Rural*, v.233, p.58-63, 2005.

KIRK, T. K.; FARRELL, R.L. Enzymatic “combustion”: The microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, p. 465-505, 1987.

LEATHERS, T.D., Bioconversions of Maize Residues to Value-Added Coproducts using Yeast-Like Fungi, *FEMS Yeast Research.*, 3:133-140, 2003.

LEE, D., YU, A. H. C., WONG, K. K. Y., *et al.* Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45/45:407–415, 1994.

LYND, L. R., ELANDER, R. T., WYMAN, C. E. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57/58:741–761, 1996.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, v. 4, p. 324–329, 2001.

MILLET, M. A.; BAKER, A. J.; SCATTER, L. D. Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*, v. 6, p. 125–153, 1986.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., DRESCHER R., *et al.* *Principles and economics of pretreating cellulose in water for ethanol production*, Paper 103, BIOT Division, 225<sup>th</sup> American Chemical Society Meeting, New Orleans, 26 March 2003, 2003a.

MOSIER, N. S., HENDRICKSON, R., WELCH, G., *et al.* *Corn fiber pretreatment scaleup and evaluation in an industrial corn to ethanol facility*. Paper 6A-04, 25<sup>th</sup> Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Breckenridge, CO, 2003b.

MCMILLAN, J. D. *Pretreatment of lignocellulosic biomass*. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J. O.; OVEREND, R. P. (Eds.). *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. Washington: American Chemical Society, DC, 1994. p.292 – 324.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme Microbiology Technology*, v. 18, p. 312-331, 1996.

OLIVEIRA, V. H.; ANDRADE, A. P. S. *Produção integrada de caju. Abrindo portas para a qualidade. Caderno de campo*. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT, 2004.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. *Adv. Biochemistry Eng*, v. 38, p. 53-87, 1989.

PHILIPPIDIS, G. P.; SMITH, T. K.; WYMAN, C. E. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 41, p. 846–853, 1993.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado na área de desenvolvimento de processos químicos. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2007.

RAMOS, L. P.; SADDLER, J. N. Bioconversion of wood residues: Mechanisms involved in pretreating and hydrolyzing lignocellulosic materials. In: M. e. HIMMEL, J. O. BAKER, AND R. P. OVEREND (eds), *Enzymatic conversion of biomass for fuels production*. ACS Symposium Series, n. 566. American Chemical Society, Washington, DC. p. 325-341, 1994.

RILEY, C., *Bioethanol: A Renewable Transportation Fuel from Biomass*, AIChE Spring Conference, 2002.

SANCHO, S. O. Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SUN, Y.; CHENG, J.; *Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review*, *Bioresource Technology*, v. 83 (2002) 1-11.

SILVA, J.C., SOUTO-MAIOR, A.M., GOUVEIA, E.R. Influência da Composição do Meio de Cultura Contendo Bagaço de Cana-de-açúcar na Produção de Celulases por Actinomicetos. *XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2008.

SILVA, F.C. da. (Org.) *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia/ Rio de Janeiro: Embrapa Solos; Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 1999. 370 p.

SIVERS, M. V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*, v. 51, p. 43–52, 1995.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, 10(5/6):367-375, 1996.

TARKOW, H.; FEIST, W.C. In: A Mechanism for Improving the Digestibility of Lignocellulosic Materials with Dilute Alkali and Liquid NH<sub>3</sub>. *Advance Chemistry Series 95*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 197–218, 1969.

THIEMANN, J.E., XAVIER, M.S.S.P., COLEN, G. & GUIA, M.M. 1980. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. *In Fermentações Industriais e Transformações Microbianas no solo* (J.S. Furtado, coord.). Sociedade Brasileira de Microbiologia, São Paulo, p.168-185.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, an opportunities. *Bioresour. Technol.*, 50:3-16, 1994.

WOOD, T. M.; GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. *Biodegradation*. Netherlands, v.1, n. 2/3, p. 147-167, 1990.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. In: Wood, W.A., Kellogg, S.T. (Eds.). *Methods in Enzymology*, v. 160, p. 3-11, 1988.

XIONG, H., WEYMARN, N., LEISOLA, M., TURUNEN, O. (2004), Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Process Biochemistry*, 39: 729–733.

---

## *Anexos*

---

**Anexo1:**Tabela A.1. Pontos experimentais para construção da curva do DNS ( $\mu\text{mol/mL}$ )

Glicose ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs 1	Abs 2	Abs (Média)
1	0,001	0,012	0,007
2	0,102	0,113	0,108
3	0,221	0,232	0,227
4	0,345	0,333	0,339
5	0,462	0,411	0,437
6	0,546	0,512	0,529
7	0,636	0,653	0,645
8	0,766	0,779	0,773
10	1,050	1,046	1,048
11	1,188	1,195	1,192
12	1,284	1,249	1,267
13	1,433	1,449	1,441
14	1,557	1,567	1,562
15	1,667	1,673	1,670

Tabela A.2. Pontos experimentais para construção da curva do DNS (mg/mL)

Glicose (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs (Média)
0,18	0,001	0,012	0,007
0,36	0,102	0,113	0,108
0,54	0,221	0,232	0,227
0,72	0,345	0,333	0,339
0,90	0,462	0,411	0,437
1,08	0,546	0,512	0,529
1,26	0,636	0,653	0,645
1,44	0,766	0,779	0,773
1,80	1,050	1,046	1,048
1,98	1,188	1,195	1,192
2,16	1,284	1,249	1,267
2,34	1,433	1,449	1,441
2,52	1,557	1,567	1,562
2,70	1,667	1,673	1,670

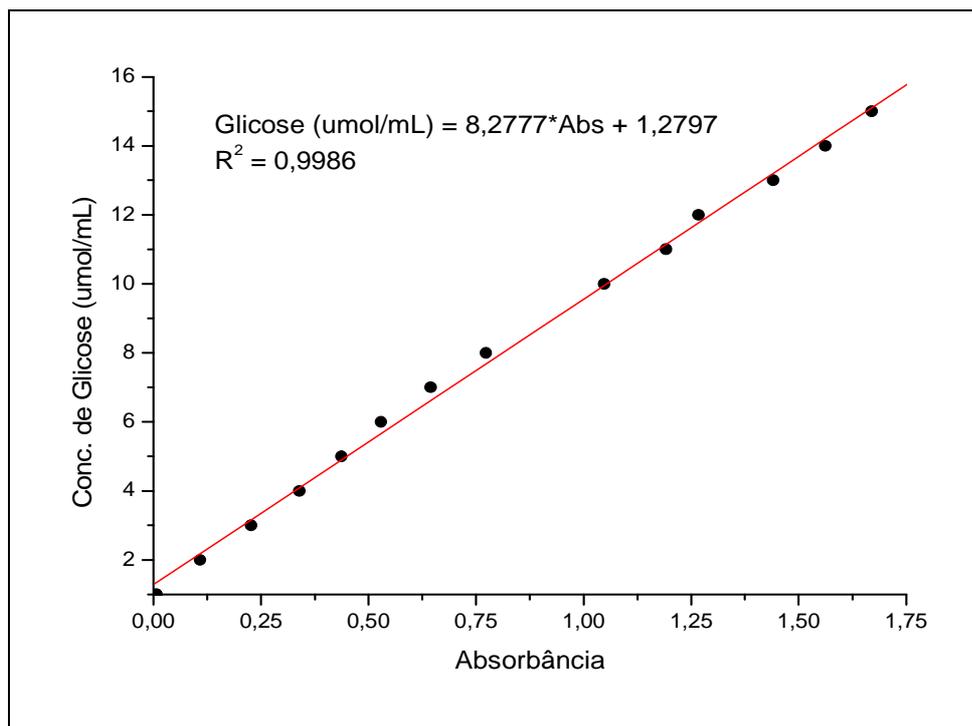


Figura A.1. Curva de calibração do DNS de 04/12/2008 (μmol/mL)

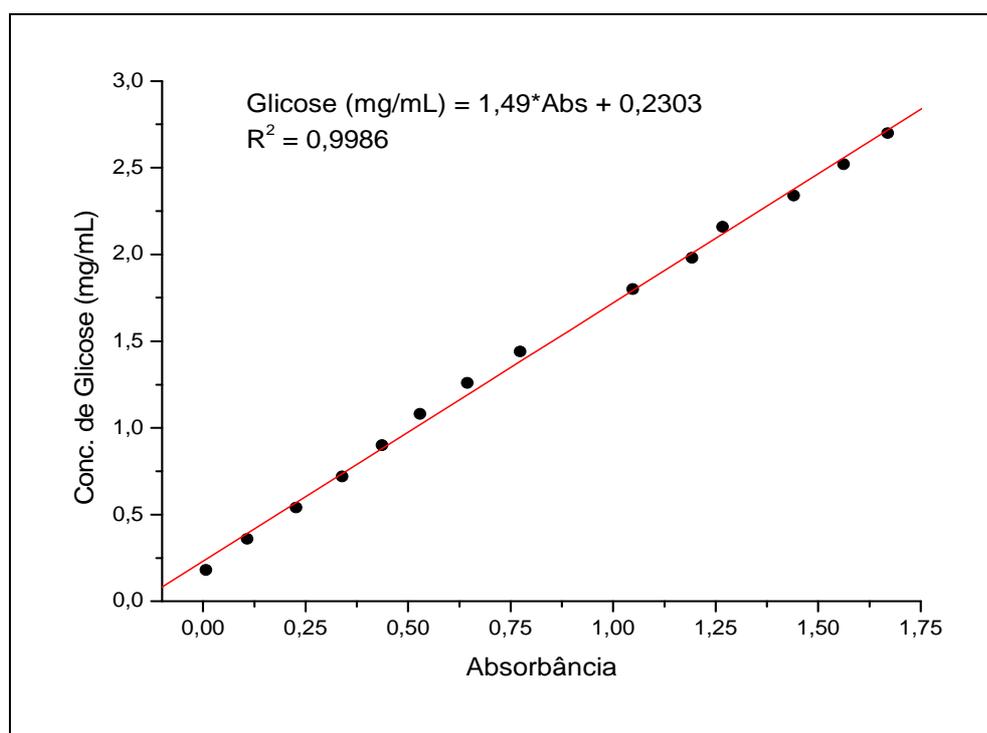


Figura A.2. Curva de calibração do DNS de 04/12/2008 (mg/mL)

Tabela A.3. Pontos experimentais para construção da curva do DNS ( $\mu\text{mol/mL}$ )

Glicose ( $\mu\text{mol/mL}$ )	Abs 1	Abs 2	Abs (Média)
1	0,093	0,097	0,095
2	0,212	0,204	0,208
3	0,300	0,303	0,302
4	0,401	0,394	0,398
5	0,485	0,516	0,501
6	0,621	0,622	0,622
7	0,709	0,707	0,708
8	0,771	0,794	0,783
9	0,961	0,963	0,962
10	1,096	1,077	1,087
11	1,137	1,148	1,143
12	1,301	1,341	1,321
13	1,403	1,437	1,420
14	1,506	1,584	1,545

Tabela A.4. Pontos experimentais para construção da curva do DNS (mg/mL)

Glicose (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs (Média)
0,18	0,093	0,097	0,095
0,36	0,212	0,204	0,208
0,54	0,300	0,303	0,302
0,72	0,401	0,394	0,398
0,90	0,485	0,516	0,501
1,08	0,621	0,622	0,622
1,26	0,709	0,707	0,708
1,44	0,771	0,794	0,783
1,62	0,961	0,963	0,962
1,80	1,096	1,077	1,087
1,98	1,137	1,148	1,143
2,16	1,301	1,341	1,321
2,34	1,403	1,437	1,420
2,52	1,506	1,584	1,545

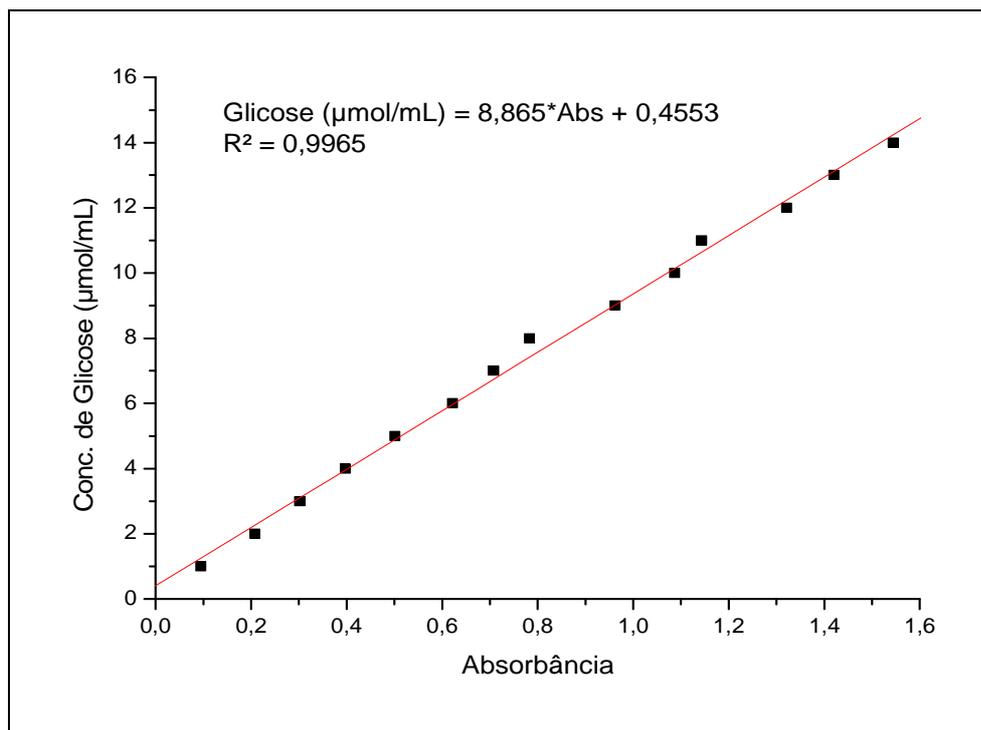


Figura A.3. Curva de calibração do DNS de 24/08/2009 ( $\mu\text{mol/mL}$ )

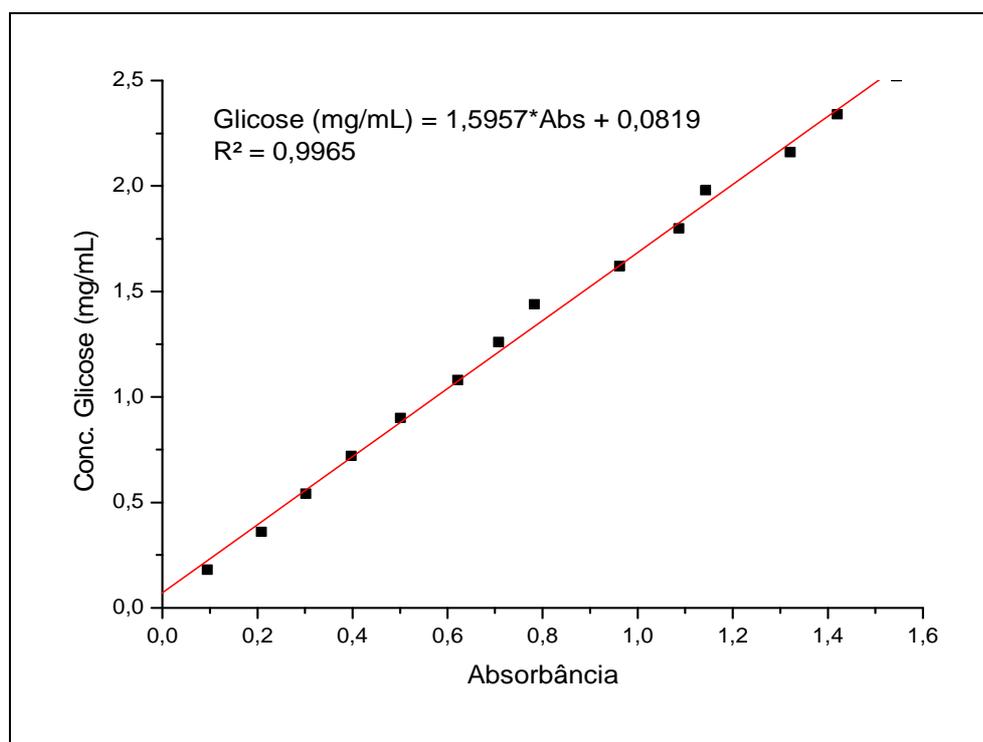


Figura A.4. Curva de calibração do DNS de 24/08/2009 ( $\text{mg/mL}$ )

## **Anexo 2:**

Equação 1 :  $Y=0,24614+0,09401x$  .:  $R=0,99985$  (Ajuste para o bagaço de pedúnculo de caju tratado alcalinamente com NaOH)

Equação 2 :  $Y=0,26566+0,01796x$  .:  $R=0,9672$  (Ajuste para o bagaço de pedúnculo de caju submetido a oxidação úmida)

Equação 3 :  $Y=0,14875+0,04626x$  .:  $R=0,99962$  (Ajuste para o bagaço de pedúnculo de caju submetidos aos dois tratamentos combinados, oxidação úmida e alcalino)

Equação 4 :  $Y=0,51754+0,02527x$  .:  $R=0,99037$  (Ajuste para o bagaço de casca de coco tratado alcalinamente com NaOH ).

Equação 5 :  $Y = 0,32532+0,02858x$  .:  $R =0,97447$  (Ajuste para o bagaço de casca de coco submetido ao tratamento de oxidação úmida).

Equação 6 :  $Y=0,10985+0,00982x$  .:  $R= 0,99962$  (Ajuste para o bagaço de casca de coco submetidos aos dois tratamentos combinados, oxidação úmida e alcalino)

Equação 6.1 :  $Y=-0,77459+0,01753x$  .:  $R=0,99734$  (Ajuste para o bagaço de casca de coco submetidos aos dois tratamentos combinados, oxidação úmida e alcalino)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)