

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *Typha domingensis* E
QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE GERADA A PARTIR DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Flávio Sampaio de Campos Rodrigues

Sorocaba-SP
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *Typha domingensis* E
QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE GERADA A PARTIR DE HIDRÓLISE ÁCIDA

Flávio Sampaio de Campos Rodrigues

Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Botaro

Co-orientador: Prof. Dr. Aparecido Junior de Menezes

Sorocaba-SP

2014

R696a Rodrigues, Flávio Sampaio de Campos.
Análise da composição química da *Typha domingensis* e
quantificação de glicose gerada a partir de hidrólise ácida / Flávio
Sampaio de Campos Rodrigues. -- 2014.
75 f. : 28 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos,
Campus Sorocaba, Sorocaba, 2014

Orientador: Vagner Roberto Botaro

Banca examinadora: Marystela Ferreira, Leonardo Fernandes
Fraceto

Bibliografia

1. Química analítica. 2. Celulose. 3. Biocombustíveis. I. Título. II.
Sorocaba-Universidade Federal de São Carlos.

CDD 543

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do *Campus* de Sorocaba.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FLÁVIO SAMPAIO DE CAMPOS RODRIGUES

**“ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *TYPHA DOMINGENSIS* E
QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE GERADA A PARTIR DE HIDRÓLISE ÁCIDA”**

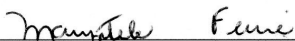
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais - PPGCM, para obtenção do título de mestre em Ciência dos Materiais. Área de concentração Materiais Funcionais e Polímeros de Fontes Renováveis, da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 19 de fevereiro de 2014.

Orientador(a)



Prof (a). Dr. (a) Vagner Roberto Botaro
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Marystela Ferreira
UFSCar – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba

Examinador(a)



Prof (a). Dr.(a) Leonardo Fernandes Fraceto
Unesp – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus Sorocaba



Dedico este trabalho

Aos meus pais, Flávio e Roseli, por sempre acreditarem em mim!

A minha esposa Bruna, pelo seu apoio e paciência!

A toda minha família, por todo carinho e ajuda ao longo deste período!!

Aos meus amigos!

VITAE DO CANDIDATO

Química – licenciatura Plena, pela UNIVERSIDADE DE SOROCABA

–

UNISO
(2009)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Roseli, pela paciência, amor, apoio, ajuda, por sempre me incentivarem e torcerem por mim.

A minha esposa Bruna pela paciência, apoio e incentivo.

Aos meus queridos amigos (Amanda, Mônica, Marcos, Renato, Matias, Almir, Juliana, Sérgio, Fernando, Rogério, Isis, Lucio, Lucas, etc...), obrigado pelas risadas, alegrias, por sempre estar apoiando, por sempre torcerem por mim... Enfim, obrigado pela Amizade!

Ao meu orientador Prof. Dr. Vagner Botaro, por me aceitar como seu aluno, por me direcionar a um projeto de pesquisa; pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência infinita... Muito Obrigado!

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Aparecido Junior de Menezes, por ter me orientado, pela paciência, por sempre ter me ajudado esclarecendo dúvidas, me ensinando obrigado por Tudo!

Aos Professores Dr. Walter, Dra. Marystela e Dr. Francisco por ter me ajudado todas as vezes que eu procurei, pelos livros, gráficos, idéias...

Começo

*Lembraí do tempo que levastes para chegar aqui,
de todas as vitórias e lágrimas,
de todos os sorrisos e fracassos.*

*Lembraí dos sonhos realizados,
das frustrações,
das decepções colhidas.*

*Lembraí de tudo o que passou.
Ganhastes mais força,
mais sabedoria
e finalmente podes olhar para o que há diante de ti
e perceber
que apenas chegastes ao começo.
- Seja bem vindo ao começo!*

Augusto Branco

RESUMO

Rodrigues, F. S. C. **Análise da composição química da *Typha Domingensis* e quantificação de glicose gerada a partir de hidrólise ácida.** 2014. 75 p. (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2014.

A busca por materiais e combustíveis provenientes de fontes renováveis é uma alternativa amplamente difundida e que vêm sendo intensificada ao longo dos últimos anos. Um dos materiais mais estudados é um bio-polímero renovável proveniente das mais variadas fontes e mais abundante na natureza, denominado celulose. Em sua maioria está sendo utilizado como reforço estrutural em painéis termorrígidos (compósitos) pela indústria automobilística e aeroespacial, na confecção de tecidos usando a fibra de sisal, por exemplo, e fonte energética, esteja na forma in-natura ou após tratamentos físico-químicos. A biomassa lignocelulósica é constituída basicamente por celulose (dímero glicose-glicose, denominado celobiose), hemicelulose e lignina. Como resultado do processo de hidrólise ácida controlada da celulose obtêm-se vários produtos, dentre eles sacarídeos que podem ser recuperados ou tratados para se obter combustíveis. A geração de energia a partir de biocombustíveis é um salto enorme em direção à sustentabilidade energética, uma vez que tal energia é renovável. Ao sugerir soluções que não sejam dependentes das capacidades finitas do nosso planeta, estamos demonstrando além da necessidade real de uma alternativa para esse problema, uma sensibilidade ambiental que até pouco tempo raramente observávamos no topo das listas de prioridades. O objetivo central deste trabalho é a análise da composição química de uma planta estudada pelo nosso grupo de pesquisa, a *Typha domingensis*, quantificar a presença de glicose após o processo de hidrólise ácida controlada e verificar sua eventual potencialidade para recuperação do sacarídeo ou produção de biocombustível a partir do mesmo. Utilizando a técnica de planejamento fatorial, para determinar a linha de experimentos mais favorável, assim como dois métodos de quantificação, um inovador e outro tradicional, obtivemos como resultado a identificação da presença de glicose após o processo de hidrólise para obtenção de whiskers, a partir da amostra jovem da macrofita *Typha domingensis*. Foi possível obter um montante de solução residual que após a retirada das fibrilas contém glicose em concentrações próximas de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$. Esses resultados revelaram um percentual de produtos valiosos com potencial de serem explorados.

Palavras-chave: Glicose. Hidrólise. Celulose. Biocombustível

ABSTRACT

Rodrigues, F. S. C. **Analysis of the chemical composition of *Typha domingensis* and quantification of glucose generated from acid hydrolysis.** 2014 75 p. (Master in Materials Science) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2014.

The search for materials and fuels from renewable sources is a widespread alternative and have been intensified over the past few years. One of the most studied material is a renewable bio-polymer from the most varied sources and more abundant in nature, called cellulose. Studies have been performed in order to extract the maximum potential of this material, which is mostly being used as structural reinforcement in thermoset panels (composite) by the automotive and aerospace industry, in the manufacture of fabrics using sisal fiber, for example, and energy source, is the in-kind form or after physical-chemical treatments. Lignocellulosic biomass consists primarily of cellulose (glucose-glucose dimer, cellobiose called), hemicellulose and lignin. As a result of the process of controlled acid hydrolysis of cellulose is obtained various products, including saccharides that can be recovered or treated to obtain fuels. The generation of energy from biofuels is a huge leap toward energy sustainability, since this energy is renewable. By suggesting solutions that are not dependent on finite capacities of our planet, we are demonstrating beyond real need for an alternative to this problem, an environmental sensitivity that until recently rarely watched the top of the list of priorities. The central objective of this work is the analysis of the chemical composition of a plant studied by our research group, the *Typha domingensis*, quantifying the presence of glucose after controlled acid hydrolysis process and verify its possible potential for recovery of saccharide or biofuel production from the same. Using the experimental design techniques to determine the most favorable experiments line, and two quantification methods, a novel and other traditional, obtained as a result of the identification of the presence of glucose after hydrolysis process to obtain whiskers from the young sample of macrophyte *Typha domingensis*. It was possible to obtain an amount of residual solution after removal of fibrils containing glucose at concentrations near 0.5 g.L^{-1} . These results revealed a percentage of valuable products with the potential to be exploited.

Keywords: Glucose. Hydrolysis. Cellulose. Biofuel

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	<i>xiii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xv</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	<i>xix</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i>	<i>xxi</i>
<i>Lista de Símbolos e Abreviaturas</i>	<i>xxiii</i>
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Hidrólise de materiais lignocelulósicos	26
2 Objetivos	29
2.1 Gerais	29
2.2 Específicos	29
2.2.1 Caracterização Química da <i>Typha domingensis</i>	29
2.2.2 Hidrolise – Estudar suas condições e rendimentos	29
2.2.3 Quantificação de glicose	29
2.2.4 Desenvolver, comparar e testar metodologias	29
2.2.5 Biocombustível	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Composição dos materiais Lignocelulósicos	32
3.2 Celulose	34
3.3 Hemicelulose	35
3.4 Lignina	37
3.5 Processamento e hidrólise da biomassa Lignocelulósica	38
3.5.1 Processos de Pré-tratamento	38
3.5.2 Processo de hidrólise	39
4 Materiais e Métodos	41
4.1 Materiais	41
4.1.1 Reagentes:	41
4.1.2 Equipamentos	42
4.2 Métodos	43
4.2.1 Fluxograma das etapas do processo	43
4.2.2 Coleta das Folhas da Macrófita <i>Typha domingensis</i>	44

4.2.3	Pré-tratamento das Fibras	45
4.2.4	Caracterização Química da Parte Central e Superior, da <i>Typha domingensis</i> , jovem.	45
4.2.4.1	Determinação do Teor de Cinzas	45
4.2.4.2	Determinação do Teor de Extrativos Solúveis em Água	46
4.2.4.3	Teor de Extrativos Solúveis em Etanol/Ciclohexano	46
4.2.4.4	Determinação do Teor de Lignina Klason Insolúvel	47
4.2.4.5	Determinação do Teor de Lignina Klason Solúvel	48
4.2.4.6	Determinação do Teor de α -celulose	49
4.2.4.7	Determinação do Teor de Holoceluloses	50
4.2.4.8	Determinação do Teor de Hemiceluloses	50
4.2.5	Tratamento Alcalino (Mercerização)	51
4.2.6	Hidrólise Ácida - Extração dos <i>Whiskers</i>	51
4.2.7	Tratamento de amostras	52
4.2.8	Método de determinação da glicose	54
4.2.8.1	Procedimento colorimétrico usado para detectar a glicose	54
4.2.8.1.1	Curva de calibração da glicose.	55
4.2.8.2	Biossensores	55
4.2.8.2.1	Preparação do filme LbL de (PEI/MP-11) ₂ /(PEI/GOx+POPG+DPPG) ₁	55
4.2.8.2.2	Procedimento usado para detectar a glicose	56
4.2.8.2.3	Mecanismo de reação e funcionamento do biossensor de glicose	56
5	<i>Resultados e Discussão</i>	59
5.1	Curva de calibração para detecção de glicose	59
5.1.1	Método Colorimétrico	59
5.1.2	Método Biossensor	60
5.2	Caracterização Química	60
5.3	Valores obtidos através do método colorimétrico	61
5.4	Valores obtidos através do método de biossensor	62
5.5	Planejamento Fatorial	65
6	<i>Conclusões</i>	69
7	<i>Referências Bibliográficas</i>	71

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Representação da Hidrólise ácida e imagem AFM das fibrilas denominada Wiskers</i>	26
<i>Figura 2: Estrutura da fibra lignocelulósica, o MEV é de uma fibra de eucalipto. (A) Divisões das paredes celulares do vegetal, (B) "Compósito" e (C) Unidade monomérica da celulose.</i>	33
<i>Figura 3: Estrutura química da celulose e suas ligações intermoleculares</i>	35
<i>Figura 4: Subprodutos que compõe a fração hemicelulósica</i>	36
<i>Figura 5: Precursores primários da molécula de lignina resultando na molécula final</i>	38
<i>Figura 6: Representação a nível molecular de hidrólise ácida da celulose</i>	40
<i>Figura 7: Folha jovem e senescente da <i>Typha domingensis</i> (A), subdivisão das folhas em parte superior, central e inferior (B).</i>	44
<i>Figura 8: Amostras de matéria prima, resíduo do processo de hidrólise ácida</i>	53
<i>Figura 9: pH-metro Hanna HI 8314</i>	53
<i>Figura 10: Esquema do processo de produção do Biosensor por deposição Layer by Layer</i>	56
<i>Figura 11: Esquema para medidas amperométricas resultadas do consumo de glicose e formação de peróxido de hidrogênio</i>	57
<i>Figura 12: Curva de calibração e equação oriunda da reação colorimétrica da glicose</i>	59
<i>Figura 13: Curva de calibração da [] de Glicose x Densidade de corrente</i>	60
<i>Figura 14: Filme 1- variação na densidade de corrente x tempo (0,0559 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)</i>	63
<i>Figura 15: Filme 2- variação na densidade de corrente x tempo (0,0473 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)</i>	64
<i>Figura 16: Filme 3- variação na densidade de corrente x tempo (0,0606 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)</i>	64
<i>Figura 17: Gráfico de Pareto</i>	68

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Composição química parcial de materiais lignocelulósicos em relação a <i>Typha domingensis</i></i>	34
<i>Tabela 2: Principais diferenças entre hemicelulose e celulose</i>	37
<i>Tabela 3: Processos geralmente empregados no pré-tratamento da biomassa para hidrólise</i>	39
<i>Tabela 4: Comparação das principais opções para hidrólise da celulose</i>	41
<i>Tabela 5: Condições de processo a que foram submetidas as amostras</i>	52
<i>Tabela 6: Concentração de Glicose x Absorbância</i>	59
<i>Tabela 7: Caracterização Química da <i>Typha Domingensis</i> em comparativo ao bagaço da cana-de-açúcar</i>	60
<i>Tabela 8: Caracterização de Hemicelulose, α-Celulose e Hemicelulose da <i>Typha Domingensis</i>. Experimentalmente em comparação ao encontrado na Literatura</i>	61
<i>Tabela 9: Condições de obtenção de glicose e concentração nas amostras – Experimento 1</i>	62
<i>Tabela 10: Condições de obtenção de glicose e concentração nas amostras – Experimento 2</i>	62
<i>Tabela 11: Resultado de um planejamento fatorial 2^3</i>	67

Lista de Símbolos e Abreviaturas

α	Alfa
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANFAVEA	Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores
β	Beta
POPG	<i>1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Palmitoil fosfatidil gliceral)</i>
μA	Micro Ampere
μL	Micro Litro
cm^2	Centímetros Quadrados
DPPG	1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (Dipalmitoil fosfatidil glicerol)
FAPRI	Food and Agricultural Policy Research Institute
g	Gramas
g.L^{-1}	Gramas por Litro
GOx	Glicose Oxidase
ITO	Indium Tin Oxide (óxido de índio dopado com estanho)
j	Joules
L	Litros
LBL	Layer-by-Layer
m	Massa
MEV	Microscopia Eletrônico de Varredura
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Mili Molar
MP-11	Microperoxidase-11
mV	Mili Volts
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
PEI	Poli(etilenoimina)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVS	Poli(vinil sulfonato de sódio)
UNICA	União da Indústria de cana-de-açúcar

1 INTRODUÇÃO

Entre 2009 e 2010 cerca de 50% da produção de sacarose de cana-de-açúcar produzida no país foi destinada para produção de açúcar e a outra metade destinada a produção de etanol. A produção de cana destinada ao etanol atingiu 1% de toda a terra arável do Brasil e cerca de 60% de todo etanol fabricado no país é proveniente do estado de São Paulo (BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008).

Um dos segmentos que mais geram biomassa como rejeito é a produção de biocombustíveis como o etanol. Usado para minimizar a dependência de combustíveis derivados de petróleo, a produção de álcool a partir de cana-de-açúcar tem sido vista como solução plausível. A elevada disponibilidade de matéria prima, somada a necessidade de uma fonte renovável para obtenção de combustíveis abre oportunidade para avanços tecnológicos que agreguem valor aos produtos da agroindústria e ao mesmo tempo auxiliem na fixação de carbono na natureza. (SILVA et al., 2009).

Devido a enorme variedade na biodiversidade as fibras possuem consideráveis variações dimensionais e mecânicas, sendo possível encontrar fibras que se encaixem nas necessidades de propriedades desejadas. (MOHANTY et al., 2000).

Um dos processos de beneficiamento desse material possibilita a produção de fibras lignocelulósicas, que nos últimos anos devido aumento de conscientização ecológica e evolução dos conceitos de sustentabilidade, vem gerando interesse ímpar por desenvolvimento de novas tecnologias. Essas fibras estão sendo utilizadas basicamente de duas maneiras: “in-natura” ou após algum processo de modificação específico visando transformações físico-químicas que possam gerar coprodutos de interesse comercial. (MARINELLI et al., 2008; THOMAS et al., 2011)

A biomassa é composta por materiais lignocelulósicos formados basicamente por celulose, hemicelulose e lignina. Estes materiais estão disponíveis nas mais variadas fontes, na população vegetal, insumos agrícolas, alimentos e como resultado de outros processos. Sendo assim é uma fonte de

matéria prima renovável, abundante, sustentável e de fácil acesso. (DEMIRBAS et al , 2011).

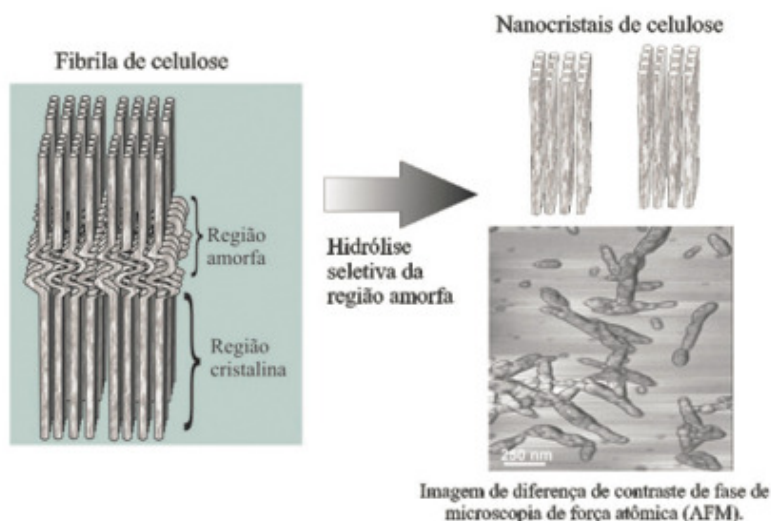
1.1 Hidrólise de materiais lignocelulósicos

A hidrólise de celulose em glicose pode ser um ponto chave no processo para utilização das fibras provenientes de biomassa, pois esse sacarídeo é facilmente convertido em vários outros subprodutos como biocombustíveis, alimentos e medicamentos (ZHEN et al., 2011).

A microfibrila de celulose apresenta regiões amorfas e cristalinas, sendo que as regiões amorfas são consideradas como imperfeições. A razão e as dimensões dos domínios cristalinos e amorfos dependem da origem vegetal do material lignocelulósico (SAMIR et al.2005, SILVA et al., 2009).

As fibrilas de celulose podem ser quebradas quando submetidas a condições controladas de hidrólise ácida resultando em pequenos monocristais (Figura 1), que são partículas altamente cristalinas denominadas de nanocristais de celulose, nanowhiskers ou whiskers (SAMIR et al., 2005; SILVA et al., 2009; THIELEMANS, et al., 2006).

Figura 1: Representação da Hidrólise ácida e imagem AFM das fibrilas denominada Wiskers



A história de plásticos reforçados com fibras começou no início do século XX com a utilização de celulose em resinas fenólicas, mas ganhou “status de commodity” com a utilização de fibras inorgânicas, fibras de vidro, em matrizes poliméricas de ureia e melamina. Hoje em dia, a indústria dos polímeros reforçados com fibras é um negócio que movimentava bilhões de dólares ao redor do mundo. Nas últimas décadas, a utilização de fibras naturais como reforços tem ganhado a atenção da comunidade científica e das indústrias, como alternativa às fibras inorgânicas. (SILVA et.al., 2009).

No processo de obtenção de whiskers, etanol e outros produtos químicos úteis à partir de celulose, a hidrólise é uma das etapas do processo, principalmente para transformá-la em açúcares fermentáveis, especialmente glicose (SASAKI et al., 2012).

O processo de hidrólise ácida em celulose é utilizado na obtenção de nanocristais, conhecidos como Whiskers de celulose, obtidos através do processo químico denominado hidrólise e podem ser utilizadas em técnicas para reforço de compósitos conferindo mudanças na propriedade mecânica desses materiais. Como resultado dos processos de hidrólise e diálise para obtenção de whiskers, gera-se um montante considerável de solução residual que após a retirada das fibrilas pode conter quantidades de produtos valiosos como a glicose (HABIBI et al., 2010)

A necessidade de materiais e processos que sejam sustentáveis tem motivado o estudo intensivo de materiais obtidos de fontes renováveis. Fibras para reforço estrutural em materiais compósitos, obtenção de sacarídeos e biocombustíveis são alguns dos exemplos (PASQUINI et al., 2010)

A crescente procura por materiais sustentáveis e renováveis, aliada a ampla disponibilidade de material proveniente de biomassa no país, direcionaram uma grande vertente de pesquisa para o desenvolvimento de processos visando o máximo aproveitamento de fibras lignocelulósicas. Estes estudos vêm demonstrando que produtos como whiskers para reforço polimérico em forma de compósito, assim como a obtenção de bioetanol podem ser uma solução viável a necessidade de ter uma alternativa para as fontes de combustíveis fósseis finitas.

Por fim, os produtos oriundos do processo e sub-processos de hidrólise podem ser uma valiosa fonte de elementos hoje dispensados.

2 Objetivos

2.1 Gerais

Caracterização Química da *Typha domingensis*, quantificação de glicose no resíduo do processo de hidrólise ácida para obtenção de Wiskers da biomassa branqueada de Taboa (*Typha domingensis*).

2.2 Específicos

2.2.1 Caracterização Química da *Typha domingensis*

- Determinação do teor de cinzas
- Determinação do teor de extrativos solúveis
- Determinação do teor de lignina
- Determinação do teor de celulose

2.2.2 Hidrolise – Estudar suas condições e rendimentos

Identificar o melhor método para processar a biomassa e rendimento para hidrólise ácida, usando acido diluído e menor temperatura possível.

2.2.3 Quantificação de glicose

Quantificação de glicose e sua possível recuperação, a partir de “resíduos” tratáveis oriundos do processo de produção de whiskers proveniente da hidrólise de biomassa branqueada de Taboa (*Typha domingensis*).

2.2.4 Desenvolver, comparar e testar metodologias

Testar metodologia tradicional e inovadora para quantificação da glicose que possam permitir acessibilidade à maioria dos laboratórios e processos produtivos.

2.2.5 Biocombustível

Verificar se a concentração do sacarídeo sugere ou não possibilidade de obter Bioetanol de segunda geração a partir desse resíduo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em geral, denomina-se biomassa qualquer produto de origem vegetal que dispõe de potencial energético e que pode ser processada para fornecer energia. Portanto, seriam exemplos de matérias o bagaço de cana, resíduos de serrarias, cavacos de madeira e uma ampla gama de produtos que sejam formados por celulose. A produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa tem sido considerada para atender particularmente às necessidades de transporte veicular. (ZHANG ET AL., 2007).

Segundo o *Food and Agricultural Policy Research Institute* (Fapri), a demanda mundial por etanol deverá crescer de 3,7 bilhões de litros, em 2009, para 15,7 bilhões em 2019, um aumento de 323% (FAPRI, 2010).

O bioetanol de segunda geração vem sendo produzido pela hidrólise e fermentação de materiais lignocelulósicos, mas somente nos últimos 20 anos essa tecnologia tem sido proposta para atender o mercado de combustíveis. Os principais programas de pesquisa e desenvolvimento são conduzidos nos Estados Unidos e na Europa. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO *et al.*, 2008).

Na América do Sul, o Brasil – maior exportador de etanol do mundo e o segundo maior produtor – possui 438 usinas em pleno funcionamento, produzindo 27,5 bilhões e exportando cinco bilhões de litros de etanol. Em relação ao açúcar, no comércio internacional, em 2019, a demanda internacional aumentará em 13,3%. O consumo nos países emergentes deve impulsionar cada vez mais o aumento do consumo mundial. (UNICA, 2009) (FAPRI, 2010)

Com o lançamento do carro bicombustível no mercado – em março de 2003, de acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea), nascia a possibilidade da criação de um novo programa para o biocombustível (SCANDIFFIO, 2003).

A população produz milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos anualmente. O Brasil, por exemplo, produziu em 2007 aproximadamente 400

milhões de toneladas de subprodutos agrofloretais, incluindo os resíduos gerados na indústria de celulose (PEREIRA Jr. *et al.*, 2008).

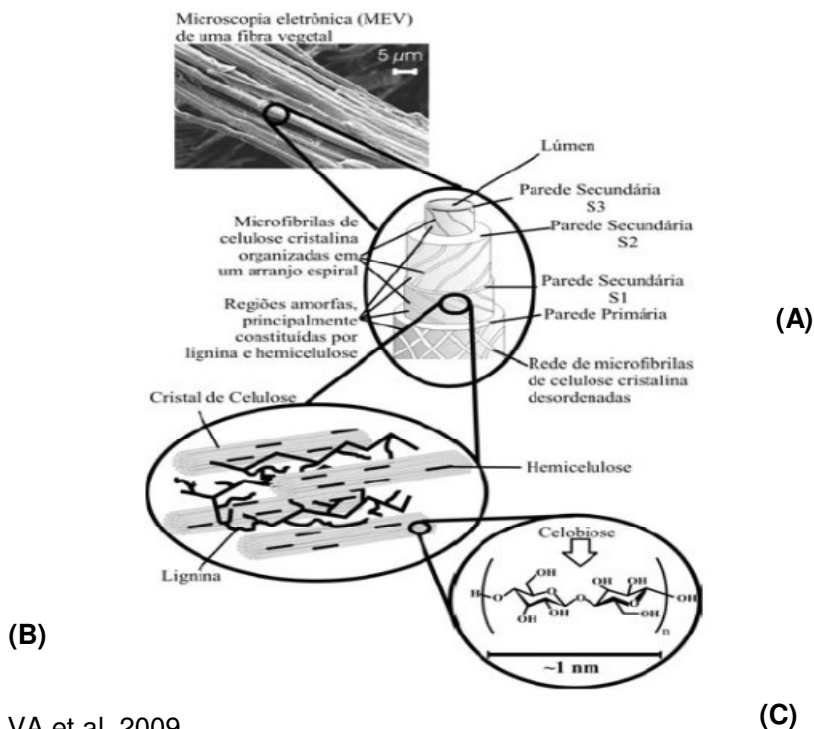
3.1 Composição dos materiais Lignocelulósicos

Os principais componentes das fibras vegetais são celulose, hemicelulose e lignina. Outros componentes também presentes, porém em menores quantidades são os compostos inorgânicos e moléculas extraíveis em solventes orgânicos; dentre estes se encontram as pectinas, os carboidratos simples, os terpenos, os alcalóides, as saponinas, os polifenólicos, as gomas, as resinas, as gorduras e as graxas, entre outros (SILVA *et al.*, 2009; MOHANTY *et al.*, 2000).

A biomassa lignocelulósica, ilustrada na Figura 2, é composta por polissacarídeos (celulose e hemicelulose) e pela lignina, polímero complexo de grupos metoxi e fenilpropânicos, que mantém as células unidas. A fração celulósica (40%-60% da matéria seca) é um polímero linear do dímero glicose-glicose (celobiose), sua hidrólise gera como um dos produtos a glicose, um açúcar de seis carbonos. Por sua vez, a fração hemicelulósica (20%-40%), em geral, é constituída de uma cadeia principal de xilose (ligações β -1,4) com várias ramificações de manose, arabinose, galactose, ácido glicurônico etc. (BIOETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008).

Em menores proporções, e dependendo da origem do vegetal, também podem ser encontrados resinas, ácidos graxos, fenóis, taninos, compostos nitrogenados e sais minerais, principalmente, de cálcio, potássio e magnésio (NEUREITER *et al.*, 2002).

Figura 2: Estrutura da fibra lignocelulósica, o MEV é de uma fibra de eucalipto. (A) Divisões das paredes celulares do vegetal, (B) “Compósito” e (C) Unidade monomérica da celulose.



Fonte: SILVA et al, 2009.

As características estruturais das fibras estão relacionadas com a natureza da celulose e à sua cristalinidade (SILVA et al., 2009).

A composição e a estrutura da biomassa têm forte influência nos rendimentos dos processos de hidrólise e fermentação. Sendo que a composição básica da biomassa lignocelulósica depende do vegetal de origem. Na Tabela 1 podem ser visualizados vários exemplos quanto à variação da composição química básica de algumas biomassas de composição lignocelulósica. Desta maneira, é importante conhecer a estrutura e as principais características dos principais componentes da biomassa lignocelulósica: celulose, hemicelulose e lignina.

Tabela 1: Composição química parcial de materiais lignocelulósicos em relação a *Typha domingensis*

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
<i>Eucalyptus grandis</i>	40,2	15,7	26,9
<i>Eucalyptus globulus</i>	46,3	17,1	22,9
<i>Typha domingensis</i>	50,2	11,5	21,2

Fonte: TAMANINI & HAULY (2004); CANETTIERI *et al.* (2001); MUSSATO & ROBERTO (2002)

3.2 Celulose

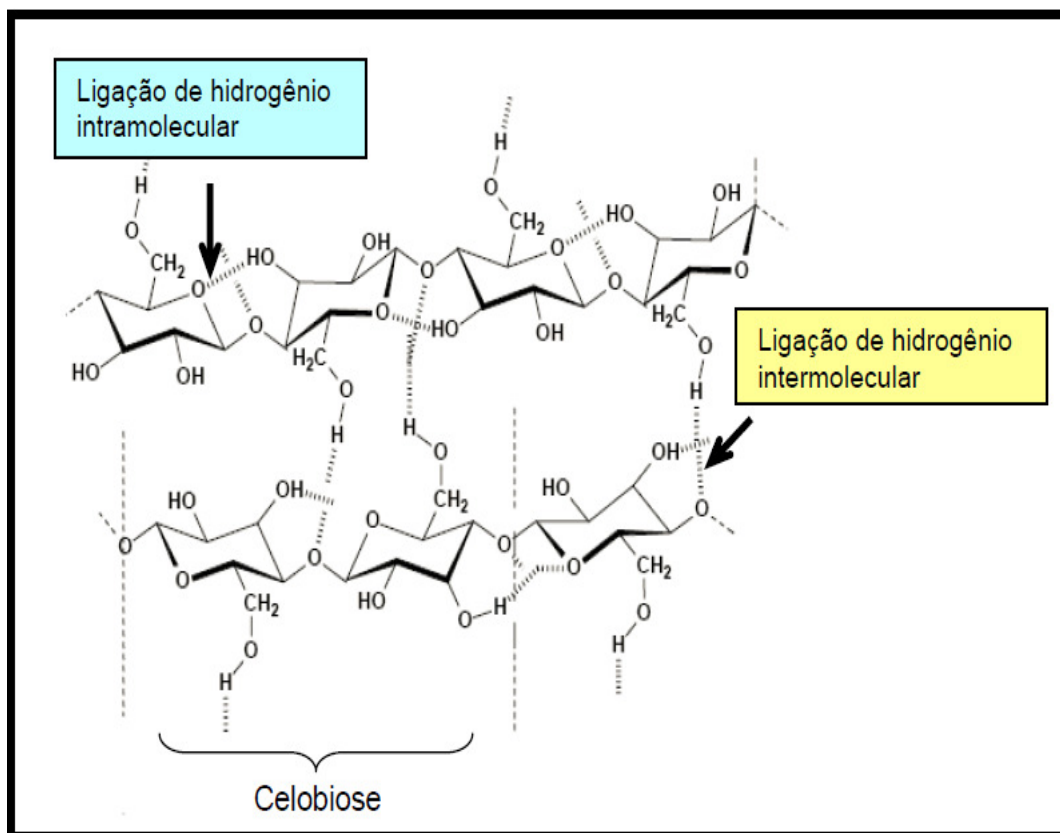
A celulose é o biopolímero mais abundante da natureza. Algumas plantas que contêm uma grande quantidade de celulose são o cânhamo, linho, juta, rami e algodão (HABIBI *et al.*, 2010).

As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez; e as ligações intramoleculares são responsáveis pela formação de fibrilas, estruturas altamente ordenadas que se associam formando as fibras de celulose. As fibrilas apresentam desde regiões com elevado grau de cristalinidade, até regiões com menor grau de ordenação, chamadas de regiões amorfas. Na região cristalina, as fibras têm maior resistência que na região amorfa, onde possui maior flexibilidade (VÁSQUEZ *et al.*, 2007).

A celulose é um polímero de cadeia longa de massa molar variável, com fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, com um valor mínimo de $n=200$ (tipicamente 300 a 700, podendo passar de 7000).

A estrutura da celulose se forma pela união de moléculas de β -glicose (uma hexosana) através de ligações β -1,4-glicosídicas, como representado na figura 3. Sua hidrólise completa produz glicose.

Figura 3: Estrutura química da celulose e suas ligações intermoleculares



Fonte: (MORAIS, 2005)

3.3 Hemicelulose

Hemicelulose são polissacarídeos (excluindo as pectinas) que estão associados à celulose e a lignina nas paredes celulares. Esta associação se deve a formação de ligações de hidrogênio com a celulose e ligações covalentes (principalmente ligações α -benzil éter) com a lignina (XU, 2010; REN e SUN, 2010; SILVA et al., 2009).

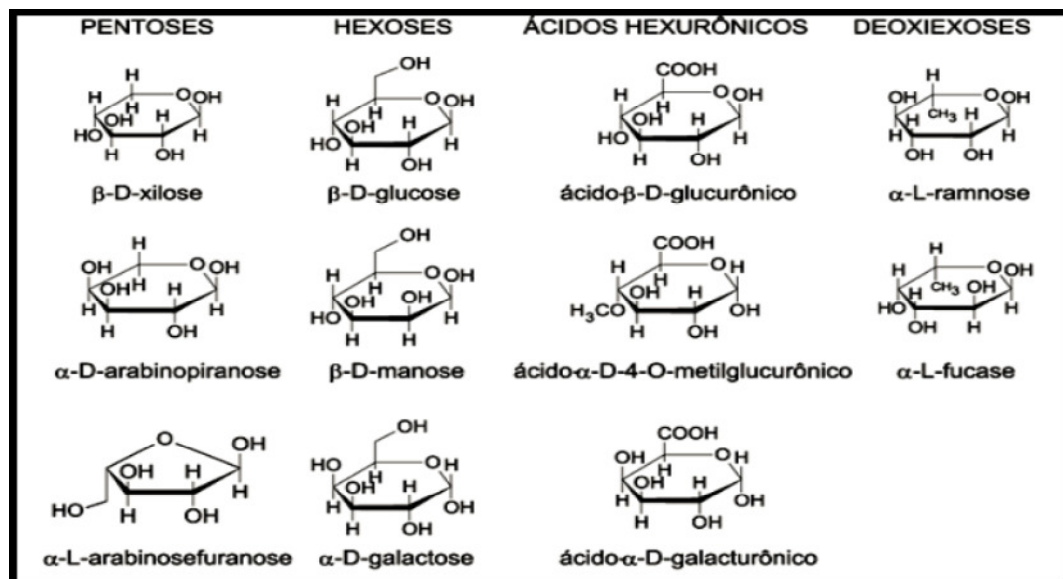
Ao contrário da celulose que é uma macromolécula formada pela policondensação de um único tipo de monossacarídeo, as hemiceluloses são constituída por heteromonossacarídeos, sendo que as diferentes unidades de

açúcares estão dispostas em diferentes proporções. Estes monossacarídeos polimerizados incluem carboidratos de cinco carbonos (pentoses, fórmula geral $C_5H_8O_4$) como a xilose e a arabinose, carboidratos de seis carbonos (hexoses, fórmula geral $C_6H_{10}O_5$) como a galactose, a glucose e a manose, ácido hexurônicos e desoxihexoses (XU, 2010; REN e SUN, 2010; SILVA et al., 2009).

A fração hemicelulósica (15% - 45% do material lignocelulósico seco) consiste em cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem principalmente aldopentoses, como xilose e arabinose, e aldohexoses, como glicose, manose e galactose (figura 4).

Diferentemente da celulose, a hemicelulose apresenta baixa massa molar (100-200 unidades glicosídicas) e não contém regiões cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições mais brandas. Porém, a fermentação dos açúcares de cinco carbonos (pentoses) ainda não é tão desenvolvida quanto os processos envolvendo a glicose (SUN et AL., 2005).

Figura 4: Subprodutos que compõe a fração hemicelulósica



Fonte: (Morais, 2005)

A Tabela 2 resume as principais características da celulose e hemicelulose. O entendimento destas características é de fundamental importância para a definição das estratégias de aproveitamento das biomassas como matérias-primas para a produção de bioetanol e de outras substâncias químicas.

Tabela 2: Principais diferenças entre hemicelulose e celulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (1000 a 15000 unidades de glicose)	Baixo grau de polimerização (60 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
É insolúvel em álcalis	É solúvel em álcalis

Fonte: PEREIRA Jr. *et al.* (2008)

3.4 Lignina

A lignina é uma macromolécula presente na composição das fibras lignocelulósicas com fração de (10% - 30%), não está relacionada a moléculas simples de açúcar e é responsável pela proteção e rigidez das plantas (LEE, *et al.*, 2011; CHUDAKOV, 1961).

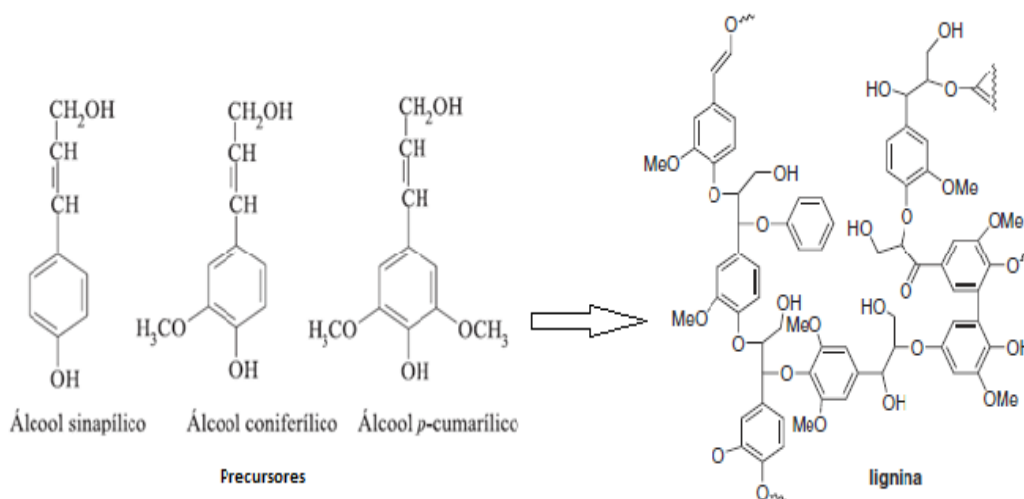
Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise, uma vez que dificulta o acesso à celulose.

Durante a biossíntese os polissacarídeos, celulose e hemicelulose, são formados e em seguida a lignina preenche os espaços entre as fibras de polissacarídeos. Este processo de lignificação provoca um enrijecimento das paredes celulares, assim os carboidratos são protegidos de possíveis danos químicos e físicos (MOHANTY *et al.*, 2000).

As estruturas das ligninas apresentam forma tridimensional e são formadas por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel

aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Estas macromoléculas são formadas pela polimerização de três diferentes monômeros: álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico Figura 5 (LEMOS, 2001).

Figura 5: Precursores primários da molécula de lignina resultando na molécula final



Fonte: Quim. Nova, 32, No. 3, 623-638, 2009

3.5 Processamento e hidrólise da biomassa Lignocelulósica

O processamento da biomassa lignocelulósica geralmente ocorre em três etapas, processo físico e químico, usualmente denominados de pré-tratamento e a hidrólise da celulose propriamente dita. As técnicas para a obtenção de bioetanol oriundo de materias lignocelulósicos abrangem a hidrólise da celulose em açúcares e sua fermentação para a produção do bioetanol. Para executar essa tarefa, essa técnica utiliza tecnologias complexas e multifásicas, com base no uso de rotas físicas, ácidas e/ou enzimáticas para a separação dos açúcares e remoção da lignina.

3.5.1 Processos de Pré-tratamento

De forma geral a primeira etapa do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, que tem como objetivo limpeza e trituração do

material, com o propósito de torná-lo mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores. A etapa seguinte consiste na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose, que rotineiramente é mencionada como pré-tratamento. Para essa etapa, existem diversos tipos de processos (tabela 3), com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes.

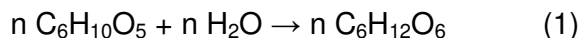
Tabela 3: Processos geralmente empregados no pré-tratamento da biomassa para hidrólise

Processo	Descrição	Tempo de Reação	Rendimento de xilose
Hidrólise Ácida	Por meio de uso de ácidos sulfúrico, clorídrico, ou nítrico, concentrados ou diluídos	2-10 min	75%-90%
Hidrólise Alcalina	Pelo uso de bases, como hidróxido de sódio ou cálcio	2 min	60%-75%
Organossolv	Uma mistura de solvente orgânico (metanol, bioetanol e acetona, por exemplo) com um catalisador ácido (H_2SO_4 , HCl) é usada para quebrar as ligações internas da lignina e da hemicelulose	40-60 min	70%-80%
Explosão de Vapor	A biomassa triturada é tratada com vapor (saturado, 160 °-260 °C) seguido de uma rápida descompressão	1-10 min	45%-65%
Termoidrólise	Utiliza água quente a alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrólise hemicelular	30 min	88%-98%

Fonte: Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável, Rio de Janeiro, Novembro de 2008

3.5.2 Processo de hidrólise

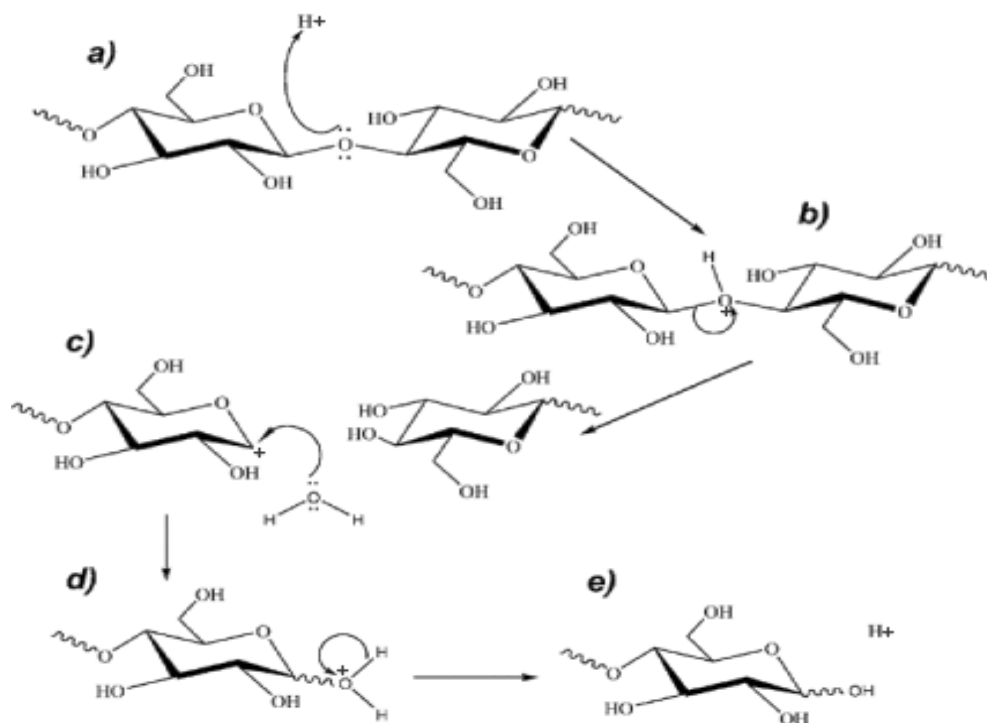
Na etapa de hidrólise celulósica propriamente dita, a celulose é convertida em glicose, segundo a equação (1), que pode ser catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas (celulase):



Em água pura a hidrólise da celulose ocorre espontaneamente, porém, de forma extremamente lenta. Ácidos ou celulase catalisam a reação de água com moléculas de glucanas liberando mono, di e/ou trissacarídeos.

A hidrólise ácida inicia com a protonação do oxigênio glicosídico (Figura 6a) com posterior quebra da ligação C1–O. O carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente sobre o oxigênio do anel glicosídico, adjacente a C1. O ataque nucleofílico da água sobre C1 (Figura 6c) com regeneração do ácido (Figura 6d e 6e) encerra a etapa de despolimerização (se esta ocorrer no interior da cadeia da celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais).

Figura 6: Representação a nível molecular de hidrólise ácida da celulose



Fonte: Hidrólise Enzimática de Biomassa - Quím. Nova vol.33 no.7-2010 (Ogeda; Petri)

A hidrólise com ácido concentrado é feita a baixas temperaturas (cerca de 30-40 °C) e resulta em rendimentos altos tanto de hexoses quanto de pentoses, causando apenas uma limitada quantidade de produtos de degradação de açúcares (Ogeda; Petri, 2010).

O ácido mais comumente utilizado é o H₂SO₄, devido ao seu menor preço e poucos problemas com corrosão quando comparado a outros ácidos, como o HCl por exemplo.

O processo com ácido diluído utiliza altas temperaturas e pressões, com tempos de reação de segundos a alguns minutos, o que facilita o uso de processos contínuos. Já os processos com ácido concentrado são conduzidos em condições mais brandas, mas com tempos de reação tipicamente mais longos Tabela 4; (Botaro, 1996) (Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável, Rio de Janeiro, Novembro de 2008).

Tabela 4: Comparação das principais opções para hidrólise da celulose

Processo	Insumo	Temperatura	Tempo	Sacarificação
Ácido diluído	<1% H ₂ SO ₄	215°C	3 min	50%-70%
Ácido concentrado	30%-70% H ₂ SO ₄	40°C	2-6 h	90%
Enzimático	Celulase	70° C	1,5 dias	75%-95%

Fonte: Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável, Rio de Janeiro, Novembro de 2008

4 Materiais e Métodos

No fluxograma a seguir (item 4.2.1), são evidenciadas de maneira simplificada, as etapas do processamento da *typha Domingensis*, hidrólise ácida, produção de whiskers e seus envolvidos.

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes:

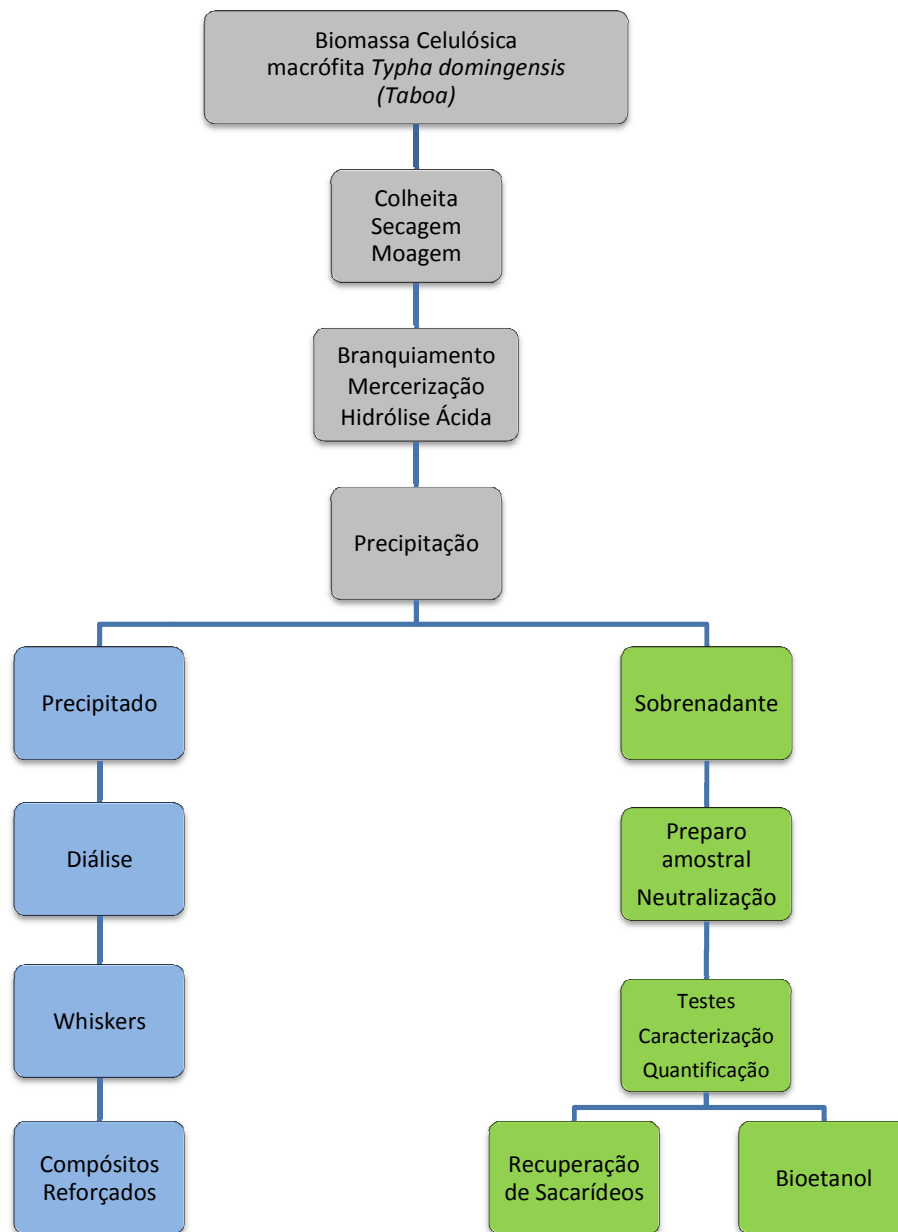
Acetona, etanol, metanol, ácido sulfúrico 95%, hidróxido de sódio, ácido acético, éter etílico, clorito de sódio, álcool etílico (Synth) e (Sigma-Aldrich) foram utilizados nos processos como recebidos.

4.1.2 Equipamentos

- Estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil)
- Moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (modelo MA-340, Marconi, Brasil)
- Forno mufla (modelo LF0212, Jung, Brasil)
- PH-metro (Hanna HI-8314)
- Kit colorimétrico para quantificação de glicose (BioTécnica ref: 10.008.00)
- Banho-maria microprocessado (Dellta 105DC)
- Micropipeta ((1-10) (10-100) (100-1000) Gilson)
- Espectrofotômetro UV-Vis (Quimis)
- Centrífuga (Centribio 80-2B)
- Balança Analítica (Marte Ay-220)

4.2 Métodos

4.2.1 Fluxograma das etapas do processo



Metodologia adotada pelo grupo de pesquisa

Metodologia e produção do pesquisador Flávio S. C. Rodrigues

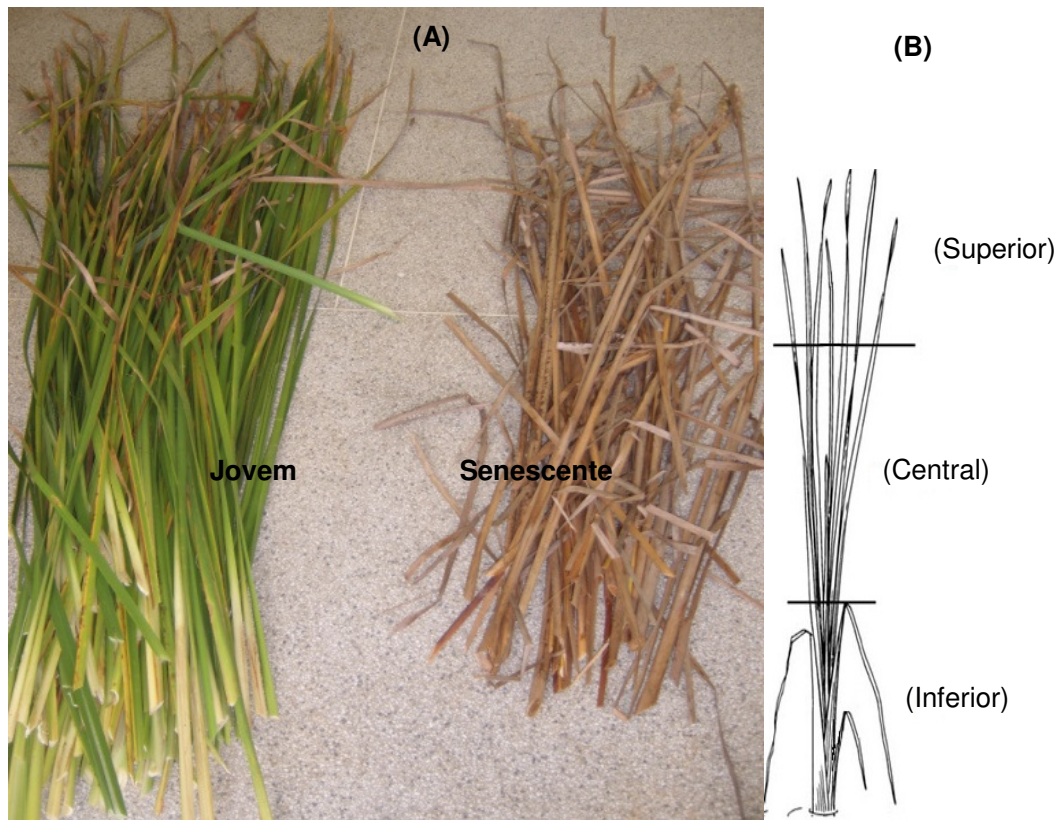
Metodologia e produção da pesquisadora Natália (Reigota N. C., 2013)

4.2.2 Coleta das Folhas da Macrófita *Typha domingensis*

Inicialmente foram coletadas na região de Sorocaba - SP, folhas jovens e senescentes da macrófita *Typha domingensis* Figura 7(A); estas folhas estavam em estágios diferentes de desenvolvimento e crescimento.

As folhas jovens e senescentes foram subdivididas em três regiões: a parte superior, a central e a inferior 7 (B). Neste trabalho foram e serão realizados experimentos com as partes centrais desta macrófita.

Figura 7: Folha jovem e senescente da *Typha domingensis* (A), subdivisão das folhas em parte superior, central e inferior (B).



Fonte: (A) Foto das folhas jovem e senescente da *Typha domingensis*, (B) Disponível em: <<http://keys.lucidcentral.org/keys/aquariumplants2/Aquarium & Pond Plants of the World /key/Aquarium & Pond Plants/Media/Html/Fact sheets/typha.html>> Acesso em: 10 de maio de 2011.

4.2.3 Pré-tratamento das Fibras

A parte central das folhas foi seca em estufa com circulação e renovação de ar (modelo 420, Nova Ética, Brasil) a $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 72h. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em um moinho de rotor vertical com facas móveis e fixas (modelo MA-340, Marconi, Brasil). As fibras trituradas foram armazenadas em sacolas plásticas e mantidas em local seco e sem iluminação.

4.2.4 Caracterização Química da Parte Central e Superior, da *Typha domingensis*, jovem.

Antes de iniciar as caracterizações químicas, a massa das amostras (partes central e superior jovem) foram medidas em uma balança analítica (SHIMADZU AY220, Marte, Brasil) e secas em a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 1h. Após a secagem as amostras foram colocadas e mantidas no dessecador até alcançarem a temperatura ambiente. Todas as determinações foram realizadas conforme normas da TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY (TAPPI).

4.2.4.1 Determinação do Teor de Cinzas

O teor de cinzas das fibras foi determinado pela norma TAPPI T211 om - 93. Foi pesado 1,0g de amostra seca e adicionada em cadinho previamente calcinado a 600°C . O cadinho foi aquecido em bico de Bunsen até que não houvesse chamas em seu interior. Este cadinho foi levado ao forno mufla (modelo LF0212, Jung, Brasil) a 600°C por 3h. Após este intervalo, o cadinho foi colocado e mantido no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida foi pesado. O teor de cinzas das amostras foi determinado pela diferença entre as massas inicial e final, de acordo com a Equação (2):

$$\%Cinzas = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: m_1 = massa (g) de cinzas, m_2 = massa (g) da amostra de taboa seca e %Cinzas = teor de cinzas em porcentagem.

4.2.4.2 Determinação do Teor de Extrativos Solúveis em Água

O teor de extrativos solúveis em água foi determinado pela norma TAPPI T212 om-98. Foi medida a massa de 5,0g de amostra seca e adicionada em 1000 mL de água deionizada. A solução foi mantida em aproximadamente 70°C sob agitação por 1h. Repetiu-se a operação trocando-se a água do sistema. Após este período de extração, a amostra foi filtrada e levada à estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12h. Após o período na estufa a amostra foi colocada no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida foi pesada. Foi calculado o teor de extrativos solúveis em água a 70°C através da diferença de massas inicial e final conforme a equação (3):

$$\%Ext.H_2O = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde: m_1 = massa (g) da amostra de taboa seca antes da extração, m_2 = massa (g) da amostra de taboa seca após a extração e %Ext.H₂O = Porcentagem do teor de extrativos solúveis das amostras de taboa em H₂O a 70°C.

4.2.4.3 Teor de Extrativos Solúveis em Etanol/Ciclohexano

O teor de extrativos solúveis em solventes orgânicos (etanol/ciclohexano) foi determinado pela norma TAPPI T207 om-93. Foi pesado 1,0g de amostra seca, a qual foi extraída em um sistema Soxhlet, utilizando-se uma mistura de ciclohexano/etanol (1:1, v:v). O período de extração foi de 48h. Após esse período, a amostra foi retirada do extrator e levada à estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por

12h. Após este período a amostra foi colocada e mantida no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida a amostra foi pesada. O teor de extrativos solúveis em ciclohexano/etanol foi calculado pela diferença de massa inicial e final, de acordo com a equação (4):

$$\%Ext_{etanol\backslash ciclohexano} = \left(\left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \right) \times 100 \quad (4)$$

Onde: m_1 = massa (g) da amostra de taboa seca antes da extração, m_2 = massa (g) da amostra de taboa seca após a extração e $\%Ext_{etanol\backslash ciclohexano}$ = porcentagem do teor de extrativos solúveis das amostras de taboa em etanol\ciclohexano 1:1 (v:v).

4.2.4.4 Determinação do Teor de Lignina Klason Insolúvel

O teor de lignina Klason insolúvel foi determinado pelo método TAPPI T222 om-02. Foi pesado cerca de 1,0g de amostra seca e colocada em almofariz com 15 mL de ácido sulfúrico (72%). A mistura foi macerada cuidadosamente por 5 minutos e mantida em repouso por um período de 24h (Botaro 2010).

Após este intervalo, a mistura foi transferida para um balão de 1L e o volume foi completado para 560 mL com água deionizada e o sistema foi mantido sob refluxo por 4h. A lignina insolúvel foi filtrada em um funil de Buchner.

O filtrado foi coletado para a determinação da lignina solúvel. A lignina insolúvel contida o funil foi seca em estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 4h. Após este período a amostra foi colocada e mantida no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida a amostra foi pesada. A porcentagem de lignina Klason insolúvel foi determinada de acordo com a equação (5):

$$\%Lignina = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) \times 100 \quad (5)$$

Onde: m_1 = massa (g) de lignina Klason insolúvel seca, m_2 = massa (g) da amostra seca inicial e %Lignina = Porcentagem do teor de lignina insolúvel.

4.2.4.5 Determinação do Teor de Lignina Klason Solúvel

O filtrado obtido na análise do teor de lignina Klason insolúvel foi analisado através de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis segundo norma TAPPI T13 m-54, modificada e adaptada por (Botaro V.R. 1996).

Para a realização desse ensaio, o filtrado obtido anteriormente foi diluído com água deionizada até que a concentração final de ácido sulfúrico fosse igual a $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$. Foi preparada uma solução de referência (branco) de ácido sulfúrico $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, a partir da solução 72%. Foram medidas as absorvâncias nos comprimentos de onda de 215 e 285nm, utilizando a espectroscopia na região do UV-visível em um espectrofotômetro UV-Vis (modelo Genesys 6, Thermo Scientific, USA). A concentração de lignina Klason solúvel foi determinada de acordo com a Equação (6), baseada na Lei de Lambert Beer:

$$C_{\frac{g}{L}} = \frac{[4,53 \times (A_{215} - A_{280})]}{300} \quad (6)$$

Onde: $C_{\frac{g}{L}}$ = concentração em g.L^{-1} de lignina Klason solúvel em amostras diluídas, A_{215} = valor da absorvância em 215nm e A_{280} = valor da absorvância em 280 nm.

Foi medido o volume do filtrado e calculado através da concentração, a massa de lignina Klason solúvel. A porcentagem de lignina Klason solúvel foi determinada de acordo com a Equação (7):

$$\%Lignina = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) \times 100 \quad (7)$$

Onde: m_1 = massa (g) de lignina Klason solúvel a partir da concentração, m_2 = massa (g) da amostra seca inicial e %Lignina = Porcentagem do teor de lignina solúvel.

4.2.4.6 Determinação do Teor de α -celulose

O teor de α -celulose foi determinado pela norma TAPPI T222 om-88. Foi pesado 1,0 g de amostra seca e esta foi transferida para um béquer, onde foram adicionados 10 mL de solução aquosa de NaOH 17,5%. O sistema foi deixado sob repouso por 2 min e as fibras trituradas foram cuidadosamente maceradas por 8 minutos.

Após este período foi acrescentado novamente 10 mL da solução de NaOH 17,5% e foi deixado em repouso por 20 minutos. Em seguida foram acrescentados 40 mL de água deionizada e realizada a filtração à vácuo. O resíduo foi lavado com 200 mL de água deionizada, 20 mL de ácido acético 20% e novamente com 200 mL de água deionizada.

A amostra retida no filtro foi levada à estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Após o período na estufa a amostra foi colocada no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida foi pesada. O teor de α -celulose foi determinado de acordo com a Equação (8):

$$\%\alpha - cellulose = \left(\frac{m_1}{m_2}\right) \times 100 \quad (8)$$

Onde: m_1 = massa (g) de α -celulose seca, m_2 = massa (g) de fibras secas e % α -celulose = Porcentagem do teor de α -celulose.

4.2.4.7 Determinação do Teor de Holoceluloses

O teor de holocelulose foi determinado pela norma TAPPI T257 om-85. Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 3,0g de amostra de fibras secas, 120 mL de água deionizada, 1,0 mL de ácido acético glacial e 2,5g de clorito de sódio.

O erlenmeyer foi tampado e mantidos sob agitação e temperatura constante de 70°C por 1h. Após este período foram novamente adicionados 1,0 mL de ácido acético glacial e 2,5 g de clorito de sódio. O procedimento de adição de ácido acético glacial e clorito de sódio foi realizado mais uma vez totalizando três horas de agitação neste meio. Em seguida, a mistura foi resfriada baixo de 10°C em banho de gelo e filtrada à vácuo.

A holocelulose (resíduo sólido) foi lavada com água deionizada até o filtrado apresentar-se incolor e a água utilizada na lavagem apresentar pH neutro. Em seguida foram borrifados metanol. O resíduo foi seco em estufa de esterilização e secagem (Nova ética, Brasil) a $105 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período na estufa a amostra foi colocada no dessecador até alcançar a temperatura ambiente, em seguida foi pesada.

O percentual de holocelulose foi obtido através da Equação (9):

$$\% \text{ holocelulose} = \left(\frac{m_1}{m_2} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde: m_1 = massa de holocelulose (g) seca, m_2 = massa de fibras secas (g) e %holocelulose = Porcentagem do teor de holocelulose.

4.2.4.8 Determinação do Teor de Hemiceluloses

O teor de hemiceluloses foi determinado pela equação (10). Utilizando-se as porcentagens de holocelulose e α -celulose determinadas nos itens 4.3.6 e 4.3.7 respectivamente (RAZERA, 2006).

$$\% \text{ de holocelulose} = \% \alpha\text{-celulose} + \% \text{ de hemicelulose} \quad (10)$$

4.2.5 Tratamento Alcalino (Mercerização)

As amostras branqueadas foram completamente submersas na solução alcalina de NaOH 2% e mantidas sob agitação constante a 80°C por 2h. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo e lavadas com água deionizada. O procedimento descrito acima foi repetido por mais três vezes e após a última lavagem com água deionizada as amostras foram armazenadas em local refrigerado. (SIQUEIRA, 2008).

4.2.6 Hidrólise Ácida - Extração dos *Whiskers*

Após a etapa de branqueamento seguido pelo tratamento alcalino, as amostras foram submetidas à hidrólise ácida.

A metodologia adotada difere das metodologias utilizadas para extrair whiskers de polpa kraft de eucalipto (H₂SO₄ 60%, a temperatura de 45°C por 30 min (TONOLI et al., 2012)), algodão (H₂SO₄ 60%, a temperatura de 45°C por 75min (TEIXEIRA et al., 2010)), ramie (H₂SO₄ 65%, a temperatura de 55°C por 30 min (MENEZES et al., 2009)) e amora (H₂SO₄ 64%, a temperatura de 60°C por 30 min (LI et al., 2009)) por exemplo.

A concentração de ácido adotada de 35% foi selecionada a partir de testes realizados com diferentes concentrações. Primeiramente foram testadas concentrações de 50%, 35% e 17,5%, nas concentrações acima de 35% ocorreu a degradação das fibras branqueadas; na concentração de 35% ocorreram as hidrólises de uma maneira controlada, as dispersões dos whiskers apresentaram-se estáveis e sem degradação. (Reigota, N.) determinou melhor condição para obtenção do mesmo como sendo: A cada 1g de celulose foram adicionados 17,5 mL de uma solução de ácido sulfúrico 34%. Estas foram mantidas sob agitação constante a 80° por 17 minutos. Após o período de reação a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos (centrífuga modelo 80-2B, Centribio, Brasil), e armazenado o sobrenadante. As amostras recebidas foram analisadas visualmente e estocadas em ambiente com refrigeração constante de 2°C à 8°C até sua eventual utilização. A partir deste variamos algumas condições Tabela 5, para verificação de influência destas na amostra, através de análise fatorial.

A análise fatorial inclui a análise de componentes principais e dos fatores comuns. É aplicada quando há um número grande de variáveis e correlacionadas entre si, com o objetivo de identificar um número menor de novas variáveis alternativas, não correlacionadas e que, de algum modo, sumarizem as informações principais das variáveis originais encontrando os fatores ou variáveis latentes. Podemos observar efeitos combinados com esse tipo de abordagem (Montgomery, 1997).

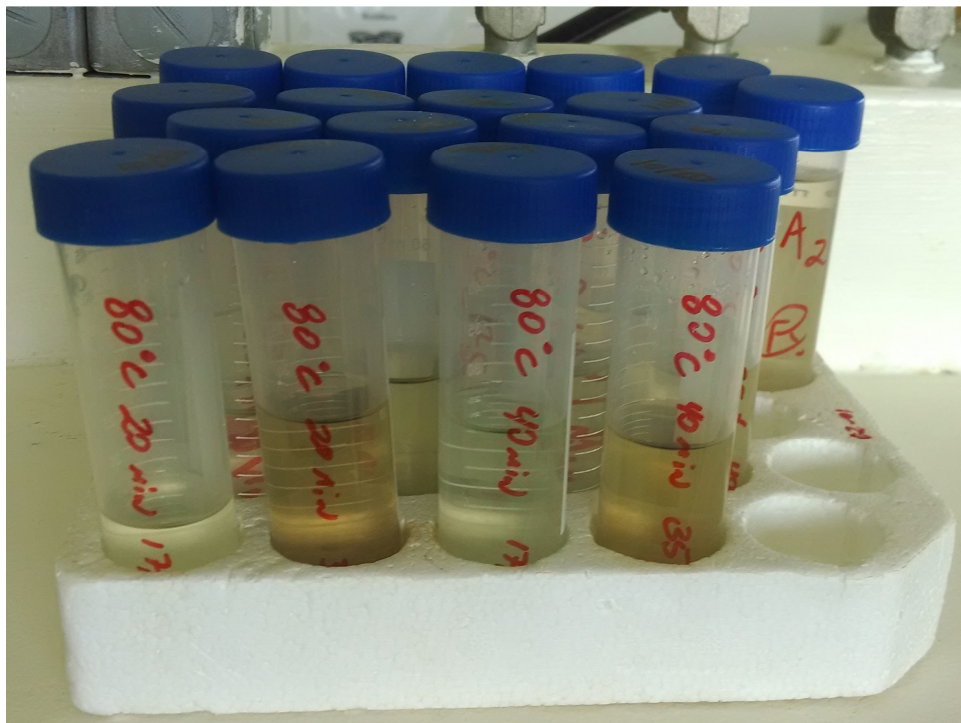
Tabela 5: Condições de processo a que foram submetidas as amostras

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração H₂SO₄ (%)
1	25	20	17,5
2	80	20	17,5
3	25	40	17,5
4	80	40	17,5
5	25	20	35
6	80	20	35
7	25	40	35
8	80	40	35

4.2.7 Tratamento de amostras

Todas as amostras de sobrenadante oriundas do processo de hidrólise, que se encontravam ácidas com pH zero, devido excesso de ácido sulfúrico, foram acondicionados em tubos de ensaio com tampa, tendo ao final oito frascos de amostras contendo 40 mL de matéria prima cada um, Figura 8.

Figura 8: Amostras de matéria prima, resíduo do processo de hidrólise ácida



As amostras em solução de característica ácida com concentração aproximada de 35% (m/v) de H_2SO_4 foram submetidas a neutralização com hidróxido de sódio 35% (m/v) até pH neutro, medidos em pHmetro da marca Hanna HI 8314 modelo Figura 9.

Figura 9: pH-metro Hanna HI 8314



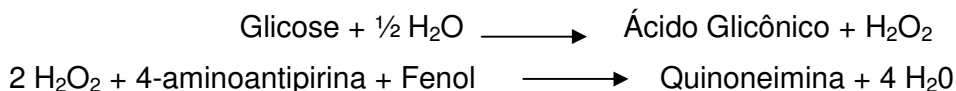
As amostras tratadas foram utilizadas para determinação da quantidade de glicose, pelo método de espectrofotometria na região do visível utilizando o teste Enzimático-Colorimétrico com glicose oxidase, detalhado no item abaixo.

4.2.8 Método de determinação da glicose

Para determinação da quantidade de glicose nas amostras foram utilizados Kits prontos da BioTécnica ref 10.008.00 que fornece os reagentes já tamponados e com as condições necessárias ao teste e posteriormente em uma das amostras escolhida como “padrão”, foi aplicado método de determinação por biossensores, desenvolvidos na UFSCar-Sorocaba pela Prof.Dra. Marystela Ferreira demonstrado no trabalho de conclusão de curso de (Graça J. S. 2013) que gerou resultados satisfatórios e um artigo já submetido e aceito.

4.2.8.1 Procedimento colorimétrico usado para detectar a glicose

A glicose oxidase catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase, o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 505nm é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.



Escolhido o método colorimétrico para quantificação do açúcar, foi efetuada a confecção da curva de absorvância x concentração, para amostras de valores conhecidos, visando a obtenção da equação que determina a curva gerada e assim a concentração das amostras desconhecidas.

4.2.8.1.1 Curva de calibração da glicose.

Uma vez que a sensibilidade do reagente colorimétrico utilizado é de 0,003 g de glicose por litro de solução e o seu coeficiente de variação esta entre 1,5% e 3 %, foi possível trabalhar com valores mínimos de concentração.

As soluções descritas foram preparadas a partir de glicose sólida, pesando-se em balança analítica a massa necessária e avolumando-se para um litro em balão volumétrico até a concentração de 1g/l e a partir deste ponto todas as concentrações subsequentes foram obtidas por diluição da solução 1g.L^{-1} .

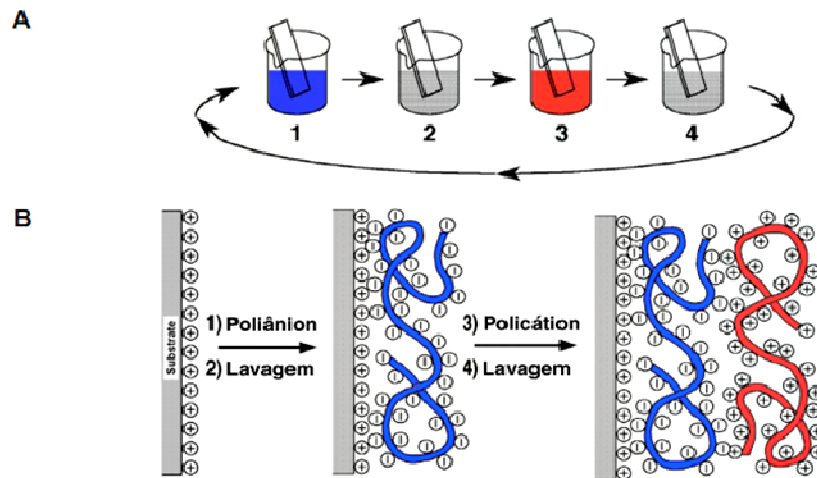
4.2.8.2 *Biossensores*

4.2.8.2.1 Preparação do filme LbL de (PEI/MP-11)₂/(PEI/GOx+POPG+DPPG)₁

Para a construção dos filmes (PEI/MP-11)₂/(PEI/GOx+POPG+DPPG)₁ a GOx foi encapsulada em lipossomo preparado a partir da mistura dos fosfolipídios POPG e DPPG na proporção de 1:4.

Depositou-se no substrato de ITO (óxido de índio dopado com estanho) duas bicamadas de colchão (PEI/PVS). Após a deposição do colchão construiu-se 2 bicamadas de filme PEI/MP-11. Sobre estas bicamadas depositou-se uma bicamada de PEI em junção com a GOx encapsulada em lipossomo (figura 10)(GRAÇA. J, 2013)

Figura 10: Esquema do processo de produção do Biosensor por deposição Layer by Layer



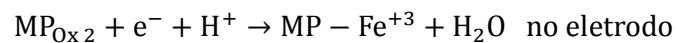
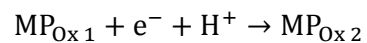
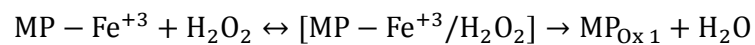
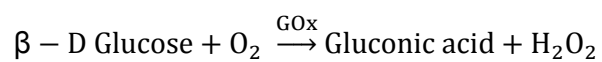
(A) Representação esquemática do processo de deposição do filme LbL sobre um substrato sólido. (B) Ilustração idealizada do filme LbL de polieletrólitos, sendo as etapas 1 e 3 a representação da adsorção do poliânion e do policátion, respectivamente, e as etapas 2 e 4 os procedimentos de lavagem (GRAÇA J., 2013)

4.2.8.2.2 Procedimento usado para detectar a glicose

A glicose foi detectada através de medidas amperométricas. Para isto usou-se como solução eletrolítica 7mL de tampão fosfato de sódio 10 mmol.L^{-1} , pH 6,3 e o potencial foi fixado em 50 mV *versus* ECS. Após a estabilização da corrente, adicionou-se alíquotas de 1000 μL da amostra 1 sob agitação (GRAÇA, J., 2013).

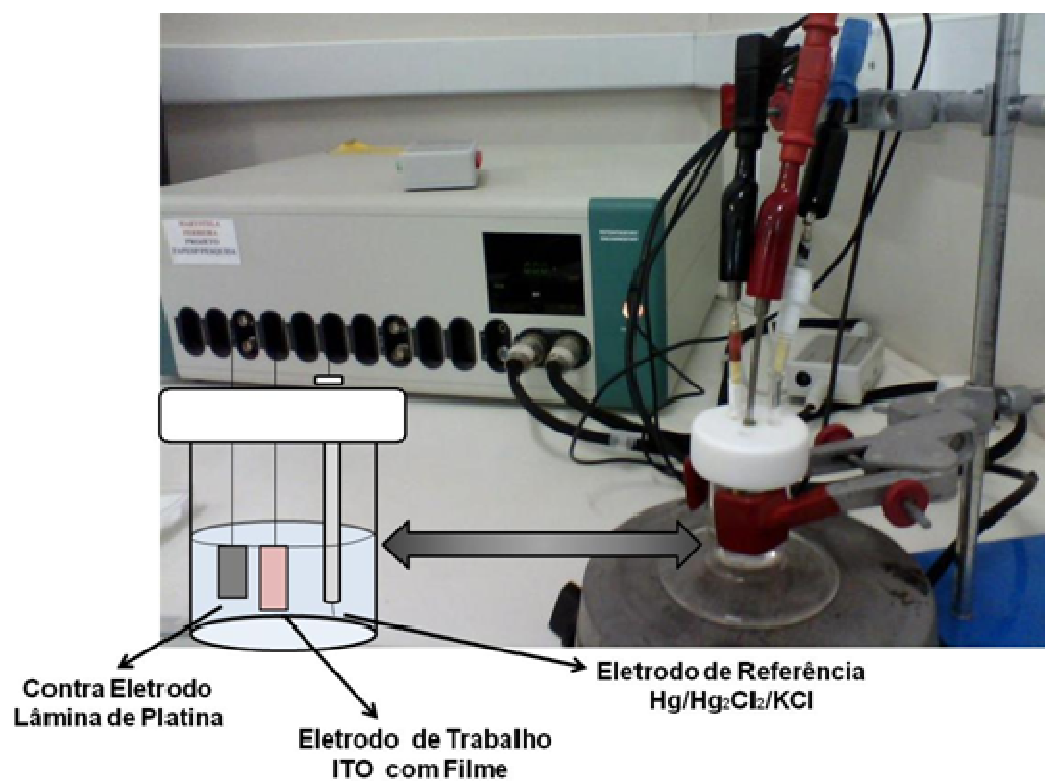
4.2.8.2.3 Mecanismo de reação e funcionamento do biossensor de glicose

O mecanismo de detecção de glicose pelo biossensor consiste em duas etapas: i) catalise de $\beta\text{-D-glucose}$ pela GOx produzindo ácido glucônico e H_2O_2 , ii) catálise do H_2O_2 pela MP-11e geração de sinal elétrico (figura 11)(GRAÇA, J.,2013).



No qual $\text{MP}_{\text{Ox}1}$ e $\text{MP}_{\text{Ox}2}$ são as duas formas intermediárias da MP-11.

Figura 11: Esquema para medidas amperométricas resultadas do consumo de glicose e formação de peróxido de hidrogênio



5 Resultados e Discussão

5.1 Curva de calibração para detecção de glicose

5.1.1 Método Colorimétrico

As soluções padrão foram preparadas a partir da diluição de uma solução de concentração 1g.L^{-1} .

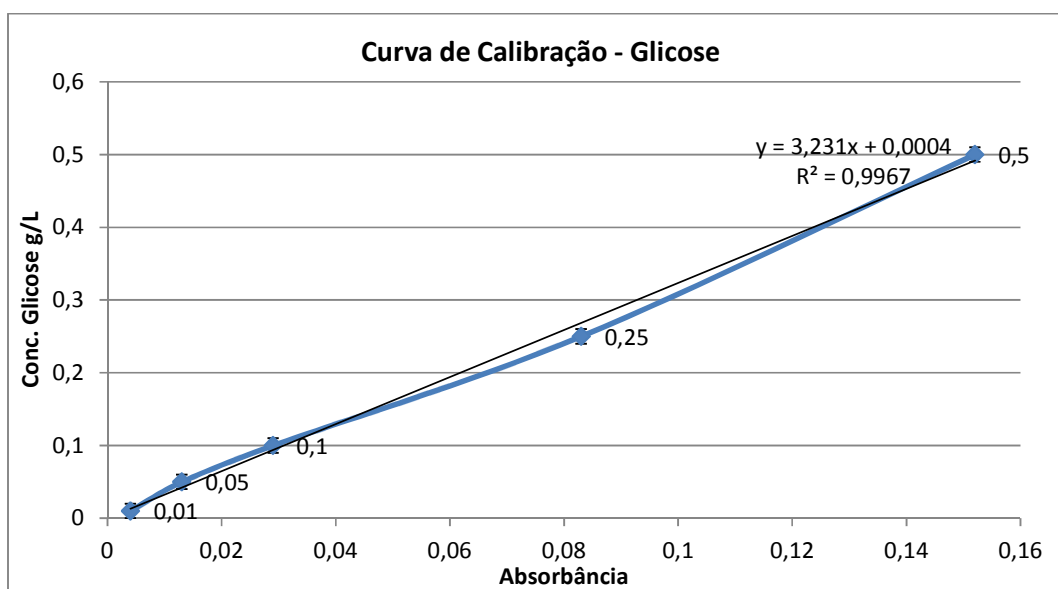
As medidas de absorbância das soluções padrão diluídas de glicose (Tabela 6), após reação colorimétrica, deram origem a curva de calibração (Figura 12).

Tabela 6: Concentração de Glicose x Absorbância

Concentração de glicose g/l	Absorbância
$0,01 \pm 0,001$	$0,004 \pm 0,001$
$0,05 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,001$
$0,10 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,001$
$0,25 \pm 0,001$	$0,083 \pm 0,001$
$0,50 \pm 0,001$	$0,152 \pm 0,001$

Os resultados de absorbância obtidos evidenciados na tabela (6) resultaram uma curva que é determinada pela equação $y=3,231x + 0,0004$ e com um R^2 de 0,9967, como pode ser visto na figura 12.

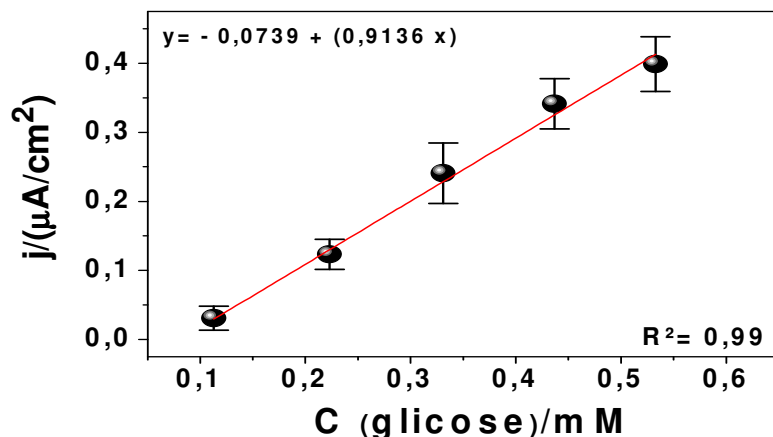
Figura 12: Curva de calibração e equação oriunda da reação colorimétrica da glicose



Limite de detecção $83,8 \pm 0,016 \mu\text{mol.L}^{-1}$

5.1.2 Método Biossensor

Figura 13: Curva de calibração da [] de Glicose x Densidade de corrente



Limite de detecção $8,6 \pm 1,1 \mu\text{mol.L}^{-1}$

5.2 Caracterização Química

As caracterizações químicas das partes centrais e superiores das folhas, jovem e senescente, encontram-se na Tabela 7:

Tabela 7: Caracterização Química da *Typha Domingensis* em comparativo ao bagaço da cana-de-açúcar

	<i>Typha domingensis</i> jovem (Superior)	<i>Typha domingensis</i> senescente (Superior)	<i>Typha domingensis</i> jovem (Central)	<i>Typha domingensis</i> senescente (Central)	Saccharum officinarum (Bagaço de Cana-de-açúcar)
Teor de cinzas (%)	4,81 \pm 0,67	4,24 \pm 0,73	8,35 \pm 0,20	4,77 \pm 0,14	1,61 \pm 0,02
Teor de umidade (%)	10,71 \pm 0,71	11,85 \pm 0,06	8,25 \pm 0,08	9,76 \pm 0,55	1,61 \pm 0,02
Extrativos solúveis em água (%)	13,89 \pm 0,13	17,09 \pm 2,54	25,21 \pm 0,69	13,80 \pm 1,52	4,10 \pm 0,07
Extrativos solúveis em cicloexano/etanol	-	-	11,54 \pm 1,33	6,14 \pm 2,19	6,13 \pm 0,04
Lignina Klason insolúvel	-	-	21,15 \pm 2,21	24,67 \pm 2,16	26,27 \pm 0,71
Lignina Klason solúvel	-	-	0,10 \pm 0,03	0,012 \pm 0,001	-
α -celulose (%)	44,59 \pm 2,89	57,97 \pm 0,54	50,16 \pm 1,09	68,44 \pm 2,84	46,86 \pm 0,22
Hemicelulose (%)	1,27 \pm 1,79	3,79 \pm 1,26	11,48 \pm 0,22	3,20 \pm 0,65	27,51 \pm 0,14
Holocelulose (%) (Hemicelulose+ α -Celulose)	45,86 \pm 3,59	61,76 \pm 1,98	61,64 \pm 0,65	71,64 \pm 1,54	74,37 \pm 0,36

Obs.: Em algumas colunas a soma não é igual a 100%, porque há sobreposição de dados nas informações apresentadas.

Os teores calculados de α -celulose, Hemicelulose e Holocelulose são respectivamente $50,16\% \pm 1,09$, $11,48\% \pm 0,44$ e $6,64\% \pm 0,65$, que são comparados a valores obtidos em artigos na Tabela 8 abaixo:

Tabela 8: Caracterização de Hemicelulose, α -Celulose e Hemicelulose da *Tipha Domingensis*. Experimentalmente em comparação ao encontrado na Literatura

	Cinzas	Umidade	Lignina	α – Celulose	Hemicelulose
Experimental	$8,35 \pm 0,20$	$8,25 \pm 0,08$	$21,15 \pm 2,21$	$50,16\% \pm 1,09$	$11,48 \pm 0,44$
CARMONA et al., 2011	\pm	\pm	$33,1 \pm 3,9$	$51,8\% \pm 1,2$	$19,5 \pm 1,2$
OLIVEIRA, 2010	3,61	6,25	9,07	36,26	26,10

A partir da Tabela é possível observar que há diferença entre os teores obtidos nos diferentes estudos. Isto ocorre devido alguns fatores como diferenças dos parâmetros climáticos e geográficos, temperatura, altitude, direção do vento, pluviosidade, tipo de solo (fator que pode impor limitações ao crescimento da planta pela capacidade de supriras necessidades de nutrientes, água e oxigênio) época e idade da planta. Danos mecânicos e ataques de pragas influenciam na concentração de nutrientes dos vegetais (HICROCE e MASCARENHAS, 1977; IMHOFF et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2005)

5.3 Valores obtidos através do método colorimétrico

As amostras com pH próximo a 7 foram acondicionadas em tubos de ensaio onde foi adicionado o reagente colorimétrico e ficaram em banho maria por 10 minutos, evidenciando assim coloração. Foram então medidas as absorbâncias em 505 nm e obtidos os resultados evidenciados nas (tabelas 9 e 10).

Tabela 9: Condições de obtenção de glicose e concentração nas amostras – Experimento 1

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Absorbância	Concentração Glicose g.L ⁻¹
1	80	20	17,5	0,015	0,0977
2	80	20	35	0,06	0,3885
3	80	40	17,5	0,03	0,1947
4	80	40	35	0,145	0,9378
5	40	20	17,5	0	0
6	40	20	35	0,005	0,0331
7	40	40	17,5	0,003	0,0202
8	40	40	35	0,017	0,1106

Tabela 10: Condições de obtenção de glicose e concentração nas amostras – Experimento 2

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração H ₂ SO ₄ (%)	Absorbância	Concentração Glicose g.L ⁻¹
1	80	20	17,5	0,011	0,0719
2	80	20	35	0,07	0,4531
3	80	40	17,5	0,026	0,1688
4	80	40	35	0,143	0,9249
5	40	20	17,5	0	0
6	40	20	35	0,004	0,0266
7	40	40	17,5	0,002	0,0137
8	40	40	35	0,015	0,0977

Após medidas das amostras, ficou evidenciado que a média das absorbâncias é de 0,06 que substituída na equação anterior, resulta na média a concentração de glicose nas amostras, que é de aproximadamente 0,4 g.L⁻¹.

5.4 Valores obtidos através do método de biossensor

A glicose foi detectada através de medidas amperométricas. Para isto usou-se como solução eletrolítica 7 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH

6,3 e o potencial foi fixado em 50 mV *versus* ECS. Após a estabilização da corrente, adicionou-se alíquotas de 1000 μL da amostra 2 do experimento 1 (Tabela 8) sob agitação.

A amostra descrita acima foi escolhida baseado no que havia sido adotado como amostra de condições padrão do nosso grupo de pesquisa e que vem sendo utilizada na maioria dos trabalhos, que é obtida por hidrólise a oitenta graus Celsius por vinte minutos em ácido de concentração trinta e cinco por cento.

A amostra em questão foi testada três vezes, em três biossensores confeccionados pelo mesmo processo, e originaram os resultados evidenciados nas (figuras 14, 15 e 16), abaixo:

Figura 14: Filme 1-variação na densidade de corrente x tempo ($0,0559 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)

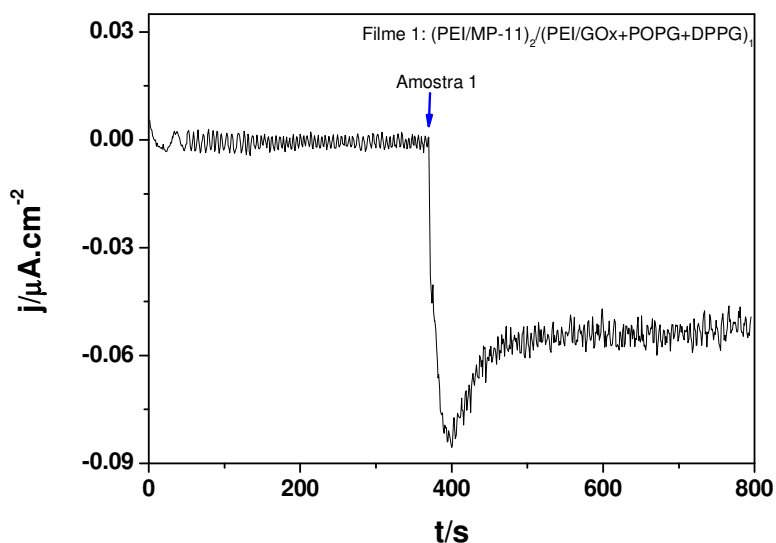
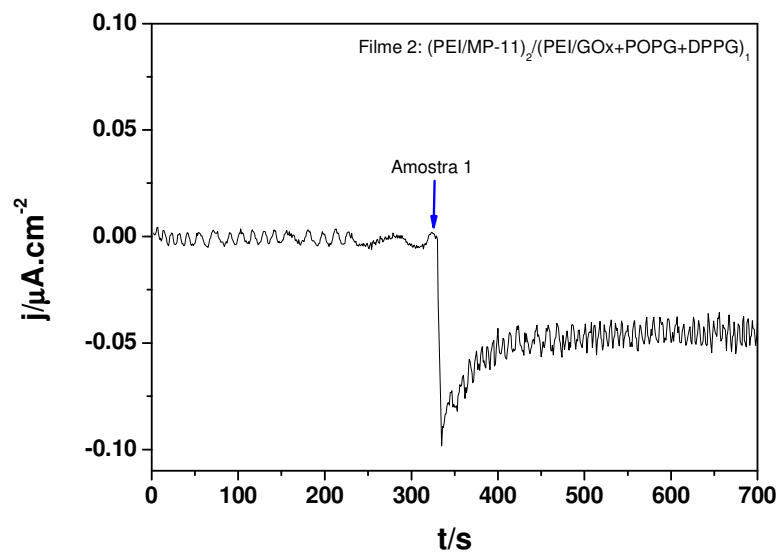
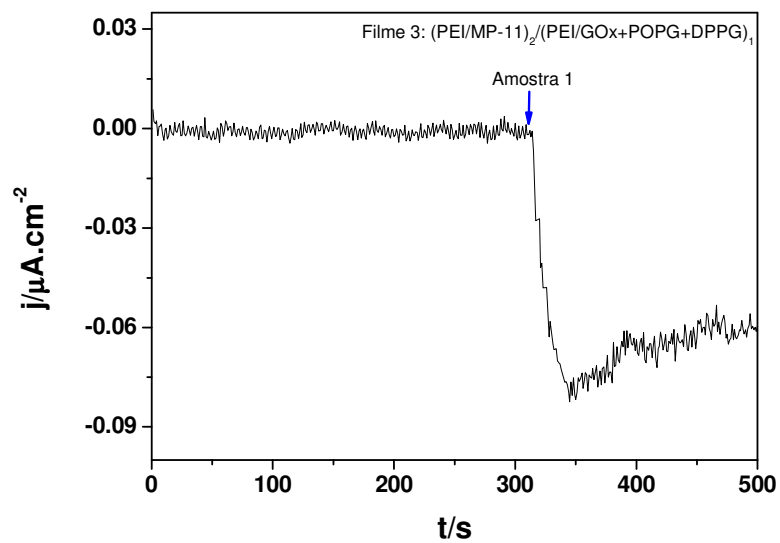


Figura 15: Filme 2-variação na densidade de corrente x tempo (0,0473 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)**Figura 16: Filme 3-variação na densidade de corrente x tempo (0,0606 $\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$)**

A media dos resultados obtidos $0,0546 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$, substituídos a equação fornecida pela curva de calibração $y = -0,0739 + (0,9136x)$ (Figura 13), nos fornece a concentração de $0,1406 \text{ mM}$ de glicose. Como foi adicionado 1 mL da amostra em 7 mL de tampão, a amostra original apresenta $1,1248 \text{ mM}$ de glicose. Uma vez que a massa molar da glicose é $180,16 \text{ g}$, foi verificado na amostra uma concentração de $0,2026 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose. Como todas as amostras partiram de 20 mL originais e foram diluídas no processo de resfriamento e neutralização, todas foram avolumadas a 40 mL para padronização, portanto a concentração de glicose na amostra inicial é de $0,4053 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Podemos notar que a concentração obtida pelos dois métodos, o colorimétrico de $0,3883 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e pelo biossensor $0,4053 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose são muito próximos, demonstrando uma diferença menor que cinco por cento entre as duas metodologias.

A metodologia colorimétrica, mesmo sendo utilizada num ambiente estranho para qual foi desenvolvida, apresentou resultado preciso. Esta metodologia foi criada para ser utilizada em sorologia sanguínea, porém não apresentou desvios nos testes reproduzidos em laboratório quando aplicada em outro veículo que não o soro sanguíneo.

A metodologia colorimétrica foi adotada por ser de fácil acesso, baixo custo e muito precisa, podendo ser utilizada nas mais variadas instalações enquanto a metodologia através do biossensor requer uma instalação mais sofisticada, porém com um limite de detecção mais apurado e uma metodologia inteiramente nova, podendo ainda ser aplicada em inúmeras possibilidades.

5.5 Planejamento Fatorial

Temos k fatores, todos eles com dois níveis. Os níveis podem ser *quantitativos* ou *qualitativos*. Uma repetição completa tem 2^k unidades experimentais.

Como esses experimentos só tem dois níveis de cada fator, eles nos dão o menor número de tratamentos, assim, eles são bastante utilizados

na seleção de fatores importantes e que serão utilizados num experimento futuro.

Para esse planejamento queremos saber qual o rendimento final de uma reação química variando a temperatura, tempo e/ou variando a concentração de um reagente.

Na linguagem estatística, existe um interesse em descobrir como a resposta (o rendimento da reação) dependerá de três fatores mencionados: da temperatura, do tempo e concentração de um reagente. Com isso o planejamento fatorial completo passará a necessitar da realização de $2^3 = 8$ ensaios. Foram adotados os níveis 40°C e 80°C para a temperatura, admitiremos duas variações de tempo 20 minutos e 40 minutos, e vamos variar a concentração do reagente de 17,5 % e 35 %. A listagem dessas combinações, que é chamada de matriz de planejamento, é apresentada na Tabela 11, juntamente com os rendimentos obtidos nos experimentos em duplicata. A matriz de planejamento lista os ensaios na ordem padrão. Todas as colunas começam com o nível inferior (-) e depois os sinais vão se alternando. Um a um na primeira coluna, - + - +..., depois dois a dois, - - + +..., e finalmente quatro sinais negativos e quatro positivos na última coluna. Se houvesse uma quarta coluna, a coluna correspondente a ele consistiria em oito sinais menos e seguida oito sinais mais. Com um total de k fatores a última coluna 2^{k-1} sinais negativos e depois 2^{k-1} sinais positivos (MONTGOMERY, 1997). Lembrando-se disso, podemos escrever facilmente a matriz de planejamento de qualquer fatorial de dois níveis na sua ordem padrão (Tabela 11).

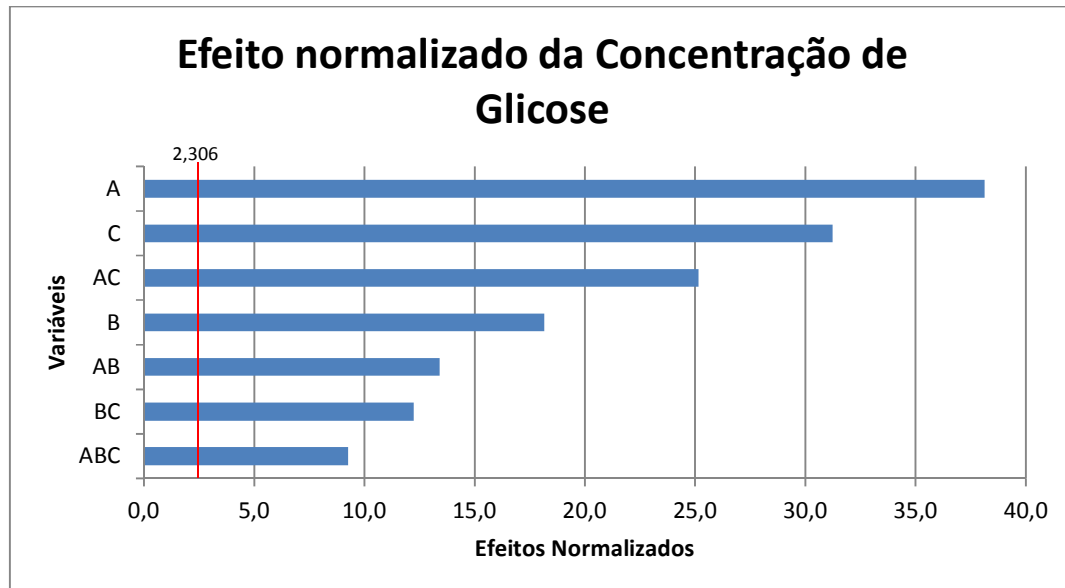
Tabela 11: Resultado de um planejamento fatorial 2³

Fatores:		Limite Inferior (-)	Limite Superior (+)
A	Temperatura (°C)	40	80
B	Tempo (min)	20	40
C	Concentração	17,5	35

Ensaio	A	B	C	Rendimentos	Média
1	-	-	-	0	0
2	+	-	-	0,0977	0,0719
3	-	+	-	0,0202	0,0137
4	+	+	-	0,1947	0,1688
5	-	-	+	0,0331	0,0266
6	+	-	+	0,3885	0,4531
7	-	+	+	0,1106	0,0977
8	+	+	+	0,9378	0,9249

Para decidir se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero podemos empregar um teste t usando as tabelas estatísticas existentes (Como Fazer Experimentos. 2003). No nível de 95% de confiança o valor de t correspondente a 8 graus de liberdade é 2,306. Em nossa análise isso quer dizer que só consideraremos estatisticamente significativo um efeito cujo valor absoluto exceder $(0 + 2,306 \times 1,1) = 2,37$. Então, fazendo uma análise de significância estatística dos dados da Tabela 11 verifica-se que todos os efeitos principais são significativos e os efeitos de interação entre a temperatura, tempo e concentração também são significativos. A existência de um efeito de interação significativo indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente (Figura 17).

Figura 17: Grafico de Pareto



Podemos observar no gráfico de Pareto que as três variáveis, (A)-Temperatura, (B)-Tempo e (C)-Concentração, influenciam a obtenção de glicose.

6 Conclusões

Obtivemos ótimos resultados sobre a caracterização da macrófita *Typha domingensis*, que foram evidenciados ao longo do trabalho e puderam servir de referência para este trabalho em específico e para o nosso grupo de trabalho no geral.

Através da análise fatorial pudemos nortear a melhor faixa de trabalho para as variáveis estipuladas nas condições estipuladas, revelando dados valiosos para esse estudo e para nosso grupo de trabalho. A partir dos dados mencionados foram conduzidas hidrólises controladas que resultaram importantes informações sobre suas condições de operação e rendimento.

Após o processo de hidrólise, obtivemos o resíduo, que foi estudado em amplo espectro, um deles uma das propostas centrais deste trabalho que é a quantificação de glicose no resíduo desse processo. Foi evidenciada a presença da glicose e a mesma quantificada de maneira satisfatória por duas metodologias distintas. Uma inovadora e inédita através de biossensores e outra colorimétrica amplamente difundida pelos laboratórios bioquímicos do mundo, que originaram resultados muito próximos.

Os resultados demonstraram que contida no resíduo do processo de obtenção de whiskers pela hidrólise ácida da *Typha domingensis*, há uma quantidade de aproximadamente $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose que pode ser recuperada ou utilizada para alguma finalidade posterior, porém os resultados não sugerem uma concentração suficiente para a produção direta de bioetanol de segunda geração. Comparando com a produção de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar onde a concentração de açúcar passa dos 500 g.L^{-1} .

Podemos concluir que há uma parcela de açúcares aproveitáveis sendo descartado como resíduo no processo de obtenção de whiskers, que podem ser aproveitados como matéria prima, de maneira que este se torne um processo fechado onde perdas e rejeitos sejam os mínimos possíveis.

Perspectivas Futuras

1. Desenvolver e melhorar metodologias para concentração e recuperação da glicose descartada.

2. Usar nossa metodologia para explorar outras matérias primas, espécies diferentes.
3. Modificar as variáveis do processo em uma investigação mais profunda da influência destas sobre a obtenção de glicose.
4. Verificar novas possibilidades para criar e modificar metodologias, visando futura obtenção de Bioetanol de segunda geração.

7 Referências Bibliográficas

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2011.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BNDES). Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES/CGEE, 2008. p. 1-316.

BOTARO, V. R. **Deslignificação organossolve de bagaço de cana de açúcar**: fracionamento e benzilação das ligninas obtidas. 1996. 167 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

BOTARO, V. R.; NOVACK, K. M.; SIQUEIRA, E. J. Dynamic mechanical behavior of vinylester matrix composites reinforced by Luffacylindrica modified fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 124, p. 1967-1975, 2011.

BOTARO, V. R. et al. Sisal fibers treated with NaOH and benzophenonetetracarboxylic dianhydride as reinforcement of phenolic matrix. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, v. 115, p. 269-276, 2010.

CANETTIERI, E. V. et al. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 90, p. 159-168, 2001.

CARMONA, V. B. et al. Extraction and characterization of natural fibers from Pantanal. In: FRENCH BRAZILIAN MEETING ON POLYMERS, 3., 2011, Florianópolis. **Abstracts...** Florianópolis: UFSC: CERMAV, 2011.

CÉSAR, N. R. **Nanocompósito de acetato de celulose reforçado com Whiskers extraídos da macrófita *Typha Domingensis***. 2013. 174 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2013.

CHUDAKOV, M. I. Lignin. **Russian Chemical Reviews**, London, v. 30, n. 2, p. 61-78, 1961.

DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. Biowastes-tobiofuels. **Energy Conversion and Management**, Philadelphia, v. 52, p. 1815-1828, 2011.

FANG, Z. et al. Production of glucose by hydrolysis of cellulose at 423 K in the presence of activated hydrotalcite nanoparticles. **Bioresource Technology**, Barking, 2011.

GRAÇA, J. S. **Obtenção e caracterização de filmes automontados de microperoxidase como medidor de elétrons em reações enzimáticas**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade, Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2013.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. **Chemical Reviews**, [Washington, DC], v. 110, n. 6, p. 3479–3500, 2010.

LEE, K. Y.; DELILLE, A.; BISMARCK, A. **Cellulose fibers: bio- and nano-polymer composites – green chemistry and technology**. Heidelberg: Springer, 2011. 758 p.

LEMOS, J. L. S. **Estudo da produção de Xilanases por *Aspergillus awamoriem* bagaço de cana**. 2001. 196 f. (Doutorado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: the 2005/2006 averages and a prediction for 2020". **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, p. 582-595, 2008.

MARINELLI, A. L. et al. Desenvolvimento de compósitos poliméricos com fibras vegetais naturais da biodiversidade: uma contribuição para a sustentabilidade amazônica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 18, n. 2, p. 92-99, 2008.

MENEZES JR., A. et al. Extrusion and characterization of functionalized cellulose whiskers reinforced polyethylene nanocomposites. **Polymer**, Oxford, v. 50, p. 4552-4563, 2009(a).

MENEZES JR., A. et al. Self-reinforced composites obtained by the partial oxypropylation of cellulose fibers. 2. Effect of catalyst on the mechanical and dynamic mechanical properties. **Cellulose**, New York, v. 16, p. 239-246, 2009(b).

MOHANTY, A. K.; MISRA, M.; HINRICHSEN G. Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: an overview. **Macromolecular materials and engineering**, Weinheim, v. 276/277, p. 1–24, 2000.

NEUREITER, M. et al. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 98, p. 49-58, 2002.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Chemical analysis of *Pinus oocarpus* wood. Parte I: quantification of macromolecular components and volatile extractives. **Revista Arvore**, Viçosa, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n.28, p.34-39, 2002.

OLIVEIRA, A. F. **Avaliação de desempenho de fibras lignocelulósicas na sorção de óleos diesel e biodiesel**. 2010. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, 2010.

PASQUINI, D. et al. Extraction of cellulose whiskers from cassava bagasse and their applications as reinforcing agent in natural rubber. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 32, p. 486-490, 2010.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. (Series on Biotechnology, v.2).

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, 2009.

RAZERA, I. A. T. **Fibras lignocelulósicas como agente de reforço de compósitos de matriz fenólica e lignofenólica**. 2006. 168 f. Tese (Doutorado em Ciências) -Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

REN, J. L.; SUN, R. C. **Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels – chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose**. Oxford: Elsevier, 2010. Cap. 4, p. 73-76, 87 99 e 100.

SAMIR, M. A. S. A.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, Washington, DC, v. 6, p. 612-626, 2005.

SASAKI, C. et al. Direct hydrolysis of cellulose to glucose using ultra-high temperature and pressure steam explosion. **Carbohydrate Polymers**, Barking, p. 298-301, 2012.

SCANDIFFIO, M. I. G. **Análise prospectiva do álcool combustível no Brasil – cenários 2004-2024**. 2005.182 f. Tese (Doutorado em Planejamento de Sistemas Energéticos) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SIQUEIRA, E. J. **Compósitos de matriz estervinílica reforçados com fibras da *Luffacylindrica* modificadas superficialmente**. 2008. 171 f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia de Materiais) - Rede Temática em Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and Bermuda grass for ethanol production. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para a produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T13m-54: Tappi test methods. Atlanta, 1991.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T207 om-93: Tappi test methods. Atlanta, 1993.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T211 om-93: Tappi test methods. Atlanta, 1993.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T212 om-98: Tappi test methods. Atlanta, 1998.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T222 om-88: Tappi test methods. Atlanta, 1988.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T222 om-02: Tappi test methods. Atlanta, 2002.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY – TAPPI.
Standard Method T257 om-85: Tappi test methods. Atlanta, 1985.

THOMAS, S. et al. Natural fibers: structure, properties and applications. In: _____. **Cellulose Fibers**: bio- and nano-polymer composites – green chemistry and technology. Heidelberg: Springer, 2011. Cap. 1, p. 3-42.

VÁSQUEZ, M. P. et al. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 12, p. 137-140, 2007.

XU, J.; THOMSEN, M. H.; THOMSEN, A. B. Feasibility of hydrothermal pretreatment on maize silage for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 1, p. 33-42, 2010.

ZHANG, J.; SMITH, K. R. Household air pollution from coal and biomass fuels in China: measurements, health impacts, and interventions. **Environmental health perspectives**, Research Triangle Park, v. 115, n. 6, p. 848–855, 2007.