



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO**  
**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS**

**DETERMINAÇÃO DE DADOS CINÉTICOS DA DESLIGNIFICAÇÃO DO  
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA NO PRÉ-  
TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO**

Autora: Laura Liliana Garzón Fuentes

Orientador: Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa

Co-Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo  
Junho 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -  
UNICAMP

G199d Garzón Fuentes, Laura Liliana  
Determinação de dados cinéticos da  
deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da  
hidrólise enzimática no pré-tratamento com  
hidróxido de cálcio / Laura Liliana Garzón Fuentes.  
--Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Aline Carvalho da Costa, Rubens  
Maciel Filho.

Dissertação de Mestrado - Universidade  
Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia  
Química.

1. Bagaço de cana. 2. Hidróxido de cálcio. 3.  
Hidrólise. 4. Alcool. 5. Biocombustível. I. Costa,  
Aline carvalho. II. Maciel Filho, Rubens. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Determination of kinetic data of sugarcane  
bagasse deslignification and of the enzymatic  
hydrolysis with pretreatment with calcium hydroxide

Palavras-chave em Inglês: Sugarcane bagasse, Calcium hydroxide,  
Hydrolysis, Ethanol, Biomass energy

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

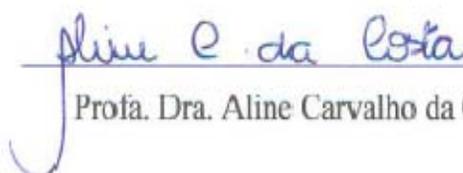
Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell, Daniel Ibraim  
Pires Atala, Maria Teresa Borges Pimenta

Data da defesa: 24/06/2009

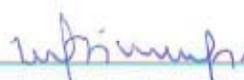
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por LAURA LILIANA GARZÓN FUENTES e aprovada em 24 de junho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

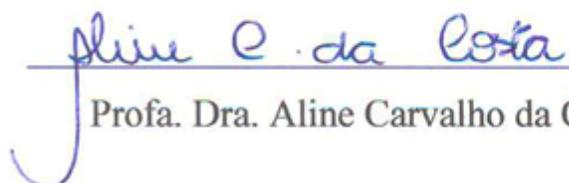
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa (Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell (Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Daniel Ibraim Pires Atala (Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Maria Teresa Borges Pimenta (Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em  
Engenharia Química.

  
Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa (Orientadora)

Dedico este trabalho primeiramente ao iluminador da minha vida, a Deus, e aos guias do meu caminho, meus pais, Teresa e Jesus, a minhas irmãs Paola e Sairey, a meus anjos, Valentina e Juan Camilo e a minha inspiração Julian.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por todo o amor que cada dia colocou em meu coração para realizar este trabalho, por ter-me dado sabedoria, saúde, inspiração e ter-me guiado durante todos estes anos da minha vida.

A minha família, a minhas irmãs e sobrinhos, a meus pais Jesus e Teresa, por terem dado todo o apoio tanto econômico como sentimental, por educar-me e fazer de mim a pessoa e a profissional que sou até agora. Especialmente a minha mãe por sempre ter confiado em minhas capacidades e depositar todo seu amor e todas suas orações em mim e por ser meu exemplo de mulher. A meu namorado Julian, que esteve sempre incentivando, dando seu amor e apoio durante estes dois anos, agradeço a ele por ter sido minha companhia, família, e por ter brindado ajudas com seus conhecimentos, disponibilidade de tempo os quais ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

A minhas amigas do laboratório Sarita, Daniela e Lisa, por ter compartilhado e auxiliado com seus valiosos conhecimentos tanto na parte profissional quanto na vida pessoal, porque mais que companheiras, tornaram-se como minhas irmãs neste país, e hoje elas sabem que sempre estarão morando em minha mente e coração. Obrigada por todos os conselhos, ajudas e amor brindado.

A todo o pessoal do LOPCA, aos colombianos por terem-se convertido em uma grande família durante minha estadia, especialmente a Oscar, Luisa, Monica, Henderson, Lia, Yurany y Nata por terem brindado uma sincera amizade. A duas pessoas que apareceram em minha vida, oferecendo alegria, amor, ótimos momentos desfrutados com sua amizade: a Claudiane e o Erivan, e a família de cada um deles por ter-me acolhido como um membro mais. Aos meus amigos, os quais sempre estão em meu coração, Kevin e Andrea, os quais de alguma forma contribuíram com suas palavras e forças a desenvolver este trabalho.

A minha orientadora Aline e co-orientador Rubens por ter brindado a oportunidade de trabalhar junto com eles, por terem me auxiliado com seus conhecimentos e pela amizade oferecida.

Ao professor Martín Aznar e a professora Maria Regina pelo empréstimo de equipamentos, os quais facilitaram o andamento da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPQ, pelo apoio financeiro.

E finalmente, ante todo agradecer a este país e as pessoas que pertencem a ele, por ter-me oferecido hospitalidade, estudo, conhecimento de sua cultura, e por brindar-me uns dos melhores anos da minha vida, deixando em minha mente lembranças inesquecíveis.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a otimização do pré-tratamento de bagaço de cana com hidróxido de cálcio para facilitar a hidrólise enzimática posterior visando a produção de etanol de segunda geração, além da obtenção de dados cinéticos experimentais na etapa do pré-tratamento e de hidrólise enzimática para posteriores estudos de modelagem.

O pré-tratamento foi realizado de acordo com um planejamento composto central  $2^3$ , com o objetivo de avaliar a influência do tempo de pré-tratamento (h), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e concentração de hidróxido de cálcio (p/p) na liberação de açúcares após hidrólise. A máxima produção de glicose foi de 228,45 mg/g biomassa seca, correspondentes a 409,9 mg/g de biomassa seca de açúcares redutores totais (ART), com o pré-tratamento realizado a  $90^{\circ}\text{C}$ , durante 90 h e com uma carga de cal de 0,4 g/g biomassa seca.

A cinética do pré-tratamento foi obtida para diferentes temperaturas (60, 70, 80 e  $90^{\circ}\text{C}$ ) e um modelo cinético foi determinado para a deslignificação do bagaço com cal como uma função da temperatura. A energia de ativação da reação de deslignificação foi estimada como 31,47 kJ/mol.

A determinação dos dados cinéticos durante a hidrólise enzimática foi realizada com bagaço pré-tratado nas condições ótimas, variando a carga de sólidos de 1 a 5% (p/v), com uma concentração fixa de enzima de 500 FPU/L de celulase e 500 CBU/L de  $\beta$ -glicosidase. Os resultados mostraram rendimentos glicosídicos próximos aos estequiométricos para a carga de sólidos de 1%. Experimentos adicionais foram realizados fixando a concentração de bagaço em 3% e variando as concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase de acordo com um planejamento  $2^2$  + configuração composto central. Esta análise mostrou que o aumento das concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase tiveram efeito positivo até 475 FPU/L e 750 CBU/L, respectivamente, e a partir deste ponto um aumento das concentrações resultou em uma diminuição de rendimento.

## ABSTRACT

The objective of this work was the optimization of the pretreatment of sugarcane bagasse with calcium hydroxide to enhance the subsequent enzymatic hydrolysis aiming at the production of second generation ethanol, as well as the determination of experimental kinetic data of the pretreatment stage and of the enzymatic hydrolysis for posterior modeling studies.

The pretreatment was performed, according to a  $2^3$  central composite design, in order to evaluate the influence of pretreatment time (h), temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and calcium hydroxide concentration ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). The maximum glucose yield was 228.45mg/g raw biomass, corresponding to 409.9 mg/g raw biomass of total reducing sugars (TRS), with the pretreatment performed at  $90^{\circ}\text{C}$ , for 90 h and with a lime loading of 0.4g/g dry biomass.

Kinetic data of the pretreatment were obtained for different temperatures (60, 70, 80 and  $90^{\circ}\text{C}$ ) and a kinetic model for bagasse delignification with lime as a function of temperature was determined. The kinetic model was empirically established as a first-order reaction corresponding to the bulk phase for pretreatment time up to 108 h. The activation energy for the delignification reaction was estimated at 31.47 kJ/mol.

The kinetic data of the enzymatic hydrolysis were obtained with bagasse pretreated in the optimal conditions, varying solids loading from 1 to 5% (m/v) with 500 FPU/L of cellulase and 500 CBU/L of  $\beta$ -glucosidase. The results show that glycosidic yields next to the stoichiometric are attained for solids loading of 1%. Additional experiments were performed fixing the bagasse concentration at 3% and varying cellulase and  $\beta$ -glucosidase concentrations according to a  $2^2$  + star configuration factorial design. This analysis shows that an increase in the concentrations of cellulase and  $\beta$ -glucosidase have a positive effect until up to a point and from this point up (475 FPU/L and 750 CBU/L, respectively), increasing concentrations resulted in a decrease in the yield.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>CAPITULO 1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Objetivos específicos.....	3
<b>1.2. Organização do trabalho.....</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1. Biomassa Lignocelulósica: .....</b>	<b>6</b>
2.1.1. A Celulose .....	6
2.1.2. Hemiceluloses .....	7
2.1.3. Lignina .....	9
2.1.4. Extrativos e outros .....	10
<b>2.2. A Estrutura dos materiais lignocelulósicos.....</b>	<b>10</b>
<b>2.3. A cana de açúcar .....</b>	<b>11</b>
2.3.1. O bagaço de cana de açúcar.....	12
<b>2.4. Pré-tratamento .....</b>	<b>14</b>
2.4.1. Pré-tratamentos Físicos.....	16
2.4.2. Pré-tratamentos Biológicos.....	16
2.4.3. Pré-tratamentos Físico-Químicos .....	16
2.4.4. Pré-tratamentos Químicos.....	17
2.4.5. Formação de inibidores na etapa do pré-tratamento.....	24
<b>2.5. Hidrólise Enzimática.....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Enzimas celulase.....	25
2.5.2. Fatores que afetam a hidrólise enzimática .....	28
<b>2.6. Cinética Enzimática .....</b>	<b>32</b>
<b>2.7. Conclusões .....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Materiais e Reagentes .....</b>	<b>35</b>
3.1.1. Equipamentos.....	35
3.2. Materia Prima .....	36
3.2.1. Preparação do Bagaço de Cana .....	37
<b>3.3. Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar .....</b>	<b>37</b>
3.3.1. Teor de Umidade.....	37
3.3.2. Determinação de Cinzas .....	38
3.3.3. Determinação de extrativos .....	38
3.3.4. Determinação de Lignina Insolúvel e Solúvel.....	39
3.3.5. Determinação de Cristalinidade.....	41

<b>3.4. Métodos analíticos para a quantificação de Açúcares</b> .....	<b>42</b>
3.4.1. Quantificação de Glicose.....	42
3.4.2. Quantificação de Açúcares redutores totais (ART) .....	43
<b>3.5. Determinação das Atividades Enzimáticas</b> .....	<b>43</b>
3.5.1. Determinação da Atividade da Celulase.....	43
3.5.2. Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase .....	44
<b>3.6. Planejamento de Experimentos</b> .....	<b>45</b>
<b>3.7. Pré-tratamento do Bagaço de Cana com Hidróxido de Cálcio (Cal)</b> .....	<b>46</b>
3.7.1. Quantificação do excedente de Cal após do Pré-tratamento .....	46
<b>3.8. Hidrólise Enzimática do Bagaço Pré-tratado</b> .....	<b>47</b>
<b>3.9. Análise Estatística</b> .....	<b>47</b>
<b>CAPITULO 4- OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1. Caracterização do Bagaço de Cana de Açúcar</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2. Análise das melhores condições de agitação para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio</b> .....	<b>50</b>
<b>4.3. Otimização do Pré-tratamento com Cal</b> .....	<b>51</b>
4.3.1. Primeiro Planejamento fatorial composto central do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.....	51
4.3.2. 2º Planejamento Composto central do Pré-tratamento com cal .....	64
4.3.3. Análise e caracterização Química do bagaço pré-tratado nas condições otimizadas .....	76
<b>4.4. Aumento de carga de sólidos no pré-tratamento</b> .....	<b>79</b>
<b>4.5. Conclusões</b> .....	<b>80</b>
<b>CAPITULO 5- OBTENÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO NO PRÉ-TRATAMENTO COM CAL</b> .....	<b>81</b>
<b>5.2. Descrição da metodologia</b> .....	<b>83</b>
<b>5.3. Resultados e Discussões</b> .....	<b>83</b>
5.3.1. Cinética da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar .....	90
<b>5.4. Conclusões</b> .....	<b>94</b>
<b>CAPITULO 6- OBTENÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA</b> ....	<b>95</b>
<b>6.1. Obtenção de Dados Cinéticos Variando a Carga de Sólidos na Hidrólise Enzimática</b> .....	<b>95</b>
6.1.2. Descrição da Metodologia .....	96
6.1.3. Análises de Resultados .....	96
<b>6.2. Obtenção de Dados Cinéticos com Variação na Carga Enzimática</b> .....	<b>101</b>
6.2.1. Metodologia Experimental .....	101
6.2.2. Análise de Resultados .....	102
<b>6.3. Conclusões</b> .....	<b>108</b>

<b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>110</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>124</b>

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 2.1: Fórmula estereoquímica da Celulose.....	7
Figura 2.2: Fórmula das O-acetil-4-O-metilglucuronoxilanas da madeira de folhosas.....	8
Figura 2.3: Precursores da biossínteses da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico .....	9
Figura 2.4: Modelo da estrutura da parede celular e relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula .....	11
Figura 2.5: Microscopia Ótima digital (a), MEV da fibra do bagaço de cana (b). ..	13
Figura 2.6: Esquema de uma biorefinaria. Diversidade de opções na utilização das frações do bagaço.....	14
Figura 2.7: Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica .....	15
Figura 2.8: Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e BG de <i>Trichoderma reesei</i> .....	26
Figura 4.1: Perfis de hidrólise enzimática a diferentes velocidades de agitação na etapa do pré-tratamento.....	51
Figura 4.2: Massa de bagaço após o pré-tratamento de 4 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado.....	53
Figura 4.3: Perfis de hidrólises dos ensaios do 1º planejamento composto central das concentrações de glicose e ART por grama de biomassa seca.....	55
Figura 4.4: Gráfico normal dos efeitos na produção de glicose .....	58
Figura 4.5: Superfície de resposta (a) e Curva de nível (b) para a glicose mantendo a concentração de cal no ponto central.....	60
Figura 4.6: Superfície de resposta(a) e Curva de nível para a variável glicose(b) (g/g) mantendo a temperatura no ponto central. ....	60
Figura 4.7: Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para a variável glicose (g/g) mantendo o tempo no ponto central. ....	61

Figura 4.8: Gráfico normal do primeiro planejamento composto central para a produção de ART(g/g).....	62
Figura 4.9: Superfície de resposta (a) e, curva de nível (b) para a resposta de ART (g/g), concentração de cal no ponto central. ....	64
Figura 4.10: Perfis de hidrólise dos ensaios da otimização do planejamento composto central de concentrações de glicose e ART.....	66
Figura 4.11: Gráfico Pareto para a produção de glicose (g/g).....	70
Figura 4.12: Superfícies de resposta da produção de glicose, (a) concentração de cal no ponto central, (b) temperatura no ponto central.....	72
Figura 4.13: Curvas de nível para a variável glicose (a), concentração de cal no ponto central, (b) temperatura no ponto central. ....	72
Figura 4.14: Gráfico Pareto para a produção de ART(g/g) no segundo planejamento composto central.....	74
Figura 4.15: Perfil de Hidrólise de glicose das condições ótimas do pré-tratamento .....	76
Figura 4.16: Aspecto do bagaço de cana (A) antes e (B) após o pré-tratamento. (C) Após a etapa de hidrólise enzimática.....	77
Figura 4.17 : Difração de raios X para o bagaço de cana pré-tratado e sem pré-tratamento .....	78
Figura 4.18: Influência de carga de sólidos no pré-tratamento com cal .....	79
Figura 5.1. Etapas de deslignificação no processo da transformação da madeira (Kim 2004).....	82
Figura 5.2: Massa total de sólidos, holocelulose, lignina total a: (a) 60°C, (b) 70°C, (c) 80°C, (d) 90°C.....	84
Figura 5.3: Conteúdo de xilanas em função do tempo durante a etapa de deslignificação.....	85
Figura 5.4: Conteúdo de glicana em função do tempo durante a etapa de deslignificação.....	86

---

Figura 5.5: Comportamento do conteúdo de lignina Klason em função do tempo durante a etapa de deslignificação.....	86
Figura 5.6: Degradação da lignina solúvel durante a deslignificação com cal .....	87
Figura 5.7: Conversão da Lignina total em função do tempo a 60, 70, 80 e 90 °C. ....	88
Figura 5.8: Perdas de holocelulose versus remoção de lignina Klason no pré-tratamento com cal a: (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C e (d) 90 °C.....	89
Figura 5.9: Gráficos de logaritmo natural da lignina Klason versus tempo para as temperaturas de: (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C e (d) 90 °C.....	92
Figura 5.10: Modelo cinético para a predição da lignina Klason .....	92
Figura 5.11: Gráfico $\ln(k/s-1)$ versus $103/T(K)$ para a determinação da $E_a$ para deslignificação do bagaço. ....	93
Figura 6.1. Perfis de hidrólise de celobiose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos..	97
Figura 6.2: Perfis de hidrólise de glicose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos .....	97
Figura 6.3: Perfis de hidrólise de xilose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos .....	98
Figura 6.4: Perfis de hidrólise de arabinose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos .	98
Figura 6.5: Rendimento de glicose na hidrólise para 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos ...	99
Figura 6.6: Rendimento de xilose da hidrólise para 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos .....	99
Figura 6.7: Perfis de Hidrólise enzimática para a variação de carga enzimática da celulase e da $\beta$ -glicosidase .....	105
Figura 6.8: Gráfico Pareto para o rendimento em glicose .....	106

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 2.1: Composição Química dos materiais lignocelulósicos.....	6
Tabela 2.2: Mudanças em características composicionais para diferentes técnicas de pré-tratamento.....	18
Tabela 2.3: Principais fatores que afetam a hidrólise enzimática.....	28
Tabela 4.1: Composição química do bagaço de cana proveniente da usina da pedra livre de extrativos em base seca.....	50
Tabela 4.2: Faixa de valores estudados no planejamento composto central.....	52
Tabela 4.3: Matriz de planejamento composto central com três pontos centrais com suas respostas.....	52
Tabela 4.4: Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g) produzida.....	57
Tabela 4.5: Análise de variância (ANOVA) – Glicose.....	59
Tabela 4.6: Análise dos efeitos principais e de iterações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para a massa de ART(g/g) produzida....	62
Tabela 4.7: Análise de variância (ANOVA) – ART (g/g).....	63
Tabela 4.8: Faixa das variáveis estudadas na otimização.....	65
Tabela 4.9: Matriz de 2° planejamento composto central com três pontos centrais com suas respostas.....	65
Tabela 4.10: Análise dos efeitos principais e de interações do 2 <sup>o</sup> planejamento composto central, utilizando o erro puro para a massa de glicose (g/g) produzida.....	70
Tabela 4.11: Análise de variância (ANOVA) para o 2 <sup>o</sup> planejamento composto central.....	71
Tabela 4.12: Análise dos efeitos principais e de interações do 2 <sup>o</sup> planejamento composto central, utilizando o erro puro para ART(g/g) produzida.....	75

Tabela 4.13: Análise de variância (ANOVA) para ART, 2º planejamento composto central .....	75
Tabela 4.14: Caracterização química do bagaço antes e após do pré-tratamento	77
Tabela 6.1: Condições das cargas enzimáticas a diferentes concentrações de bagaço .....	96
Tabela 6.2: Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática .....	102
Tabela 6.3: Matriz de planejamento composto central com as respostas de glicose e rendimento .....	103
Tabela 6.4: Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para o rendimento em glicose .....	106
Tabela 6.5: Análise de variância (ANOVA) para o planejamento composto central .....	107

**NOMENCLATURA**

- a*: Fração de lignina que pode ser removida em uma etapa especificada
- A*: Fator pré-exponencial ou fator de frequência
- abs*: Absorbância da amostra a 205 nm
- B*: Comprimento do caminho óptico, 1 cm
- k*: Constantes cinéticas
- i*: Etapa inicial
- b*: Etapa dominante
- r*: Etapa residual
- E<sub>a</sub>*: Energia de ativação, (kJ/mol)
- R*: Constante universal dos gases,
- C*: Concentração de celulase, (FPU/L)
- B*: Concentração de β-glicosidase (CBU/L)
- M<sub>1</sub>*: Massa do béquer vazio (g)
- M<sub>2</sub>*: Massa da amostra úmida com béquer (g)
- M<sub>3</sub>*: Amostra absolutamente seca com béquer (g)
- M<sub>c1</sub>*: Massa do cadinho + massa do bagaço absolutamente seco (g)
- M<sub>c</sub>*: Massa do cadinho calcinado vazio (g)
- M<sub>cinzas</sub>*: Massa do cadinho com cinzas, (g)
- M<sub>b</sub>*: Massa de bagaço seco (g)
- M<sub>f</sub>*: Massa do bagaço livre de extrativos (g)
- M<sub>p</sub>*: Massa do papel filtro tarado, (g)
- M<sub>kla</sub>*: Massa do papel filtro + lignina insolúvel seca, (g)
- M<sub>p</sub>*: Massa perdida de holocelulose ou de lignina Klason, (g)
- M<sub>o</sub>*: Massa inicial de lignina Klason ou holocelulose no tempo t=0, (g)

- $M_t$ : Massa de lignina Klason ou holocelulose no tempo t,
- $V_f$ : Volume final do hidrolisado, (L)
- df: Fator de diluição
- $\epsilon_{lig}$ : Absortividade da lignina solúvel a 205 nm, 105 L/g.cm
- $I_{002}$ : Intensidade de difração da parte cristalina
- $I_{am}$ : Intensidade de difração da estrutura amorfa
- $W_c$ : Excedente de cal (g)
- $M_{wc}$ : Massa molar de hidróxido de cálcio, (g/mol)
- $N_{HCL}$ : Concentração do ácido clorídrico, (mol/L)
- $V_i$ : Volume inicial, (mL)
- $V_f$ : Volume final, (mL)
- h: Hora
- T: Temperatura, (°C)
- m: Concentração de cal, (g/g)
- t: Tempo
- $L_c$ : Conversão de lignina total no tempo t,
- $L_{T0}$ : Conteúdo de lignina total no t=0, (g/g)
- $L_T$ : Conteúdo de lignina total no t, (g/g)
- $L_k$ : Conteúdo total de lignina no tempo t, (g/g)
- $L_{k0}$ : Conteúdo total de lignina em t=0, (g/g)
- g.b.s*: Gramas de biomassa seca
- ARP: Filtração de amônia reciclado
- AFEX: Sistema de explosão de fibras com amônia
- ART: Açúcares Redutores Totais
- CBU: Unidades de celobiose

CrI: Índice de cristalinidade  
FPU: Unidades de papel filtro  
UV: Ultravioleta  
rpm: Revoluções por minuto

## **CAPITULO 1. INTRODUÇÃO**

O crescimento econômico mundial e o aumento na demanda de energia gerado por este, estão promovendo uma série de problemas sociais e ambientais, cuja abordagem vem sendo feita com mais preocupação e seriedade. Com isto surge a necessidade de aumentar a produção de energia sustentavelmente, a partir de fontes renováveis, tais como o etanol e o biodiesel.

Nesse contexto a substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, para a geração de energia, tem sido uma alternativa cada vez mais adotada, o que tem levado à uma série de perguntas sobre as conseqüências que isto poderia ocasionar. Dentro destas se podem citar o aumento de preços e diminuição da disponibilidade de alimentos, que poderia estar sendo causada pela produção de etanol a partir da cana de açúcar e do milho. Por este motivo, a produção de biocombustíveis de segunda geração aparece como solução deste problema.

Os biocombustíveis produzidos na atualidade estão tendo impactos positivos ambientalmente, tais como: a redução de emissões nocivas, eliminação do chumbo da gasolina e reduções de emissões de gases de efeito estufa.

A produção de álcool a partir da cana-de-açúcar tem um efeito altamente positivo, já que este processo consome uma pequena quantidade de combustíveis fósseis. De outro ponto de vista poderia ter impactos negativos, como levar à destruição ou danificação de áreas de elevada biodiversidade, desmatamento, degradação de solos e a contaminação ou esgotamento de recursos hídricos.

O programa de etanol no Brasil tem substituído aproximadamente 1,5% de toda a gasolina usada no mundo, e este número irá provavelmente duplicar-se com a expansão em curso. Se a atual taxa de crescimento da produção de etanol no Brasil se mantiver e se outros países produtores de açúcar seguirem a via aprovada pelo Brasil, parece possível que mais que 10% de toda a gasolina usada no mundo possa ser substituída por biocombustíveis nos

próximos 15-20 anos (GOLDEMBERG, 2008). Esta substituição poderia acontecer em menor tempo com o aproveitamento do bagaço de cana, já que seria capaz de incrementar consideravelmente a oferta de álcool sem a necessidade de aumentar a área de plantio de cana-de-açúcar. O bagaço oferece outra grande vantagem por ter custo mínimo, vir processado das moendas, e estar pronto para uso no local (SHLITTLER, 2006).

O bagaço de cana-de-açúcar é um material altamente energético. Sua composição química o torna um material de elevado potencial tecnológico, principalmente para a bioprodução de etanol.

Para o uso de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana para a produção de biocombustíveis, é necessário primeiramente submeter o material a uma etapa de pré-tratamento para facilitar o posterior ataque enzimático. Esta é uma das etapas mais custosas devido à utilização de reagentes de preço elevado, além da geração de produtos inibidores (caso de pré-tratamentos ácidos e explosão de vapor) para as etapas posteriores de hidrólise e fermentação.

Na última década, a maior parte das investigações tem-se concentrado no desenvolvimento de pré-tratamentos de baixo preço e na minimização de inibidores. Um dos pré-tratamentos químicos que vêm sendo considerados é o realizado com hidróxido de cálcio (cal), o qual apresenta diversas vantagens, já que o reagente é de baixo preço, seguro e existe a possibilidade de recuperar o álcali na forma de carbonato de cálcio, através da sua reação com dióxido de carbono produzido na etapa de fermentação alcoólica. Este carbonato pode ser recuperado em forma de hidróxido de cálcio através de técnicas convencionais estabelecidas na indústria.

Por várias décadas a hidrólise dos materiais lignocelulósicos e a fermentação posterior dos açúcares resultantes, tem sido um grande desafio. A etapa de hidrólise atualmente é realizada por duas rotas: a hidrólise ácida ou enzimática. Na hidrólise ácida, o material a ser hidrolisado é tratado com uma solução de ácido diluído ou concentrado, em temperaturas acima de 70 °C por algumas horas. Esta técnica apresenta grandes desvantagens devido à formação de compostos inibidores produzidos pela degradação da celulose e da lignina, entre eles estão os derivados do furano, o furfural, os ácidos

alifáticos, acético, fórmico, derivados fenólicos, esteróis, cera e outros. A outra rota é a hidrólise enzimática, a qual utiliza um complexo enzimático de celulasas. Comparando a hidrólise enzimática com ácida a abordagem é promissora, pois ela pode alcançar elevados rendimentos de açúcares, trabalha em condições menos drásticas de temperatura, pressão e agressividade química, eliminando a necessidade de utilizar grandes quantidades de produtos químicos para tratar formação de subprodutos inibitórios como acontece na hidrólise ácida (PFEIFER *et al.*, 1984; TRAN e CHAMBERS, 1986, WYMAN, 1999).

Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens, mas a hidrólise enzimática tem atraído maior interesse atualmente, por ser mais ecológica e menos dependente de energia. No entanto, a especificidade e necessidades metabólicas dos microrganismos e os altos consumos de água para este processo são dificuldades que tornam o processo ainda inviável, e é por isso que pesquisas que buscam solucionar estes problemas têm sido de grande interesse.

## **1.1. Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho é a otimização do pré-tratamento de bagaço de cana com hidróxido de cálcio para a produção de etanol de segunda geração, através do uso de planejamentos experimentais e da metodologia de superfícies de resposta, além da obtenção de dados cinéticos experimentais na etapa do pré-tratamento e na hidrólise enzimática para posteriores estudos de modelagem.

### **1.1.1. Objetivos específicos**

- Caracterizar quimicamente o bagaço de cana, antes e após o pré-tratamento.
- Avaliar a influência das variáveis como o tempo, temperatura e concentração de cal durante o pré-tratamento na liberação de açúcares após a hidrólise.

- Determinar um modelo empírico estatístico que permita a otimização do rendimento da hidrólise em função das variáveis de pré-tratamento.
- Obter a cinética da deslignificação durante o pré-tratamento com cal a diferentes temperaturas e determinar um modelo cinético para a deslignificação do bagaço.
- Determinar dados cinéticos experimentais da hidrólise enzimática com variação de carga de sólidos e carga enzimática para posterior desenvolvimento de um modelo matemático.

## **1.2. Organização do trabalho**

O Capítulo 2 apresenta a “Revisão Bibliográfica”, com os principais conceitos sobre a composição química da biomassa, os tipos de pré-tratamento mais utilizados, tendo ênfase no pré-tratamento com hidróxido de cálcio, como também uma revisão dos conceitos principais de hidrólise enzimática e da forma de atuação, das enzimas utilizadas.

No Capítulo 3, é apresentada a Metodologia Experimental com a descrição detalhada de cada procedimento realizado neste trabalho.

O Capítulo 4 apresenta os resultados da análise da influência da agitação no pré-tratamento, os resultados da otimização das condições de pré-tratamento realizada através de um planejamento de experimentos e uma avaliação da influência do aumento da carga de sólidos na etapa de pré-tratamento. São apresentados também resultados da caracterização do bagaço, antes e após o pré-tratamento.

No Capítulo 5 são mostrados os dados cinéticos obtidos durante a etapa de pré-tratamento para diferentes temperaturas. Um modelo cinético é proposto para descrever a deslignificação do bagaço no pré-tratamento com hidróxido de cálcio em função da temperatura, obtendo-se as constantes cinéticas e energia de ativação do processo.

O capítulo 6 apresenta dados cinéticos da hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar pré-tratado com cal. Na primeira etapa são realizados ensaios em triplicata com concentração de enzimas fixa e variando a

carga de sólidos. Numa segunda etapa a carga de sólidos é mantida constante e são realizados experimentos variando as concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase seguindo um planejamento composto central  $2^2$  com 3 repetições no ponto central. Os resultados do planejamento são analisados usando o software Statística 7.0.

## CAPÍTULO 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Biomassa Lignocelulósica:

O uso da biomassa lignocelulósica como fonte de energia surgiu devido a este ser o material mais abundante de nosso planeta, tendo origem em resíduos vegetais, florestais, animais, resíduos sólidos urbanos e indústrias. A biomassa lignocelulósica, geralmente contém 30 - 45 % de celulose, 25 -30 % de lignina, 25-30 % de hemicelulose, e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos. Esta composição varia em função do tipo do material, como se observa na tabela 2.1.

**Tabela 2.1:** Composição Química dos materiais lignocelulósicos

<i>Fontes</i>	<i>Celulose</i>	<i>Hemicelulose</i>	<i>Lignina</i>	<i>Extrativos</i>
<i>Lignocelulósicos</i>	(%)	(%)	(%)	(%)
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	2-8
Madeira mole	40-44	25-29	25-31	1-5
Bagaço de cana	40	30	20	10
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3	n.d
Talo de milho	35	25	35	5
Espiga de milho	45	35	15	5
Algodão	95	2	0,3	0,4
Juta	71,5	13,6	13,1	1,8
Palha de trigo	30	50	15	5
Ramie	76,2	16,7	0,7	6,4
Sisal	73,1	14,2	11	1,7

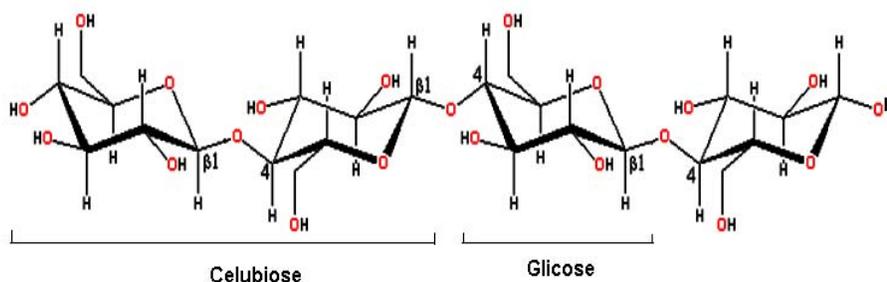
Fonte: HON, D.N. S, 1996, EL-MASRY, 1983; n.d.=não determinado

#### 2.1.1. A Celulose

A celulose é o componente principal na parede celular vegetal, sendo um homopolímero linear de alto peso molecular que contém uma parte amorfa e outra altamente cristalina. Este polímero é formado por moléculas de anidroglicose (D-glicose) unidas por ligações do tipo  $\beta(1-4)$  glicosídicas, sendo sua fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Em sua estrutura, duas unidades de glicose adjacente são ligadas pela eliminação de uma molécula de  $H_2O$  entre seus grupos hidroxílicos, no carbono um e no carbono quatro, dando origem à molécula de celobiose, a qual é a unidade repetitiva da celulose como se mostra na figura 2.1 (FENGEL e WEGENER, 1989).

As moléculas de celulose têm uma forte tendência a formar ligações por uniões de hidrogênio, cada unidade de glicose forma ligações intramoleculares e intermoleculares. A existência destas ligações tem um efeito importante na reatividade que apresentam as fibras celulósicas. As ligações intermoleculares de hidrogênio permitem uma estrutura fibrilar terciária de alta cristalinidade. As zonas que apresentam elevada cristalinidade são difíceis de penetrar por solventes e reagentes. Por outro lado, as zonas relativamente mais desordenadas (amorfas) são mais acessíveis e mais susceptíveis a todas as reações químicas (e favorecem o inchamento que se limita unicamente à região amorfa da fibra - inchamento intercrystalino- e não muda sua estrutura cristalina). (OTT *et. al.*, 1963; SCALLAN, 1971; GACÉN e MAILLO, 1987; GARCIA HORTAL, 1994).

O alto grau de cristalinidade da porção cristalina da celulose confere proteção à célula e constitui um impedimento estérico (impossibilidade ou dificuldade de reagir de uma molécula por seu tamanho e pelos ângulos de ligação de seus radicais) ao ataque de reagentes. Isto não acontece com a celulose amorfa, que é mais fácil de ser degradada pelos pré-tratamentos.



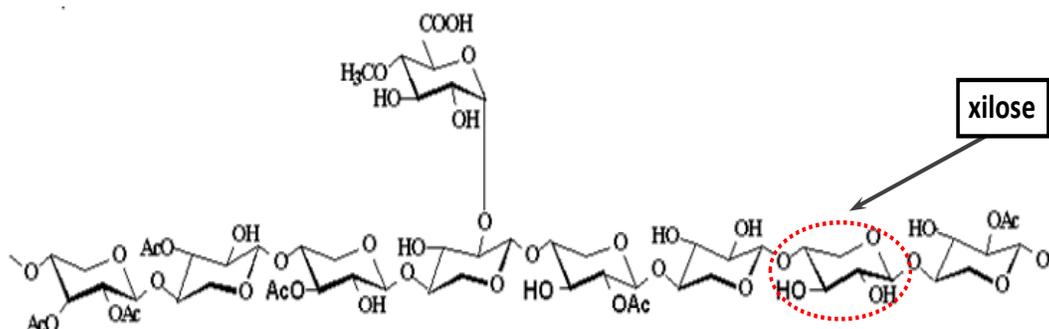
**Figura 2.1:** Fórmula estereoquímica da Celulose (adaptada de <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyara.html>)

### 2.1.2. Hemiceluloses

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada. Os constituintes monoméricos das hemiceluloses são pentoses (xilose, arabinose), galactose e

ácidos urônicos (HOLTZAPPLE, 1993b). As hemiceluloses de folhosas e resinosas diferem não só em percentagem, mas também, em composição química.

As xilanas são da família das hemiceluloses e são as mais abundantes na parede celular das plantas. Representam entre 15-30%, e são constituídas por uma cadeia principal de unidades de  $\beta$ -D-xilopirranose unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), com ramificações de ácido 4-O-metilglucurónico, unidos à cadeia principal por ligações  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2).



**Figura 2.2:** Fórmula estereoquímica da hemicelulose

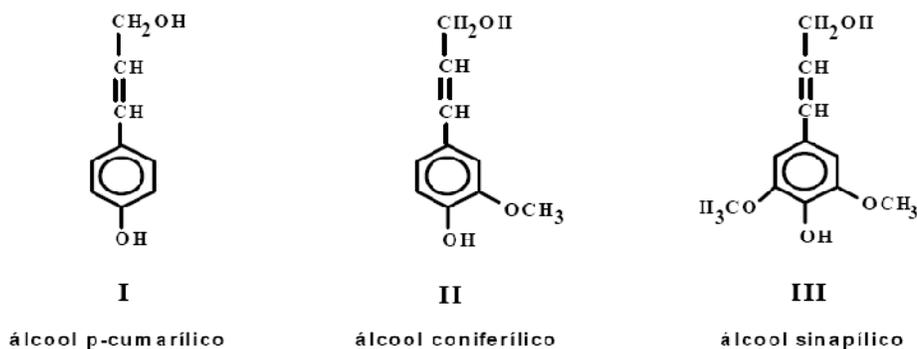
As hemiceluloses são estruturalmente mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. Sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando a estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS 2003). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem uma maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores. Esta reatividade é usualmente atribuída ao caráter amorfo destes polissacarídeos (SCHUERCH, 1963; FENGEL e WEGENER, 1989).

As hemiceluloses se encontram no bagaço de cana-de-açúcar na proporção de 25% a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural (PATURAU, 1989). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose (FENGEL e WEGWNER, 1989).

### 2.1.3. Lignina

A lignina é, depois da celulose e hemicelulose, uma dos mais abundantes macromolécula vegetal e se encontra presente na parede celular. É um heteropolímero amorfo que consiste em três diferentes unidades de fenilpropanos (álcool p-cumarílico, álcool coferílico e álcool sinapílico) que são mantidos unidos por outro tipo de ligação. O objetivo principal da lignina é dar à planta apoio estrutural, impermeabilidade, resistência contra o ataque microbiano e o estresse oxidativo. O heteropolímero amorfo não é solúvel em água e oticamente inativo, o que faz com que a degradação da lignina seja difícil. (FENGEL e WEGENER, 1989)

A lignina, da mesma forma que a hemicelulose, começa a dissolver aproximadamente a 180 °C em condições neutras (BOBLETER, 1994). A solubilidade da lignina em ácido, ou meios neutros ou alcalinos depende dos precursores da lignina (figura 2.3) (GRABBER, 2005).



**Figura 2.3:** Precursores da biossínteses da lignina: (I) álcool p-cumarílico; (II) álcool coniferílico; (III) álcool sinapílico. (FENGEL e WEGENER, 1989).

A estrutura da lignina não é homogênea, possui regiões amorfas e estruturas globulares (BIDLACK *et al.*, 1992) . A composição e a organização dos constituintes da lignina variam de uma espécie para outra, dependendo da matriz de celulose-hemicelulose.

No processo da hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos e na indústria de papel e celulose, a lignina é um componente indesejável e geralmente é necessário removê-la por meio de tratamentos químicos. Além de ser a barreira física para as enzimas, as celulases podem ser irreversivelmente

capturadas pela lignina e conseqüentemente influenciar na quantidade de enzima requerida para a hidrólise, assim como dificultar a recuperação da enzima após a hidrólise (LU *et al.*, 2002)

#### **2.1.4. Extrativos e outros**

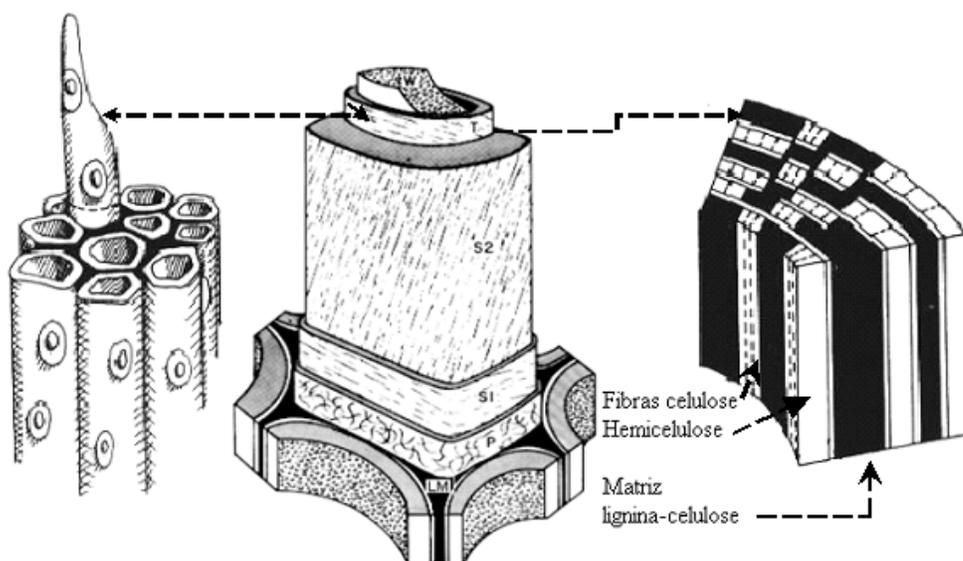
Os extraíveis são compostos orgânicos que não residem na parede celular da planta, são solúveis em água, solventes orgânicos neutros, ou volatilizados a vapor. O teor de extrativos em madeira de folhosas corresponde a 3 a 10%, variando em torno de 5 a 8% para as madeiras de coníferas. Esses constituintes são freqüentemente responsáveis por determinadas características da planta, como a cor, o cheiro, a resistência natural ao apodrecimento, o sabor e as propriedades abrasivas (D ALMEIDA, 1998). Nos extrativos podem ser encontrados gorduras, ceras, ácidos graxos, alcoóis, esteróides e hidrocarbonetos de elevada massa molar.

Existem outros materiais que também não são comumente extraíveis com os solventes mencionados e também não se encontram na parede celular, tais como os compostos inorgânicos (cinzas), proteínas e substâncias pécticas (RAMOS, 2003).

## **2.2. A Estrutura dos materiais lignocelulósicos**

Geralmente, a estrutura da parede celular é subdividida em parede primária, parede secundária e parede terciária, como pode ser observada na figura 2.4. As distribuições da celulose, da hemicelulose e da lignina variam consideravelmente entre as camadas (FENGEL e WEGENER, 1989). A lamela média é uma camada fina localizada entre as células e nas madeiras maduras esta quase inteiramente composta de lignina. Essa camada mantém as células coesas e é a responsável pela integridade estrutural do tecido das plantas. A parede primária em uma célula madura também é altamente lignificada. Esta é a camada mais fina da parede celular e a primeira a ser depositada nas células. As duas paredes primárias adjacentes e a lamela média são freqüentemente chamadas lamela média composta. Do lado de dentro da parede primária, é formada a parede secundária, em uma seqüência de três lamelas, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, e S<sub>3</sub>. A camada central dessa parede, S<sub>2</sub>, é usualmente mais

grossa que as outras. Cada camada da parede secundária contém microfibrilas de celulose que se encontram mais ou menos paralelas umas às outras. Essa orientação resulta em uma disposição helicoidal, que pode ser caracterizada de acordo com o ângulo que as microfibrilas fazem com o eixo longitudinal da célula. Como o ângulo das microfibrilas varia entre as lamelas, é formada uma estrutura microfibrilar cruzada. (RAMOS, 1992).



**Figura 2.4:** Modelo da estrutura da parede celular e relação da lignina, hemicelulose, e celulose na parede secundária da célula. LM= lamela média, P= parede primária, S1=parede secundária 1, S2=parede secundária 2, T=parede terciária e W=camada de verrugas (KIRK e CULLEN, 1998, FENGEL e WENEGER, 1989).

### 2.3. A cana de açúcar

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma das seis espécies do gênero *Saccharum*. Pertencem à imensa família das gramíneas, que contêm mais de 5.000 espécies de plantas.

A cana é composta por partes subterrâneas e aéreas. Fazem parte da subterrânea as raízes e rizomas, e das aéreas: o colmo, as folhas e as flores. Sua reprodução se faz assexuadamente, isto é, através de colmos sementes que, pela brotação de suas gemas, dão origem aos colmos primários dos quais surgirão os secundários, depois os terciários, até a formação de uma touceira (SCHLITTLER, 2006). Pode atingir de 2 a 5 metros de altura, e apresentar diferentes tonalidades de cor. É composta, principalmente, por água e açúcares

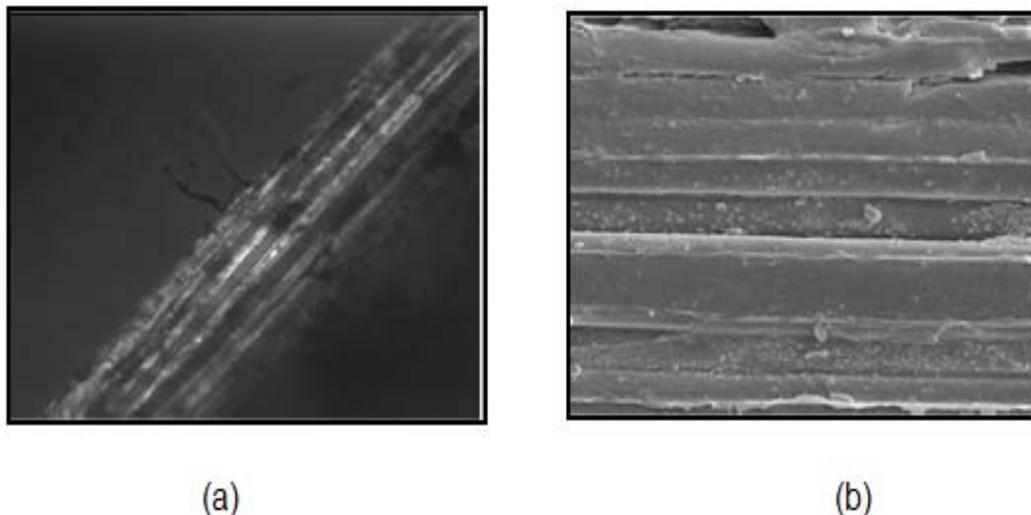
que se concentram nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante. As fibras também são abundantes e estão distribuídas por todo o vegetal, mas com maior presença nas partes duras. A composição química da cana é bastante variável quanto à proporção dos elementos; porém, quantitativa e qualitativamente, exhibe regularidades em todas as variedades. (SCHLITTLER, 2006)

### **2.3.1. O bagaço de cana de açúcar**

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto da cana de açúcar, remanescente da moagem dos colmos da cana-de-açúcar. É obtido na saída do último moinho das usinas e destilarias, e constitui um conjunto de partículas de diferentes tamanhos, que oscilam entre 1 e 25 mm, apresentando um tamanho médio de 20 mm, o qual depende fundamentalmente do número de moagens realizadas e do tamanho dos equipamentos (SCHLITTLER, 2006). A morfologia do bagaço se encontra relacionada com a estrutura da cana, onde se encontram fibras exteriores do colmo ou da casca, feixes fibrovasculares e outras formas fibrosas que dão resistência ao colmo vegetal. A figura 2.5 mostra a microscopia ótica digital e eletrônica de varredura da estrutura da fibra do bagaço. Na estrutura fibrosa do bagaço encontram-se as frações polissacarídicas constituídas basicamente de hemicelulose e celulose, infiltradas por macromoléculas, de alcoóis aromáticos, denominados ligninas (LEE, 1997). Em menores proporções podem ser encontradas resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e sais minerais.

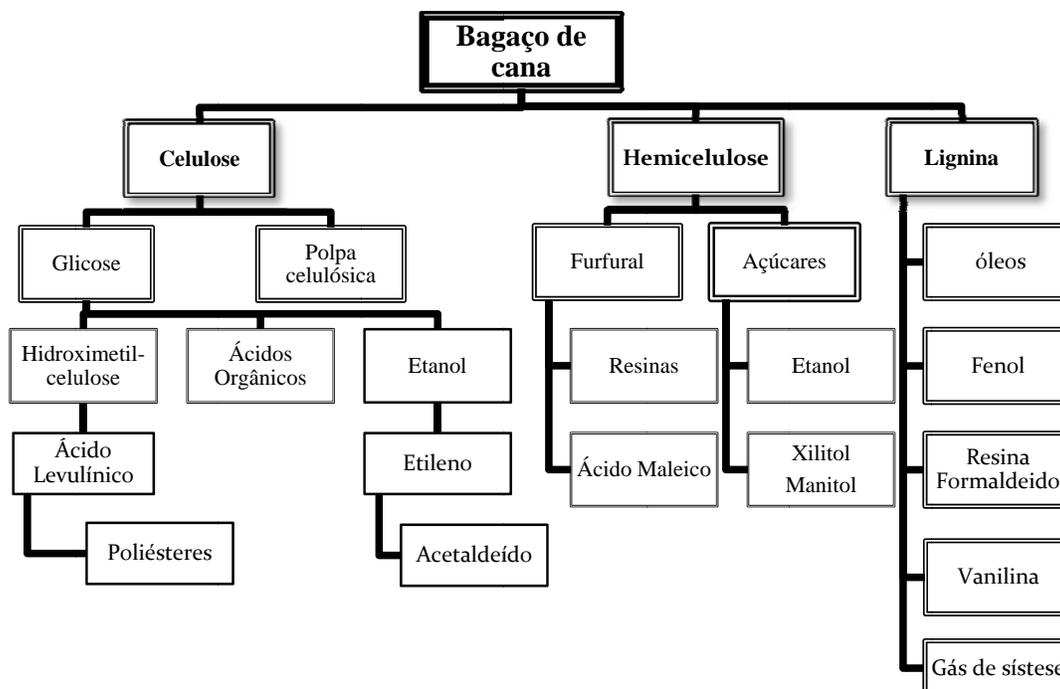
A composição química do bagaço depende das condições climáticas a que esteve exposta a cana como também do tipo de microrganismos. Segundo CHESF, (1987), o bagaço é composto por 36% de celulose, 32% hemicelulose, 19% de lignina e 13% de ceras, proteínas e cinzas. SHLITTER, (2006) apresenta diversas informações reportadas na literatura do bagaço, uma delas é o valor das densidades aparentes do bagaço em função de sua fase: 80-120 kg/m<sup>3</sup> solto, 280-320 kg/m<sup>3</sup> compactado e 120-140 kg/m<sup>3</sup> empilhado. A outra informação é sobre a composição elementar realizada pelo centro de tecnologia canavieira (CTC), antigo centro COPERSUCAR em 2005, onde o bagaço mostrou estar constituído por 44,6% de carbono, 5,8% de hidrogênio,

44,5% de oxigênio, 0,6% de nitrogênio, 0,1% de enxofre e 4,4% de outros elementos.



**Figura 2.5:** Microscopia Ótica digital (20µm) (a), MEV da fibra do bagaço de cana (20µm) (b) (SCHLITTLER, 2006).

Nos anos 2007/2008 a agroindústria sucroalcooleira brasileira, composta por aproximadamente 350 usinas, processou  $4,93 \times 10^8$  toneladas de cana para produzir  $2,2 \times 10^7$  m<sup>3</sup> de álcool. A quantidade de cana processada gerou cerca de  $1 \times 10^{12}$  kg de bagaço (base úmida) (dados UNICA 2008). Em geral o processamento de uma tonelada de cana de açúcar gera cerca de 280 Kg de bagaço. Segundo GÁMEZ *et al.* (2006), a utilização do bagaço excedente viabilizaria economicamente o investimento necessário para adaptar as usinas de açúcar e álcool, resolvendo o problema de abastecimento da indústria sucroalcooleira, oferecendo vantagens sócio-ambientais e aumentando o rendimento econômico do processo. Na figura 2.6 são mostradas as diferentes possibilidades de utilização do excedente do bagaço de cana visando à montagem de uma biorefinaria.

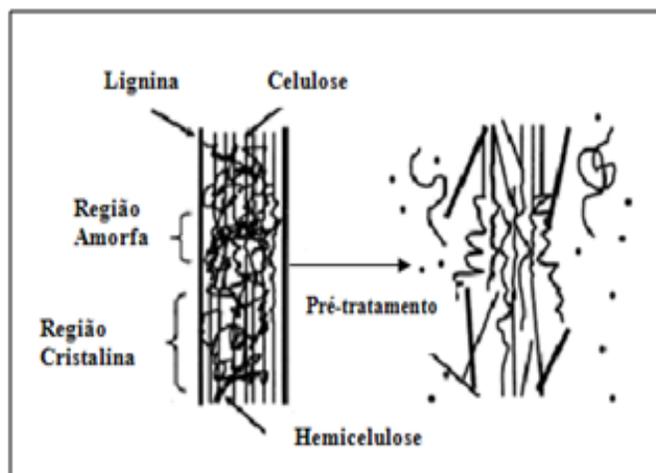


**Figura 2.6:** Esquema de uma biorefinaria. Diversidade de opções na utilização das frações do bagaço. (SCHUCHARDT *et al.*, 2001).

## 2.4. Pré-tratamento

Entre os passos cruciais na produção de etanol estão a hidrólise enzimática da celulose e a fermentação das hemiceluloses para a produção de etanol. A presença de lignina e de hemiceluloses torna o acesso à celulose difícil, afetando a eficiência da hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é remover ou modificar a estrutura da lignina e das hemiceluloses para facilitar o ataque enzimático, evitando a degradação da celulose. A figura 2.7 apresenta o esquema das transformações que sofre a biomassa lignocelulósica durante o pré-tratamento com a alteração da estrutura e aumento da área superficial da celulose.

A lenta degradação da lignina é regida por sua estrutura e pelas características tais como: 1) alta cristalinidade da celulose presente na biomassa, 2) a lignina, a qual forma uma barreira que envolve a celulose e dificulta o ataque de enzimas ou ácido. 3) e os sítios da reação, que são limitados por ter os capilares demasiado pequenos para permitir a entrada de grandes moléculas reativas como são as enzimas. (FAN *et al.*, 1987).



**Figura 2.7:** Esquema do pré-tratamento na biomassa lignocelulósica (HSU *et al.*, 1980).

Um bom pré-tratamento é conhecido por alterar a estrutura da lignina, conseguindo incrementar a acessibilidade da enzima à celulose, desarticulando a estrutura altamente ordenada da celulose, aumentando o volume do poro e a área superficial. Certas características devem ter:

- Ser de custo mínimo e ambientalmente amigável;
- Possibilitar o maior rendimento de açúcares na hidrólise enzimática, evitando a perda de carboidratos;
- Evitar a formação de co-produtos inibitórios para a hidrólise e fermentação;
- Tornar a biomassa facilmente hidrolisável com baixas cargas enzimáticas.

Diferentes métodos de pré-tratamento têm sido estudados, tais com os pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos ou combinados.

Diversas desvantagens têm-se apresentados nos pré-tratamentos. Os físicos são relativamente ineficientes no aumento da digestibilidade da biomassa (FAN *et al.*, 1982), além de consumir grande quantidade de energia (tratamento mecânico). Os tratamentos combinados raramente apresentam boa digestibilidade comparada com os tratamentos simples (GHARPURAY *et al.*, 1983). Na tabela 2.2. São mostrados diferentes tipos

de pré-tratamento, onde são observadas as mudanças composicionais na biomassa.

#### **2.4.1. Pré-tratamentos Físicos**

Os pré-tratamentos físicos normalmente são divididos em duas categorias: mecânicos e não mecânicos. Os primeiros, como a moenda, as forças de impacto e o cisalhamento, reduzem o tamanho de partícula, a cristalinidade, aumentam a superfície específica e a densidade aparente (FAN *et al.*, 1982). Os pré-tratamentos físicos não mecânicos submetem o substrato celulósico à ação de agentes externos que provocam alterações diversas do material original.

#### **2.4.2. Pré-tratamentos Biológicos**

Pré-tratamentos biológicos envolvem o uso de microrganismos para a degradação da lignina, com o fim de facilitar a hidrólise enzimática da celulose. As vantagens deste pré-tratamento é o baixo requerimento energético e, as condições suaves do processo. Apesar de ser um tratamento efetivo, limpo e sem produção de metabolitos indesejáveis, o processo é demasiado lento para aplicá-lo industrialmente. Outra desvantagem é que estes tipos de microrganismos não são seletivos e além de degradar hemicelulose e lignina também degradam a celulose (SUNG e CHENG, 2002).

#### **2.4.3. Pré-tratamentos Físico-Químicos**

Nesta categoria incluem-se misturas de pré-tratamentos físicos tais como a explosão a vapor com reagentes químicos. Um pré-tratamento típico nesta categoria é o AFEX, que é também um pré-tratamento alcalino onde ocorre incremento da reatividade da fração celulósica devido ao “inchamento” da mesma, combinado com hidrólise das hemiceluloses e desintegração da fibra. A biomassa é tratada com amônia líquida por um período de 10- 60 min a temperaturas moderadas (100 °C) e altas pressões (3 MPa) (DALE BE *et al.*, 1982; TEYMOURI *et al.*, 2005). Uma das desvantagens deste pré-tratamento é a pouca solubilização das hemiceluloses e da lignina (GOLLAPALLI, 2002).

#### **2.4.4. Pré-tratamentos Químicos**

Os pré-tratamentos químicos podem ser definidos como técnicas que envolvem agentes químicos tais como ácidos, bases, solventes orgânicos. Um tratamento químico tem como objetivo aumentar a superfície do substrato por inchaço das fibras e a modificação ou a remoção da hemicelulose e/ou da lignina para fazer a celulose mais acessível para hidrólise enzimática. (HSU, 1996; MOISER *et al.*, 2005).

##### **2.4.4.1 Pré-tratamentos Ácidos**

Os pré-tratamentos ácidos consistem em tratar a biomassa com ácidos diluídos ou concentrados para conseguir a solubilização da hemicelulose, com o fim de obter uma celulose mais acessível. O pré-tratamento com ácido diluído consiste na imersão do material em uma solução de ácido de aproximadamente 4% (p/p) e em seguida aquecer até atingir temperaturas na faixa de 140 a 200 °C por períodos de tempos curtos (10 min - 1 h). Diferentes reações ocorrem durante os pré-tratamentos ácidos; uma delas é a hidrólise das hemiceluloses, especialmente das xilanas e das glicanas, dando origem à produção de compostos tóxicos para a fermentação como o furfural e hidroximetilfurfural. (PALMQVIST *et al.*, 2000).

Uma vantagem do pré-tratamento ácido é a solubilização de hemicelulose, aumentando a acessibilidade da celulose para as enzimas. Entretanto, existe o risco de formação de produtos voláteis de degradação do carbono e estes, em muitos casos, diminuem a conversão a etanol. No entanto, produtos voláteis podem ser convertidos a metano. A condensação e a precipitação de componentes de lignina solubilizada é uma reação indesejada, uma vez que diminui a digestibilidade. Pré-tratamentos com ácido concentrado para a produção de etanol não são processos atrativos, devido ao grande risco de produção de componentes inibidores pela degradação de carboidratos.

**Tabela 2.2:** Mudanças em características composicionais para diferentes técnicas de pré-tratamento

Pré-tratamento	Característica composicional			Vantagem	Desvantagem	Referencias
	Celulose	Hemicelulose	Lignina			
Moinho de Bolas	Intensiva diminuição do grau de cristalinidade	Não remove	Não remove	Redução de cristalinidade	Alto consumo de energia	Chang e Holtzaple, 2000; Koullas <i>et al.</i> , 1990
Explosão a Vapor	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura.	Energia eficiente, nenhum custo de reciclagem	Degradação da xilanas como produto inibitório	Grethlein e Converse 1991
Ácido Diluído	Pouca despolimerização	80-100% de remoção	Pouca remoção, mas ocorre mudança da estrutura	Condições médias, alta produção de xilose	Difícil recuperação do ácido, corrosivo e relativamente custoso	Torget, 1991; Grethlein e Converse, 1991
AFEX	Diminuição do grau de cristalinidade	Acima de 60% de solubilização	10-20% de solubilização	Menor perda de xilanas, não formação de inibidores	Recuperação de amônia, não é efetivo para alta concentração de lignina	Dale e Moreira, 1982; Hotzaple <i>et al.</i> , 1991
Hidróxido de Sódio	Inchação significativa	Considerável solubilização	Considerável solubilização, >50%	Remoção efetiva de ésteres	Reagente caro, recuperação alcalina	Millett <i>et al.</i> , 1976
ARP	Menor que 5% de despolimerização	~50% de solubilização	~70% de solubilização	Efetiva deslignificação	Recuperação alcalina, relativamente caro	Yoon <i>et al.</i> , 1995; Kim <i>et al.</i> , 2003
Hidróxido de Cálcio	Pouca despolimerização	Significativa solubilização (30%)	Solubilização parcial (~40%)	Efetiva remoção de lignina e acetil, baixo custo	Menor efetividade devido à pouca solubilidade da cal.	Chang <i>et al.</i> , 1997
Ozonólise	Quase nenhuma despolimerização	Pequena solubilização	Solubilização acima de 70%	Efetiva deslignificação em condições suaves	Caro, necessidade de mais ozônio	Vidal e Molinieer, 1988

---

---

Organosolv	Considerável inchação	Significativo, pode ser quase completa	Significativo, pode ser quase completa	Alta produção de xilose, efetiva deslignificação	Recuperação de solvente cara	Chum <i>et al.</i> , 1988
Biológico	20-30% de despolimerização	Acima de 80% de solubilização	~40% de deslignificação	Baixo requerimento de energia, efetiva deslignificação	Perda de celulose, baixa taxa de hidrólise	Kirk e Farrell, 1987; Datta, 1981

Fonte: ZHU, 2005 . \* ARP: filtração de amônia reciclado, AFEX: explosão de vapor com amônia

#### **2.4.4.2. Pré-tratamentos Alcalinos**

Este tipo de pré-tratamento geralmente utiliza soluções alcalinas diluídas em condições moderadas de operação, em termos de temperaturas e pressões, em comparação aos sistemas ácidos. O principal efeito do pré-tratamento consiste na remoção da lignina da biomassa. O álcali, geralmente soda ou cal, tende a causar um inchamento da biomassa, levando a uma diminuição na cristalinidade do grau de polimerização da celulose. Também provoca uma quebra das ligações lignina-carboidrato, além de perturbações na estrutura da lignina. (MC MILLAN, 1994).

Em alguns casos, o pré-tratamento pode ser conduzido à temperatura ambiente, porém demanda tempos reacionais elevados, da ordem de horas, dias ou semanas. Ao contrário dos pré-tratamentos ácidos, uma limitação ocorre porque algumas bases podem ser convertidas em sais irrecuperáveis ou incorporadas como sais na biomassa através das reações do pré-tratamento (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

##### **2.4.4.2.1 Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio**

O hidróxido de cálcio tem sido bastante usado como agente de pré-tratamento para aumentar a digestibilidade enzimática de resíduos lignocelulósicos tais como o bagaço de cana, palha de trigo, palha de milho, entre outros resíduos agroindustriais. (CHANG *et al.*, 1997 e 1998, KAAR *et al.*, 2000). Várias pesquisas têm utilizado a cal como um dos reagentes com grande potencial para o pré-tratamento da biomassa por ser um reagente de baixo custo e segurança para manipulação, apesar de apresentar menor solubilidade e ser mais fraca quando comparada com outras bases (CHANG *et al.*, 1998).

LESOING *et al.* (1981) trabalharam a palha de trigo com cal a temperatura ambiente durante 120 horas com a concentração de hidróxido de cálcio variando de 1 a 4% (p/p), 1,5 mL de água/g biomassa com partículas de biomassa de tamanho 2,54 cm. O melhor resultado foi obtido a uma concentração de 4% de hidróxido de cálcio, com um aumento da digestibilidade de 41% da biomassa não tratada para 76% da biomassa tratada.

VERMA (1983), também estudou os efeitos do pré-tratamento com cal para a palha de trigo. As reações foram realizadas a temperatura ambiente com concentrações de cal variando de 1 a 4% e tempos reacionais entre 24 e 120 h. O melhor resultado foi conseguido a uma concentração de 4 g/g de cal, com um tempo reacional de 72 h, observando um aumento da digestibilidade da biomassa de 48% (não tratada) para 74% (tratada).

Segundo PLAYNE (1984), após um estudo com diferentes bases, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio mostrou-se mais eficiente que o de hidróxido de sódio, devido à menor perda de celulose. Este autor selecionou o pré-tratamento com cal para o bagaço de cana-de-açúcar, numa temperatura de 20 °C, durante 8 dias com variação na carga de hidróxido de cálcio entre 0,12 e 0,3 g/g biomassa. A quantidade de água foi de 0,87 g/g biomassa e o tamanho das partículas de 2,25 mm. A condição ótima de pré-tratamento mostrou que após 192 horas o efeito da digestibilidade proporcionou um aumento de 19% (biomassa não tratada) para 72% (biomassa tratada) utilizando uma proporção de 0,3 g  $\text{Ca(OH)}_2$ /g de biomassa.

NAGWANI (1992) realizou estudos do pré-tratamento de bagaço de cana com cal e mostrou que o tempo e a temperatura impactam significativamente no pré-tratamento, representando parâmetros importantes a serem analisados. Inversamente, a massa de cal teve muito pouca influencia no pré-tratamento, apresentando um valor ótimo de 0,1 g  $\text{Ca(OH)}_2$ /g biomassa seca e o volume de água não apresentou praticamente nenhum efeito.

CHANG *et al.* (1997), usaram hidróxido de cálcio para aumentar a digestibilidade de *switchgrass*. As melhores condições de pré-tratamento foram: temperaturas entre 100 e 120 °C durante duas horas com uma quantidade de hidróxido de cálcio de 0,1 g/g de biomassa e 9 mL de água/g biomassa. A hidrólise foi efetuada durante três dias com um rendimento de glicose 5 vezes maior do que usando a biomassa não tratada. Balanços de massa mostraram que uma pequena parte da celulose, aproximadamente 10%, foi solubilizada durante o pré-tratamento e que 26% da hemicelulose e 29% da lignina foram solubilizadas nessas condições.

CHANG *et al.* (1998), estudaram a digestibilidade do bagaço de cana-de-açúcar e da palha de trigo utilizando hidróxido de cálcio como agente de

pré-tratamento. O estudo sistemático das condições do pré-tratamento sugeriu que em um pré-tratamento com menor tempo (1-3 h), altas temperaturas (85-135 °C) são requeridas para conseguir alto rendimento de açúcar, enquanto que para longos tempos de pré-tratamento (aproximadamente 24 h), baixas temperaturas (50-60 °C) são efetivas. A quantidade de hidróxido de cálcio recomendada foi de 0,1 g  $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$  biomassa seca. A água apresenta pouco efeito na digestibilidade. O rendimento em glicose aumentou de 153 para 659 mg glicose/g biomassa seca, e para o pré-tratamento da palha de trigo aumentou de 65 para 650 mg glicose/g biomassa.

KAAR e HOLTZAPPLE (2000) estudaram o pré-tratamento de resíduos de milho com hidróxido de cálcio aumentando o rendimento da hidrólise enzimática em 9 vezes quando comparado com o da biomassa sem pré-tratamento. As condições recomendadas para o pré-tratamento foram: 0,075 g de  $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$  biomassa seca, 5g de água/g biomassa seca, tempo de 4 h a uma temperatura de 120 °C. A hidrólise foi realizada com variações de carga enzimática de 10 a 25 FPU/g biomassa seca. O pré-tratamento produz conversões de aproximadamente 100% dos polissacarídeos. Os autores concluem que o sucesso da sacarificação após do pré-tratamento depende da concentração da enzima.

Segundo CHANG e HOLTZAPPLE (2000), o principal efeito do pré-tratamento com hidróxido de cálcio é a remoção da lignina da biomassa, melhorando assim a reatividade dos polissacarídeos restantes. Afirmam que este pré-tratamento remove os grupos acetil e a adição de ar/oxigênio à mistura reacional melhora muito a deslignificação da biomassa, especialmente para materiais altamente lignificados como a madeira.

CHANG *et al.* (2001) mostraram que o pré-tratamento oxidativo utilizando hidróxido de cálcio na polpa de madeira a 150 °C durante 6 h removeu 77,5% da lignina e aumentou o rendimento de glicose na hidrólise enzimática de 7% (não tratada) para 77% (tratada).

KIM e HOLTZAPPLE (2005), pré-trataram resíduos de milho com um excesso de hidróxido de cálcio (0,5 g  $\text{Ca(OH)}_2/\text{g}$  biomassa seca) em condições oxidativas e não oxidativas a 25, 35, 45 e 55 °C. A condição ótima foi de 55 °C durante 4 semanas de reação com aeração. O rendimento global de glicanas e

xilose foi de 91,3% e 51,8%, respectivamente. O resíduo pré-tratado foi hidrolisado enzimaticamente com 15 FPU/g celulose. Somente 0,073 g de hidróxido de cálcio foram consumidos por grama de biomassa seca. Sob condições intensas 87,5% da lignina inicial foi removida. Os autores concluem que a deslignificação depende da temperatura e da presença de oxigênio. A lignina e a hemicelulose foram seletivamente removidas, mas a celulose não foi afetada pelo pré-tratamento com cal na faixa de temperaturas de 25-55 °C. O licor do pré-tratamento não apresentou efeito inibitório durante o processo de fermentação usando *Saccharomyces cerevisiae*.

MOSIER *et al.* (2005), afirmaram que para materiais menos lignificados, tais como a palha de milho, a adição do oxigênio aumenta muito pouco a digestibilidade da biomassa durante o pré-tratamento utilizando uma relação de biomassa/cal de 1:0,075 a 120 °C por até 6 h de reação. O pré-tratamento da palha de milho foi otimizado para um tempo de 4 h a 120 °C com uma remoção de 32% da lignina. O rendimento glicosídico foi de 88% após 7 dias de hidrólise, com uma carga enzimática de 25 FPU/g de biomassa.

RABELO *et al.* (2008), avaliaram as interações das variáveis que influenciam os pré-tratamentos do bagaço de cana-de-açúcar realizados com peróxido de hidrogênio alcalino e com hidróxido de cálcio. A melhor condição encontrada no planejamento foi 0,40 g de cal/g de biomassa seca a 70 °C durante 36 h. Para o pré-tratamento com peróxido hidrogênio o melhor resultado foi com 5% de peróxido, a 25 °C durante 1 h. Os autores concluem que os dois processos levam a altos rendimentos de glicose e açúcares redutores totais (ART).

SAHA e COTTA (2008), estudaram o pré-tratamento da casca de arroz com hidróxido de cálcio. O rendimento máximo de açúcares foi de  $154 \pm 1$  mg/g casca (rendimento de 32%), utilizando 100 mg  $\text{Ca(OH)}_2$ /g biomassa seca a 121 °C por 1 h com sacarificação enzimática a 45 °C, pH 5,0, durante 72 h usando uma mistura de enzimas comerciais (celulase,  $\beta$ -glicosidase e hemicelulase). A presença de furfural e hidroximetilfurfural não foi detectável no hidrolisado. A concentração de etanol produzido foi de 138 g/L, utilizando uma linhagem de *Escherichia coli* recombinada a pH 6,5 e 35 °C em 19 h, foi  $9,8 \pm 0,5$  g/L, com um rendimento de 0,49 g/g açúcares livres. Ainda segundo o

autor, o pré-tratamento com hidróxido de cálcio apresenta um alto efeito na acessibilidade da área superficial do substrato, além de alterar a estrutura e remover a lignina. Em contrapartida, ele apresenta um menor efeito na remoção da hemicelulose comparado com outros pré-tratamentos (explosão a vapor, ácido diluído água quente com pH controlado, etc.).

RONALD H.W *et al.* (2008), otimizaram o pré-tratamento com cal para a palha de trigo, obtendo como melhores condições de trabalho 0,15 g/g de cal, temperatura de 85 °C durante tempos de 20 h, atingindo rendimentos de 93% de glicanas e 81% de xilanas. O rendimento deste pré-tratamento quando comparado com o que emprega água quente é 3 a 4 vezes maior.

#### **2.4.5. Formação de inibidores na etapa do pré-tratamento**

Componentes inibitórios podem ser classificados em dois grupos: inibidores originalmente presentes na biomassa e inibidores produzidos por condições severas na etapa do pré-tratamento. Os inibidores presentes na biomassa lignocelulósica são facilmente liberados durante a etapa de pré-tratamento.

Exemplos de pré-tratamentos que produzem inibidores devido às condições drásticas são os pré-tratamentos que trabalham com reagentes ácidos combinados com altas temperaturas. Eles levam à degradação dos açúcares e da lignina e à produção de ácidos orgânicos. Da degradação da xilose resulta o furfural e da degradação das hexoses o inibidor produzido é o 5-hidroximetil furfural (HMF), os quais são produtos inibitórios bastante conhecidos para a etapa da fermentação (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). Quando é promovida a degradação destes inibidores, o ácido fórmico e levulínico são formados. Compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, catecol e siringaldeído, podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina (PALMQVIST *et al.*, 2000). Uma variedade de métodos biológicos, físicos e químicos pode ser aplicada com o fim de reduzir a concentração de inibidores antes de realizar uma hidrólise enzimática e uma fermentação.

## 2.5. Hidrólise Enzimática

A hidrólise, como o próprio nome descreve, envolve a quebra de ligações por adição de água. As enzimas são utilizadas como catalisadores para separar ou hidrolisar as cadeias de hemicelulose e celulose formando seus respectivos açúcares redutores, inclusive a glicose. 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 (SEGEL, 1975).

Diversos fatores devem ser considerados importantes para realizar a hidrólise enzimática, tais como porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose do material, entre outras. (SEWALT *et. al.*, 1997). O complexo enzimático usado na hidrólise se vê afetado por estas características da biomassa. A celulase é a enzima encarregada de hidrolisar a celulose, que é degradada em monômeros de glicose.

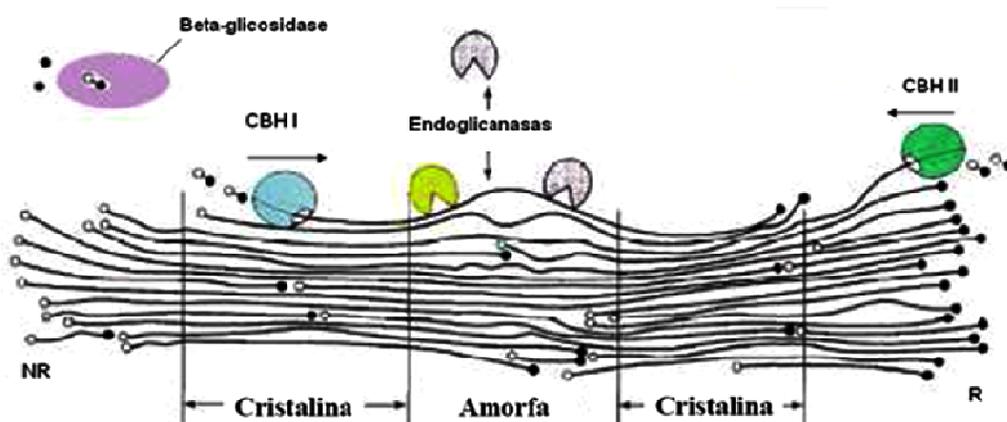
Na realidade, uma mistura de varias enzimas, incluindo a endoglicanase, exoglicanase e  $\beta$ -glicosidase é usada. O mecanismo de ação delas é visualizado na figura 2.8. O modo de ação tem início com o ataque das endoglicanases, que são as encarregadas de atacar as regiões amorfas das fibras de celulose e criam extremos para que seguidamente as exoglicanases ataquem as regiões cristalinas da fibra, por ultimo as  $\beta$ -glicosidases são as encarregadas de impedir a acumulação da celobiose realizando a degradação dela em glicose. As  $\beta$ -glicosidases diminuem o efeito inibitório que a celobiose exerce nas exoglicanases.

### 2.5.1. Enzimas celulase

As enzimas celulósicas são produzidas por uma ampla variedade de bactérias e fungos, aeróbicos e anaeróbicos, mesófilos e termófilos. Entretanto, são relativamente poucos os fungos e as bactérias que produzem altos níveis de celulase capazes de hidrolisar grandes quantidades de celulose cristalina.

As celulases podem ser classificadas de diferentes formas, mas os dois modos comumente usados são os baseados na especificidade do substrato e

os baseados nas semelhanças estruturais da enzima. Com base na especificidade do substrato (afinidade pela cadeia da glicose) se encontram as celobiohidrolases (CBHs), também chamadas exo-1,4- $\beta$ -D-glicanases, e em endo-1,4- $\beta$ -D-glicanases (EGs). E uma terceira classe de enzima que trabalha em conjunto e em forma sinérgica com as CBHs e EGs são as  $\beta$ -glicosidases (BG). Uma boa degradação da celulose exige a ação sinérgica do complexo celulolítico, como é o caso do complexo produzido pelos fungos do gênero *Trichoderma reesei*, o qual é formado por diversas enzimas endo- e exoglicanases (HENRISSAT *et al.*, 1998), e dois tipos de  $\beta$ -glicosidases (CHEN *et al.*, 1992). A sinergia entre as enzimas celulolíticas ocorre quando a ação combinada de duas ou mais enzimas conduz a uma taxa de reação mais elevada do que a soma de suas ações individuais (MANSFIELD *et al.*, 1999).



**Figura 2.8:** Representação esquemática da hidrólise da celulose e da ação do CBHs, EGs, e BG de *Trichoderma reesei*. C: regiões cristalinas, R: grupos terminais reductores (círculos preenchidos), NR: grupos terminais não-reductores, CBH I e II: exoglicanases, EG: endoglicanasas (Teeri, 1997).

### 2.5.1.1. Endoglicanase (EGs)

As endoglicanasas realizam quebras aleatórias nas regiões amorfas internas da cadeia de celulose, ou seja, regiões desordenadas hidratadas e flexíveis, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos (BOISSET *et al.*, 2000). As endoglicanasas são as responsáveis pela diminuição do grau de polimerização das cadeias celulósicas, conseqüentemente, produzindo novos lugares de ataque complementados pelas exoglicanases (LYND *et al.*, 2002).

Como resultado, há uma rápida diminuição no comprimento da cadeia e um lento incremento nos grupos redutores. O melhor substrato para a medição da atividade das endoglicanases é um derivado solúvel da celulose tal como é a carboximetilcelulose (CMC).

### 2.5.1.2. Celobiohidrolases (CBHs)

A ação das exoglicanases (ou CBHs) ataca gradualmente as extremidades da celulose liberando subunidades de celobiose (ROUVINEN *et al.*, 1990). Não são muito ativas contra a celulose cristalina, mas exibem ação sinérgica altamente cooperativa na presença de endoglicanases. Estas têm uma ação limitada sobre os substitutos de celulose como carboximetilcelulose (CMC) e hidroximetilcelulose (HEC).

As EGs e as CBHs estão sujeitas à inibição pelo produto (celobiose e glicose). A celobiose apresenta um efeito inibidor nas enzimas maior que a glicose (HOLTZAPPLE *et al.*, 1990).

LADISCH *et al.*, (1983), mencionam o possível modo de ação das exoglicanases como constituído dos seguintes passos: 1) adsorção e formação do complexo enzima substrato, 2) formação do produto, 3) dessorção e readsorção da enzima ou movimento da enzima ao longo da molécula de celulose.

### 2.5.1.3. $\beta$ -glicosidases (BGs)

As  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose e celooligossacarídeos solúveis à glicose. A remoção da celobiose é importante para diminuir o efeito inibitório desta nas exo e nas endoglicanases. 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. Como 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 pequena quantidade desta enzima pura. Isto com o fim de que haja uma diminuição na concentração de celobiose no meio reacional, e um aumento na eficiência da hidrólise enzimática (SUN e CHENG,

2002).

### 2.5.2. Fatores que afetam a hidrólise enzimática

Os fatores que afetam a hidrólise da biomassa têm sido tradicionalmente divididos em dois grupos: o primeiro procede das características estruturais da biomassa e o segundo relacionado com o mecanismo enzimático. Os inibidores provenientes de cada grupo encontram-se reportados na tabela 2.3.

Embora esta classificação tenha sido realizada, é importante ressaltar que muitos fatores estão interligados durante a etapa da hidrólise, e como resultado, a influência de cada fator é difícil de quantificar isoladamente. Um exemplo disto é a digestibilidade do substrato pelo sistema enzimático, que é afetada pelo tipo da biomassa, tipo de pré-tratamento e dosagem das enzimas na hidrólise (ESTEGHLALIAN *et al.*, 2001).

**Tabela 2.3:** Principais fatores que afetam a hidrólise enzimática

Inibição Substrato	Inibição Mecanismo Enzimático
Cristalinidade da celulose	Concentração de enzima
Degradação de polimerização (DP)	Adsorção
Disponibilidade/ acessibilidade na área superficial	Sinergismo
Tamanho de partícula	Inibição pelo produto final
Lignina	Mecanismo de desativação
Hemicelulose	Inativação térmica

#### 2.5.2.1 Efeito da Cristalinidade e do grau de polimerização

O índice de cristalinidade (Crl) é fortemente influenciado pela composição da biomassa. Para a biomassa lignocelulósica, o índice de cristalinidade mede a quantidade relativa da celulose cristalina nos sólidos totais. Apesar de que muitas pesquisas têm indicado que a cristalinidade está inversamente correlacionada com a digestibilidade, CHANG e HOLTZAPPLE (2000), observaram um aumento no Crl após o pré-tratamento da palha do milho com cal. TANAHASHI *et al.* (1983) também observou o incremento na cristalinidade

quando biomassas como o pino e a madeira (*Betula celtiberica* Rothm. & Vasc) foram pré-tratadas a explosão de vapor.

Outro trabalho mostra que a cristalinidade da celulose em diferentes materiais lignocelulósicos permaneceu inalterada, independentemente das mudanças estruturais causadas no pré-tratamento. No entanto, foi observada uma redução significativa no peso molecular, juntamente com um grande aumento no grau de sacarificação enzimática. Parece provável que o grau de cristalinidade não seja, portanto, o principal determinante da degradação enzimática da celulose (PURI 1984). Esta afirmação foi reforçada pela conclusão de que não era evidente a correlação entre o rendimento de sacarificação e a diminuição da cristalinidade, quando o conteúdo de lignina e hemicelulose eram baixos (SCHWALD *et al.*, 1988). CARRARD *et al.*, (2000) relatam que a cristalinidade da celulose pode ter influência na hidrólise quando há ausência de sinergismo devido a um sistema incompleto de celulases ou a uma insuficiente carga enzimática.

#### **2.5.2.2. Tamanho de partícula/ grau de polimerização**

A realização da moagem a seco aumenta o caráter amorfo da celulose, aumentando a digestibilidade *in vitro* e o tamanho de área superficial disponível, tanto da celulose amorfa como da cristalina. (CAUFIELD e MOORE, 1974).

Estudos sobre a hidrólise da biomassa branqueada pelo processo Kraft mostrou que maiores tamanhos das partículas deste substrato pode ser um fator inibitório, uma vez que foi mais lenta a taxa de hidrólise quando a polpa do processo Kraft não foi submetida a uma posterior etapa de redução de tamanho (MOONEY *et al.*, 1999). Para a polpa moída, os autores observaram um aumento na taxa de hidrólise devido a uma maior quantidade de área superficial disponível para a adsorção de celulases fornecida pelas partículas finas e pelas fibras pequenas. Por tanto, a superfície disponível está estritamente relacionada com a forma e a dimensão da partícula, e, assim, uma maior área de superfície disponível pode significar mais sítios disponíveis para a adsorção das enzimas por grama de substrato. Porém, pré-tratamentos que diminuem o tamanho do material lignocelulósico aumentam a área superficial, aumentando a taxa da hidrólise enzimática.

Outras pesquisas têm mostrado que diminuir o tamanho de partícula

abaixo de 40 mesh não aumenta a taxa de hidrólise (CHANG *et al.*, 1997). FAN *et al.*, (1981), observaram a diminuição tanto da cristalinidade como da área superficial específica quando a celulose foi moída durante 96 h, enquanto a taxa da hidrólise aumentava significativamente.

### **2.5.2.3. Acetilação**

O grau de acetilação da hemicelulose é um fator que tem recebido menor importância, entretanto parece que segundo pesquisas realizadas, à medida que se desacetila as xilanas das hemiceluloses nas madeiras duras e herbáceas, a fração de celulose e hemiceluloses se torna três vezes mais hidrolisável. (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

### **2.5.2.4. Efeito da lignina na hidrólise**

A lignina desempenha um papel importante na taxa e no rendimento da hidrólise enzimática. Todos os resultados reportados na literatura têm mostrado que a digestibilidade da celulose aumenta com a remoção da lignina (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000; DRAUDE *et al.*, 2001; GHARPURAY *et al.*, 1983, THOMPSON e CHEN, 1992). O principal papel inibitório da lignina foi atribuído à adsorção inespecífica da enzima na lignina (OOSHIMA *et al.*, 1990; SEWALT *et al.*, 1997) e à inacessibilidade à celulose, devido ao impedimento estérico (MOONEY *et al.* 1998).

### **2.5.2.5. Sinergia**

O sinergismo é um fenômeno por meio do qual a ação de uma mistura de dois ou mais componentes das celulases individuais é maior que a soma da ação de cada componente. Estudos realizados por HENRISSAT *et al.* (1985), e, WOODWARD *et al.* (1988), concluíram que a sinergia entre as enzimas celulolíticas purificadas era dependente da proporção individual das enzimas assim como da concentração e das propriedades físico-químicas do substrato.

Ações sinérgicas são mais evidentes na celulose microcristalina e menos sobre a celulose amorfa e não há sinergismo quando se utiliza derivados da celulose solúveis. Os tipos mais comuns de sinergismo são os que envolvem a ação das endoglicanases e das exoglicanases, sendo

chamadas de sinergia *endo-exo* (NIDETZKY *et al.*, 1994), ou de duas exoglicanases complementares, ou seja, atuando nas cadeias terminais redutoras e não redutoras da celulose, sendo denominado sinergismo *exo-exo* (HENRISSAT *et al.*, 1985; MEDVE *et al.*, 1994). Apesar dos enormes esforços realizados por diferentes pesquisadores, a compreensão do sinergismo durante a hidrólise enzimática não é total.

#### **2.5.2.6. Adsorção**

A adsorção das enzimas celulases e a formação do complexo enzima-substrato são consideradas um passo crítico na hidrólise enzimática da celulose (WALKER e WILSON, 1991). A adsorção da celulase ao material celulósico insolúvel foi descrita como irreversível (KRAULIS *et al.*, 1989), reversível (MOONEY *et al.*, 1999), ou semi-reversível (KLYOSOV *et al.*, 1980).

BOUSSAID e SADDLER, (1999), observaram também que a completa hidrólise do substrato é necessária, para que ocorra liberação das enzimas e, posteriormente, estas possam ser recicladas (GAN *et al.*, 2003).

RAMOS *et al.* (1993), observaram que a liberação das enzimas adsorvidas depende do conteúdo de lignina no substrato. NIDETZKY *et al.* (1994), descobriram que, durante a degradação da celulose por um complexo de enzimas de *T. reesei*, a adsorção específica de cada componente individual da enzima aumenta gradualmente, não havendo preferência de um componente em alguma fase da hidrólise da celulose. Isto se apresenta em contradição a CONVERSE e OPTEKAR (1993), que relataram que a celobiohidrolase é adsorvida preferencialmente.

#### **2.5.2.7. Inibição pelo produto final**

Sabe-se que as enzimas celulolíticas são inibidas pela celobiose e pela glicose, ou por ambas. Os estudos anteriormente realizados mostraram que a inibição pela celobiose é maior que a mostrada com a glicose (GHOSE 1969).

KASTEL'YANOS *et al.* (1995) mostraram que a glicose inibiu a  $\beta$ -glicosidase, enquanto que a celobiose inibiu a endoglicanase, enquanto a exoglicanase não foi inibida pelos produtos finais. Quando a glicose foi

adicionada à mistura reacional no início da hidrólise, a taxa da hidrólise diminuiu. O mesmo resultado foi observado na presença de celobiose, onde a taxa inicial de produção de glicose foi diminuída substancialmente. HOLTZAPPLE *et al.* (1990), relataram que todas as formas da enzima (livre, adsorvida e complexada) no processo de hidrólise da celulose estão sujeitas à inibição.

ZHENG (2007), classificou a adsorção em dois tipos: produtiva e não produtiva. O autor define a adsorção produtiva como a adsorção de enzimas que são usadas na hidrólise para a produção de açúcares. A adsorção não produtiva refere-se à adsorção das enzimas sobre a lignina de materiais lignocelulósicos. Estas enzimas não catalisam a hidrólise, o que diminui a eficácia da enzima e o rendimento de açúcares. Os ensaios foram realizados em temperatura constante com enzimas celulases e  $\beta$ -glicosidase razoavelmente puras e vários substratos. A provável ação sinérgica entre as enzimas não foi considerada. Os autores concluíram que a  $\beta$ -glicosidase não é adsorvida em celulose pura, além de evidenciarem a alta capacidade e afinidade de adsorção da  $\beta$ -glicosidase em lignina. Na adsorção da celulase os autores notam que a celulase após de hidrolisar a celulose em açúcares solúveis (celobiose e glicose), a enzima é liberada e adsorvida pelo conteúdo de lignina presente.

## 2.6. Cinética Enzimática

Enzimas solúveis em substratos insolúveis (ou vice-versa) apresentam cinética de sistemas heterogêneos. A cinética enzimática tem sido principalmente estudada em sistemas homogêneos, que são sistemas em que a reação ocorre em uma única fase (em geral líquida). Não obstante, reações muito importantes em sistemas heterogêneos ocorrem e, no caso da hidrólise de biomassa, dependem de três grupos de fatores: (1) características estruturais da celulose, (2) a natureza do sistema enzimático empregado e os (3) efeitos inibitórios dos produtos.

Modelos que explicam a hidrólise enzimática da celulose e da biomassa lignocelulósica podem ser divididos em duas categorias: mecanísticos e empíricos. Para deduzir um modelo enzimático mecanístico é

necessário conhecer as características estruturais da celulose e o modo de ação do complexo enzimático, como também devem serem examinadas as características cinéticas de sistemas heterogêneos celulose-celulase tais como: a transferência de massa, adsorção e dessorção da enzima, reação na superfície e produtos inibitórios.

Extensos estudos da cinética da hidrólise da celulose foram realizados ao longo dos últimos 50 anos para avaliar os possíveis mecanismos de ação das celulasas (BELDMAN *et al.*, 1988) e para desenvolvimento de modelos cinéticos, os quais podem ser usados para prever a taxa de sacarificação de um determinado composto (MATSUMO *et al.*, 1984; GUSAKOV *et al.*, 1985). Novos estudos têm dado origem a distintos modelos mecanísticos, cada um dos quais é capaz de simular uma parte da sacarificação no transcorrer do tempo para um determinado substrato com condições definidas. Os modelos diferem entre si nas hipóteses formuladas em relação à composição das enzimas celulasas, à complexidade do substrato, à inibição do produto e à estabilidade da enzima. No entanto, embora muitos estudos cinéticos tenham sido realizados, o mecanismo completo da ação da celulase não se conhece ainda.

A maior parte de modelos mecanísticos são modelos de Michaelis-Menten com inibição (HOLTZAPPLE *et al.*, 1984), com mudanças na adsorção de enzima e desativação térmica da enzima. (GUSAKOV *et al.*, 1992; SOUTH *et al.*, 1995). Modelos semi-empíricos foram desenvolvidos com base na suposição de que a reação enzimática entre a celulose e a celulase poderia ser descrita pela soma de reações de pseudo-primeira ordem (NIDETZKY e STEINER, 1993; SATTLER *et al.*, 1989). No entanto os modelos não conseguiram prever a digestibilidade dos tipos de biomassa estudados devido à complexidade da enzima, às características estruturais da biomassa lignocelulósica, às mudanças observadas na adsorção da enzima na biomassa com o transcorrer do tempo e à inibição da enzima pelos produtos finais.

## 2.7. Conclusões

Embora muitos estudos tenham sido realizados para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, poucos foram realizados considerando a interação

entre as variáveis que afetam o processo. Um dos alvos deste trabalho é o estudo da influência do tempo, temperatura e concentração de cal durante o pré-tratamento na digestibilidade de bagaço de cana, considerando os fatores individualmente e as interações entre eles. O objetivo é determinar os valores mínimos dos fatores que levam ao maior rendimento na produção de açúcares fermentescíveis na hidrólise.

Foi evidente a necessidade de se conhecer totalmente as características da biomassa antes, durante e após a etapa de pré-tratamento e de hidrólise enzimática, com o objetivo de determinar a variação dos diferentes componentes da biomassa e tentar entender o mecanismo de ação das celulasas.

### CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Neste capítulo será apresentado o desenvolvimento da metodologia experimental que foi requerida para a caracterização do bagaço de cana antes e após da etapa do pré-tratamento, assim como a descrição experimental de todos os procedimentos necessários para realizar as etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.

#### 3.1. Materiais e Reagentes

Os reagentes utilizados nos experimentos foram os seguintes

<b>Reagente, (Pureza)</b>	<b>Marca</b>
•Ácido Acético, (99,7%)	Synth
•Ácido Sulfúrico, (95–98%)	Synth
• Ácido dinitro-3,5-salicílico, (99%)	Vetec
•Ácido clorídrico, (37%)	Merck
• Ácido cítrico mono hidratado, ( 99,5%)	Dinâmica
• Álcool Etilíco ( 99,5%)	Synth
•Fenol ,(99%)	Vetec
•Hidróxido de sódio, (95-100%)	Nuclear
•Hidróxido de calcio, (96%)	Merck
•Kit Glicose God-Pap	Laborlab
•Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado, (99%)	Synth
•D-(+)-glicose, (≥99%)	Merck
•D-(+)-celobiose, (≥99%)	Fluka
•DL-xilose Fluka, (≥99%)	Fluka
•D-manose, (≥99%)	Chem Service
•DL-arabinose, (≥99%)	Sigma

#### 3.1.1. Equipamentos

Os equipamentos que foram utilizados nos experimentos são os seguintes:

- Agitador eletromagnético e peneiras circulares padronizadas da série de Taylor da marca Bertel
- Aparato soxhlet modelo MA – 188 da marca Marconi

- Autoclave vertical modelo AV 50 da marca Phoenix
- Agitador mecânico modelo MA-259 Marconi;
- Agitador magnético com aquecimento modelo MA-085 Marconi;
- Balança analítica da marca Bel Engineering com precisão de  $\pm 0,001$  g
- Balança da marca Marte com precisão de  $\pm 0,01$  g.
- Banho termostático modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de  $\pm 0,01$  °C.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da Waters, bomba de injeção modelo 515, detector de índice de refração modelo 410 e software Empower 2.
- Difratorômetro Rigaku Co. DMAXX 2200 (versão 2.2) com tubo de cobre
- Espectrofotômetro UV Mini-1240 Shimadzu com precisão na quarta casa decimal
- Espectrofotômetro 600S Femton com precisão na terceira casa decimal
- Estufa de secagem especial modelo MA-035/2 da marca Marconi
- Incubadora refrigerada com agitação (shaker) modelo MA-832 Marconi
- Medidor de pH marca Marconi com precisão de 0,01
- Moinho de faca modelo n° 3 da marca Wiley Mill
- Moinho de martelo General Eletronic
- Mufla modelo Q-318D24 da marca Quimis
- Reator/Fermentador de 500 mL, modelo MA 502/1000 da marca Marconi

### **3.2. Materia Prima**

A matéria-prima para todos os experimentos foi o bagaço de cana de açúcar proveniente da usina da Pedra, localizada no interior do Estado de São Paulo. Os dados do material fornecidos pela indústria foram: a colheita da cana foi mecanizada e não houve queima, o bagaço procede da última moenda.

### 3.2.1. Preparação do Bagaço de Cana

O bagaço de cana foi previamente seco em temperatura ambiente durante quatro dias. Após a secagem seu tamanho foi diminuído em um moinho de martelo marca General Electronic e posteriormente moído em um moinho de facas marca Wiley Mill modelo nº3, após deste tratamento físico foi separado granulometricamente em peneiras de Taylor de 32, 35, 80, 100, e 150 mesh. O material retido nas peneiras de 35, 80, 100 e 150, as quais cumpriam com o tamanho desejado para o estudo cinético (0,5 mm ou inferior), foi misturado e em seguida armazenado no freezer em sacolas hermeticamente fechadas para evitar o crescimento de microrganismos.

### 3.3. Caracterização Química do Bagaço de Cana-de-açúcar

Foram realizadas análises de composição química para o bagaço de cana antes e após cada pré-tratamento tais como: teor de umidade, cinzas, extrativos, análise de carboidratos, lignina solúvel e insolúvel. Estas metodologias são apresentadas a seguir.

O bagaço para todas as análises composicionais foi moído e peneirado. As frações retidas nas peneiras de 32 a 100 mesh foram misturadas, homogeneizadas e utilizadas para todos os procedimentos de caracterização.

#### 3.3.1. Teor de Umidade

A determinação de umidade nas amostras é importante para apresentar os resultados em termos de biomassa seca. Esta análise foi baseada na norma do NREL "Determination of Total Solids in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2005). Foram pesados béqueres de 50 mL ( $M_1$ ) previamente secos em uma estufa a 105 °C durante quatro horas e inseridos em um dessecador até temperatura ambiente. Amostras de 2 g de bagaço foram pesadas nos béqueres ( $M_2$ ), e levadas à estufa a 105 °C para secagem até peso constante com variação em  $\pm 0,001$  g na umidade atual após de 1 h de reaquecimento da amostra. Após este período, as amostras foram retiradas da estufa e colocadas num dessecador e pesadas novamente ( $M_3$ ).

Para o cálculo de teor de umidade se tem a equação 3.1

$$\% \text{ Teor de Umidade} = \left( \frac{M_2 - M_3}{M_2 - M_1} \right) \times 100 \quad 3.1$$

$M_1$  = massa do béquer vazio (g)

$M_2$  = massa da amostra úmida com béquer (g)

$M_3$  = amostra absolutamente seca com béquer (g)

### 3.3.2. Determinação de Cinzas

Para a determinação do teor de cinzas no bagaço de cana, pesou-se amostras de  $1,0 \text{ g} \pm 0,1 \text{ mg}$  do material, com teor de umidade conhecido, em três cadinhos de porcelana previamente tarados. Em seguida, as amostras foram inicialmente calcinadas em uma mufla a  $300 \text{ }^\circ\text{C}$  até total digestão do material (aproximadamente 10 min) e em seguida, a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  por duas horas. Após a calcinação, os cadinhos foram resfriados em dessecador e pesados. A calcinação foi repetida por mais 10 min para atingir massa constante. O teor de cinzas foi calculado pela equação 3.2

$$\% \text{ Teor de cinzas} = \left( \frac{M_{\text{cinzas}} - M_c}{M_{c1} - M_c} \right) \times 100 \quad 3.2$$

$M_{c1}$  = massa do cadinho + massa do bagaço absolutamente seco (g)

$M_c$  = massa do cadinho calcinado vazio (g)

$M_{\text{cinzas}}$  = massa do cadinho com cinzas, (g)

### 3.3.3. Determinação de extrativos

A determinação de extrativos foi baseada na norma NREL nº10 "Determination of Extractives in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2005). Pesaram-se amostras de 4 g de bagaço previamente moído e seco em cartuchos de extração e colocados para ser extraídos em um aparelho soxhlet. 190 mL de álcool etílico de 99% de pureza foram adicionados a cada balão do extrator junto com uma quantidade de pérolas de vidro. A extração termina quando o solvente que se encontra ao redor do cartucho de extração torna-se incolor. Em seguida foram retirados os cartuchos com as amostras do soxhlet, lavados com

100 mL de etanol, e secos em uma estufa a 105 °C até massa constante. As análises foram realizadas em triplicata. A quantificação do conteúdo de extraíveis é descrita na equação 3.3.

$$\% \text{ Extrativos} = \left( \frac{M_b - M_f}{M_b} \right) \times 100 \quad 3.3$$

$M_b$  = massa de bagaço seco (g)

$M_f$  = massa do bagaço livre de extrativos (g)

### 3.3.4. Determinação de Lignina Insolúvel e Solúvel

#### 3.3.4.1. Hidrólise Ácida

Para a determinação de lignina insolúvel (lignina klason) e lignina solúvel foram usadas as normas NREL N°003 (HYMAN *et al.*, 2007), e N°004 (TEMPLETON e EHRMAN, 1996), as quais exigem que o bagaço tenha umidade menor que 10%, e esteja livre de extrativos.

Amostras de 0,3 g de bagaço moído e peneirado foram pesadas ( $M_b$ ) e transferidas a tubos de ensaio. Os tubos foram colocados em banho Maria a 30 °C e 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% (p/p) foram adicionado a cada tubo de ensaio. Os tubos foram agitados a cada 10 minutos com bastão de vidro durante 1 h sem removê-los do banho com o fim de garantir uma hidrólise homogênea. Após este tempo, interrompeu-se a reação em um banho de gelo fundente adicionando-se 84 mL de água destilada e transferindo-se quantitativamente para erlenmeyers de 250 mL. As amostras foram fechadas e autoclavadas a 121 °C durante 1 h para a total hidrólise dos oligômeros formados. Após a descompressão, os erlenmeyers foram retirados, resfriados e filtrados em um funil com papel filtro previamente tarado e pesado. O hidrolisado foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 100 mL, para posteriores análises de lignina solúvel e carboidratos.

#### 3.3.4.2. Determinação de Lignina Klason (insolúvel)

O material retido no papel filtro foi lavado com 1L de água destilada e colocado a secar em uma estufa a 105 °C até massa constante ( $M_{kla}$ ). Parte

deste material insolúvel é constituída de cinzas, uma vez que estas não são solúveis em ácido. Assim, para que não haja uma superestimação dos valores de lignina insolúvel, a metodologia de determinação do teor de cinzas é realizada como descrito no item 3.3.2. O teor de lignina Klason foi calculado pela equação 3.4

$$\% \text{ Teor de lignina klason} = \left( \frac{M_{kla} - M_p}{M_b} \right) \times 100 - \% \text{ cinzas} \quad 3.4$$

$M_b$  = massa do bagaço absolutamente seco, (g)

$M_p$  = massa do papel filtro tarado, (g)

$M_{kla}$  = massa do papel filtro + lignina insolúvel seca, (g)

### 3.3.4.3 Determinação de Lignina solúvel

Transferiu-se 1,0 mL do hidrolisado ácido para balões volumétricos de 25 mL, completando-se com água destilada. Realizaram-se as leituras em um espectrofotômetro UV-Visível a 205 nm. As leituras foram feitas antes de completar 6 horas de hidrólise. O cálculo da concentração da lignina solúvel é realizado pela equação 3.5

$$\% \text{ Lignina solúvel} = \left( \frac{abs * V_f * df}{\epsilon_{lig} * B * M_b} \right) \times 100 \quad 3.5$$

$abs$  = absorbância da amostra a 205 nm

$V_f$  = volume final do hidrolisado 0,087 L

$df$  = fator de diluição

$B$  = comprimento do caminho óptico, 1 cm

$\epsilon_{lig}$  = absortividade da lignina solúvel a 205 nm, 105 L/g.cm , (FERRAZ, 2000)

$M_b$  = massa do bagaço absolutamente seco (g)

### 3.3.4.4. Determinação de Carboidratos por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

Os teores de celobiose, glicose, xilose e, arabinose presentes no filtrado da hidrólise com ácido sulfúrico 72% do material lignocelulósico (descrito no item 3.3.4.1), foram analisados por CLAE. Uma pequena alíquota de aproximadamente 2 mL da solução foi eluída em um cartucho de extração seringa de poros 0,45 µm da marca Whatman e injetadas em uma coluna Sugar Paks (Waters) utilizando como fase móvel água filtrada e desgaseificada com fluxo de 0,5 mL/min, à temperatura de 90 °C. Os compostos separados na fase estacionária foram monitorados com um detector de índice de refração (IR) modelo 410 da Waters a 40 °C. As concentrações de cada componente foram obtidas pela correlação entre as áreas dos cromatogramas e as curvas padrão (previamente determinadas por padrões de D-(+) celobiose, D-glicose, D-xilose e D-arabinose).

As massas de celobiose e glicose foram convertidas em celulose, com os fatores de 0,95 e 0,90, respectivamente, como também as massas de xilose e arabinose foram convertidas para hemiceluloses, empregando-se o fator de 0,88. O cálculo do teor de carboidratos realizou-se com a equação 3.6.

$$\% \text{ açúcares} = \left( \frac{C_{CLAE} * Ft * V_{filtrado}}{M_b} \right) \times 100 \quad 3.6$$

$C_{CLAE}$  = concentração do açúcar quantificado por CLAE, (g/L).

$Ft$  = Fator de correção para calcular a concentração polimérica dos açúcares dada a concentração monomérica dos açúcares (celobiose= 0,95, glicose= 0,9, xilose= 0,88).

$V_{filtrado}$  = volume do hidrolisado filtrado, (0,087 L)

$M_b$  = massa do bagaço seco, (g)

### 3.3.5. Determinação de Cristalinidade

A cristalinidade da celulose foi medida com difração de raios X. Este equipamento usa radiação eletromagnética para determinar os espaços interplanares e a estrutura cristalina do material. Os substratos celulósicos

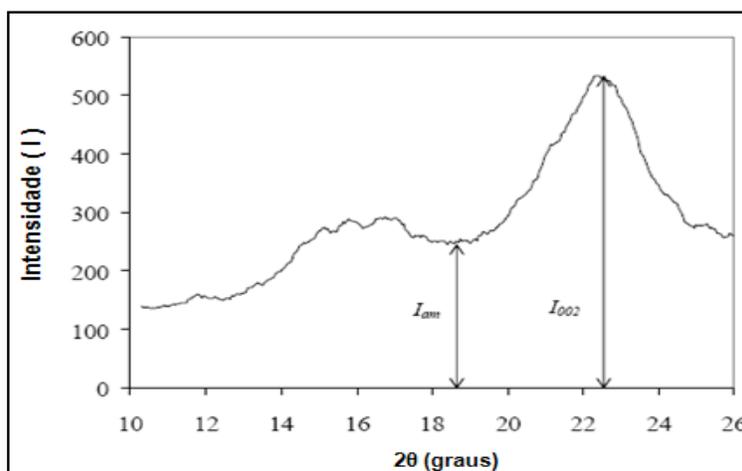
apresentam um pico intenso a  $22,6^\circ$  que é devido à sua estrutura cristalina. Além disso, mostram um ruído na linha de base, o qual é causado fundamentalmente pela parte cristalina ou pela zona amorfa. O índice de cristalinidade é calculado usando a equação 3.7, a qual emprega as intensidades de difração da estrutura cristalina (plano 002,  $2\theta \approx 22,5^\circ$ ) e da fração amorfa ( $2\theta = 18,7^\circ$ ). O CrI será determinado com a porcentagem de material cristalino e amorfo na biomassa (SEGAL *et al.*, 1959) como é mostrado na figura 3.1.

$$\% CrI = \left( \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad 3.7$$

Onde

$I_{002}$  = intensidade de difração da parte cristalina a uma posição de 002, aprox.  $2\theta = 22,5^\circ$ .

$I_{am}$  = intensidade de difração da estrutura amorfa a  $2\theta \approx 18,7^\circ$



**Figura 3.1:** Exemplo de difração de raios X da madeira. (SEGAL *et al.*, 1959)

### 3.4. Métodos analíticos para a quantificação de Açúcares

#### 3.4.1. Quantificação de Glicose

Para a quantificação da glicose, foram adicionados  $10 \mu\text{L}$  de cada uma das amostras em tubos de ensaio (previamente identificados) e adicionado  $1,0 \text{ mL}$  do kit enzimático GOD PAP, levados a um banho termostatizado a  $30^\circ\text{C}$  durante  $10 \text{ min}$ . A reação foi interrompida retirando os tubos do banho e colocando-os em um banho de gelo fundente para terminar a reação. A cada amostra foram adicionados  $3,0 \text{ mL}$  de água destilada e a absorbância foi lida

em um espectrofotômetro a 540 nm. Para o cálculo de concentração de glicose foi feita uma curva de calibração partindo de uma solução de 1 g/L glicose e foram feitas as diluições necessárias para que a absorbância das amostras estivesse dentro do intervalo da curva padrão.

### **3.4.2. Quantificação de Açúcares redutores totais (ART)**

As concentrações de ART foram determinadas de acordo com o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) segundo MILLER (1959). Adiciona-se 0,5 mL de amostras em cada tubo de ensaio e 0,5 mL de reagente DNS. Os tubos foram mantidos em um banho a 95 °C durante 12 min. Após este tempo reacional, as amostras foram resfriadas imediatamente em um banho de gelo fundente, adicionando-se em seguida 3,5 mL de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado. As leituras da absorbância foram efetuadas no espectrofotômetro a 540 nm. Para zerar o espectrofotômetro, preparou-se um branco onde o volume da amostra foi substituído por água destilada.

Para o cálculo de concentração de glicose foi feita uma curva de calibração partindo de uma solução de 0,5 g/L glicose e foram feitas as diluições necessárias para que a absorbância das amostras estivesse dentro do intervalo da curva padrão.

## **3.5. Determinação das Atividades Enzimáticas**

Para determinação da atividade das enzimas foram preparadas soluções com várias concentrações de enzimas em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8.

### **3.5.1. Determinação da Atividade da Celulase**

A atividade foi determinada como unidades de filtro de papel (Filter Paper Units "FPU") por volume de enzima original (GHOSE, 1987).

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução de celulase (marca Sigma-Aldrich) de diluição de 1:20 e 5 novas diluições foram realizadas a partir desta. Em cada tubo de ensaio adicionou-se 50 mg de papel de filtro e em seguida 1,0 mL de tampão citrato. Os tubos foram colocados em um banho termostático a 50 °C durante 10 minutos para um equilíbrio de temperatura. Após de este tempo, sem retirar do banho, foi

adicionado 0,5 mL da enzima diluída a cada tubo e deixados reagir por 60 minutos. Ao final deste período, a reação é interrompida imediatamente com a adição de 3 mL de DNS misturado. Os tubos foram fervidos durante 5 minutos a 95 °C e posteriormente transferidos para um banho de gelo fundente. Quando a polpa de papel restante da reação foi assentada, a amostra foi lida no espectrofotômetro a 540 nm.

**Observação:** O preparo do DNS misturado foi realizado tomando uma alíquota de 100 mL de DNS e adicionado-se 30,6 g de tartarato duplo de sódio e potássio. Após a dissolução completa do sódio, o volume foi completado até 140 mL. A curva de calibração foi feita utilizando o método de quantificação de ART descrito na seção 3.4.2 (utilizando DNS misturado). Foram feitos brancos de enzima e de papel. Todas as diluições foram realizadas em triplicata.

Para o cálculo da atividade enzimática segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente em mols (2,0/0,18016  $\mu\text{mol}$ ) do volume de enzima adicionada a cada ensaio (0,5 mL), e no tempo de incubação requerido (60 minutos) para a geração dos equivalentes (enzima diluída). Este conceito é mostrado na equação 3.8.

$$\frac{FPU}{mL} = \left( \frac{2,0}{0,1816 * 0,5 * 60[\text{enzima diluída}]} \right) \mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mL}^{-1}$$

$$\frac{FPU}{mL} = \left( \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]} \right) \quad 3.8$$

### 3.5.2. Determinação da atividade da $\beta$ -glicosidase

A atividade da  $\beta$ -glicosidase foi determinada através de uma solução de celobiose (marca novozymes) 15 mmol/L e expressa em unidades de celobiose (CBU), a metodologia foi seguida segundo WOOD e BHAT, (1988).

Para a determinação da atividade enzimática, partiu-se de uma solução de celulase de diluição de 1:1000 e 5 novas diluições em tampão citrato 0,05 mol/L pH 4,8, foram feitas a partir desta. Para cada tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL de cada uma das diluições da enzima e estes foram colocados em

um banho termostático a 50 °C durante 10 minutos para um equilíbrio da temperatura. Após de este tempo, sem tirar os tubos do banho, foi adicionado 0,5 mL da enzima diluída a cada tubo e deixados reagir durante 30 min. Ao término da reação, os tubos foram imersos em um banho de água fervente por 5 minutos e posteriormente transferidos para um banho de gelo.

Para a determinação da concentração de glicose liberada, coloca-se 20 µL de solução final com 2 mL do mono-reagente glicose GOD PAP. Os tubos foram incubados em um banho a 37 °C durante 10 minutos, ao término do tempo, adiciona-se 0,2 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% em cada tubo e efetuou-se a leitura a 540 nm em um espectrofotômetro.

O cálculo da atividade baseia-se no conceito da unidade da atividade de β-glicosidase (CBU), a qual é a liberação de exatamente 1,0 mg de glicose, isto é, 0,5/0,18016 µmol de celobiose convertida por 1,0 mL de enzima diluída em 30 minutos de reação. A equação 3.9 mostra o cálculo da atividade

$$\frac{CBU}{mL} = \left( \frac{0,5}{0,1816 * 1,0 * 30[enzima\ diluída]} \right) \mu mol * min^{-1} * ml^{-1}$$

$$\frac{CBU}{mL} = \left( \frac{0,0926}{[enzima\ diluída]} \right) \quad 3.9$$

### 3.6. Planejamento de Experimentos

Para o pré-tratamento do bagaço de cana com cal tomou-se como ponto de partida o estudo de Rabelo *et al.* (2008), onde foram realizados os primeiros avanços nas análises de interação das variáveis de pré-tratamento: tempo de contato (h), temperatura (°C) e concentração de Ca(OH)<sub>2</sub> (g/g biomassa seca). Estes autores concluíram que o pré-tratamento de bagaço com cal nas condições consideradas não poderia ser representado por um modelo linear e sugeriram que se deveria partir para um modelo quadrático.

A partir desta conclusão e com o fim de otimizar o pré-tratamento com cal foi realizado um planejamento composto central com as mesmas três variáveis do processo usadas por Rabelo *et al.* (2008), já que estes autores determinaram que todas as três variáveis eram significativas. O intervalo inicial de trabalho para cada variável para o planejamento composto central foi:

Tempo de contato(h): 20-50

Temperatura (°C): 60-80

Massa de Ca(OH)<sub>2</sub> (g/g biomassa seca): 0,25-0,55

### 3.7. Pré-tratamento do Bagaço de Cana com Hidróxido de Cálcio (Cal)

Amostras de 4,0 g de bagaço de cana foram pesadas em erlenmeyers de 500 mL, sendo adicionados 100 mL de água destilada a cada amostra junto com quantidades de cal, temperatura e durante o tempo previamente determinados pelo planejamento de experimentos. As amostras foram fechadas e levadas à incubação a uma rotação de 150 rpm. Ao final de cada reação, os erlenmeyers foram submergidos em um banho de gelo fundente para interromper a reação. Após este processo o pH foi ajustado a 7.0 para calcular o excesso de cal remanescente no pré-tratamento (ver procedimento 3.7.1). Posteriormente, o bagaço foi lavado e seco em estufa a 40 °C até massa constante.

#### 3.7.1. Quantificação do excedente de Cal após do Pré-tratamento

Excesso de cal foi usado para manter um pH alcalino ( $\geq 12.0$ ), requerido para o pré-tratamento. Para a quantificação do excedente de cal após o pré-tratamento, as amostras foram colocadas em agitadores magnéticos e ajustadas lentamente até pH 7,0 com uma solução de ácido clorídrico 5 N. O excedente de cal foi calculado com a equação (3.10), (KIM *et al.*, 2005).

$$W_c(g) = \frac{1 \text{ mol de Ca(OH)}_2}{2 \text{ mol HCL}} \times \frac{N_{HCL} \times (V_i - V_f)}{1000} \times M_{w_c} \quad 3.10$$

Onde:

$W_c$  = excedente de cal (g)

$M_{w_c}$  = massa molar de hidróxido de cálcio, 74,092 g/mol

$N_{HCL}$  = Concentração do ácido clorídrico, (mol/L), (5N)

$V_i - V_f$  = Volume total da solução de HCl para titular o líquido do pré-tratamento (mL)

### **3.8. Hidrólise Enzimática do Bagaço Pré-tratado**

Amostras de 1,0 g de bagaço previamente pré-tratadas foram pesadas em erlenmeyers de 500 mL adicionando-se 300 mL de água destilada. As soluções foram ajustadas a um pH ótimo de 4,8 (Rabelo et al., 2008) . Após o ajuste foram adicionados à cada amostra uma carga enzimática de 1 CBU/g biomassa seca e 5 FPU/ g biomassa seca de enzima  $\beta$ -glicosidase e de enzima celulase, respectivamente. Os erlenmeyers foram fechados e levados a incubação em um shaker a temperatura de 50 °C com rotação de 100 rpm. Durante a hidrólise, alíquotas de 2 mL foram coletadas em tempos de 0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h para análises posteriores de glicose e ART. As alíquotas foram tomadas em tubos de ensaio devidamente identificados e fervidas a 105 °C durante 10 min. para a desativação da enzima. Ao final das 72 h de hidrólise, os resíduos restantes foram lavados com água destilada em uma peneira de 150 mesh. As amostras foram levadas a secagem a 105 °C, e pesadas para determinar a massa hidrolisada.

### **3.9. Análise Estatística**

Os planejamentos fatoriais têm sido amplamente utilizados para a otimização de vários tipos de processos devido à possibilidade de investigar simultaneamente diversas variáveis com um número reduzido de experimentos, economizando tempo e reagentes. Outra grande vantagem dos planejamentos de experimentos é permitir verificar os efeitos individuais dos fatores e suas interações.

A significância dos fatores experimentais foi testada pelo teste t de Student considerando o nível de significância de 10%. Para a análise estatística dos efeitos dos fatores foram selecionados os pontos nos quais as respostas (massas e as concentrações de ART e glicose da hidrólise enzimática) atingiram valores constantes com o tempo (aproximadamente 60 h).

Um planejamento composto central com três réplicas no ponto central foi realizado. Os fatores foram codificados de acordo com a equação 3.11

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i} \quad i = 1, 2, \dots, k \quad 3.11$$

Onde  $x_i$  e  $X_i$  são os valores codificados e real do fator  $i$ , respectivamente,  $X_0$  é o valor real do fator no ponto central e  $\Delta X_i$  é a variação de  $X_i$  correspondente a uma unidade de variação na escala codificada.

$$y_i = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad i = 1, 2, \dots, k; j = 1, 2, \dots, k; i \neq j \quad (3.12)$$

A equação 3.12 descreve as contribuições dos vários fatores na resposta, onde o coeficiente  $b_0$  é a resposta do ponto central e os outros coeficientes correspondem à metade dos efeitos principais e de interações das variáveis codificadas na resposta. Nessa equação, os efeitos das variáveis codificadas podem ser comparados diretamente com o coeficiente da equação.

## **CAPITULO 4- OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO COM HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Entre todos os fatores que influenciam a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica, entre os mais complicados estão as características estruturais. É amplamente conhecido que a área superficial acessível e o conteúdo de lignina desempenham um papel importante na taxa e no rendimento da hidrólise da biomassa. A digestibilidade da biomassa aumenta com um incremento na acessibilidade da área superficial e na remoção de lignina (THOMPSON e CHEN, 1991). Neste capítulo, estudaram-se as melhores condições de pré-tratamento com cal, realizando a análise dos efeitos das variáveis tempo de pré-tratamento, temperatura e concentração de cal com o objetivo de maximizar a produção de açúcares fermentescíveis na hidrólise enzimática posterior.

### **4.1. Caracterização do Bagaço de Cana de Açúcar**

Para a caracterização do bagaço de cana, previamente foi determinado o conteúdo de umidade e de cinzas, que foram de 5,12% e 1,55%, respectivamente, (item 3.3). Após a caracterização física, o bagaço foi submetido a uma hidrólise ácida tal como foi descrito no item 3.3.4, com o fim de obter o teor de seus constituintes. Os resultados da hidrólise dos polissacarídeos e da composição em geral são apresentados na tabela 4.1.

Os compostos presentes no bagaço de cana em maior quantidade foram: a celulose, a lignina e a hemicelulose, e em menores quantidades encontraram-se extrativos e cinzas. Apesar de o bagaço usado ter sido proveniente de colheita crua e mecanizada, a porcentagem de cinzas é considerada baixa.

A quantidade de lignina reportada na tabela 4.1 envolve a lignina solúvel e insolúvel. A insolúvel é definida como um resíduo que não se solubilizou em ácido e que permanece retida na biomassa (retida no papel filtro) após sofrer hidrólise ácida com aplicação de ácido sulfúrico 72% (p/p). A lignina solúvel representa a porção que sofre degradação durante a hidrólise ácida e, desta forma, permanece no líquido do filtrado hidrolisado. A

composição apresenta um 9,11% de outros compostos tais como o conteúdo de furfural, hidroximetilfurfural, fenóis e grupos acetil.

**Tabela 4.1:** Composição química do bagaço de cana proveniente da usina da pedra livre de extrativos em base seca.

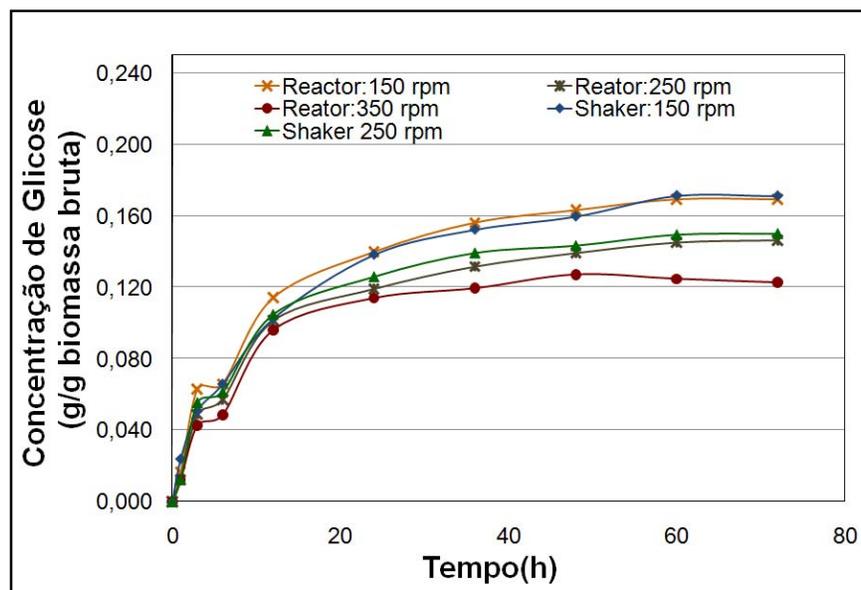
Componentes	Porcentagem (%)	Desvio Padrão
Cinzas	1,55	0,48
Celulose	37,35	0,51
Hemicelulose	23,65	0,88
Lignina	25,09	0,45
Extrativos	3,25	0,20
Outros	9,11	-

#### 4.2. Análise das melhores condições de agitação para o pré-tratamento com hidróxido de cálcio

Esta análise foi realizada visando encontrar a melhor condição de agitação no pré-tratamento com cal, além de observar se a agitação realizada na incubadora tinha o mesmo efeito que a realizada em um reator com um agitador tipo turbina axial. Os pré-tratamentos foram realizados a diferentes agitações (150, 250 e 350 rpm) em um reator com 100 mL a uma temperatura de 87 °C durante 72 h e 0,14 g de cal/g de bagaço. Estas mesmas condições foram usadas para os experimentos no shaker. Após o período do pré-tratamento, o bagaço foi levado às condições necessárias para realizar a hidrólise enzimática (ver item 3.8). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Na figura 4.1 são apresentados os diferentes perfis de hidrólise para análise de agitação durante o pré-tratamento. A etapa de hidrólise foi sempre realizada em shaker. Não se notou diferença no rendimento em glicose quando o pré-tratamento foi realizado com a mesma agitação em shaker ou reator. Observou-se uma queda na produção de glicose com o aumento da agitação. Um dos motivos provavelmente foi que a maior parte da biomassa permaneceu aderida nas paredes do reator, evitando assim, a homogeneização do material, e conseqüentemente uma diminuição na efetividade do pré-tratamento. A máxima produção de glicose foi de 0,169 g/g biomassa seca, com a agitação

no shaker e 0,171 g glicose/g biomassa seca para a realizada no reator a 150 rpm.



**Figura 4.1:** Perfis de hidrólise enzimática a diferentes velocidades de agitação na etapa do pré-tratamento.

O shaker com agitação de 150 rpm foi escolhido como equipamento para realizar os ensaios posteriores de pré-tratamento, para possibilitar a realização de vários experimentos ao mesmo tempo.

### 4.3. Otimização do Pré-tratamento com Cal

#### 4.3.1. Primeiro Planejamento fatorial composto central do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.

Como foi explicado no capítulo 3, baseado em RABELO *et al.*(2008), foram estudadas três variáveis do processo de pré-tratamento com cal: o tempo de reação (h), a temperatura (°C) e a concentração de cal ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) (g/g biomassa seca)). Para isso foi realizado um planejamento composto central com três repetições no ponto central. A agitação foi fixada em 150 rpm. A Tabela 4.2 apresenta as faixas escolhidas para cada uma das variáveis com seus níveis respectivos.

A etapa de pré-tratamento e a hidrólise enzimática foram realizadas com a metodologia experimental descrita nos itens 3.7 e 3.8, respectivamente.

Em todos os ensaios foram medidas as concentrações de glicose e de ART liberadas durante a hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em função do tempo.

**Tabela 4.2:** Faixa de valores estudados no planejamento composto central

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo de contato (h)	7,41	20	37	54	64,6
Temperatura (°C)	53,2	60	70	80	86,8
Concentração de Cal(g/g de biomassa seca)	0,15	0,25	0,4	0,55	0,65

É apresentada na tabela 4.3 a matriz de planejamento composto central com as combinações dos níveis para cada um dos ensaios e sua respectiva resposta de concentração de glicose e ART, as quais foram quantificadas com a metodologia descrita no item 3.2. Os ensaios 15.1, 15.2 e 15.3, representam repetições no ponto central. As concentrações de ART e glicose são expressas como g/g biomassa bruta seca.

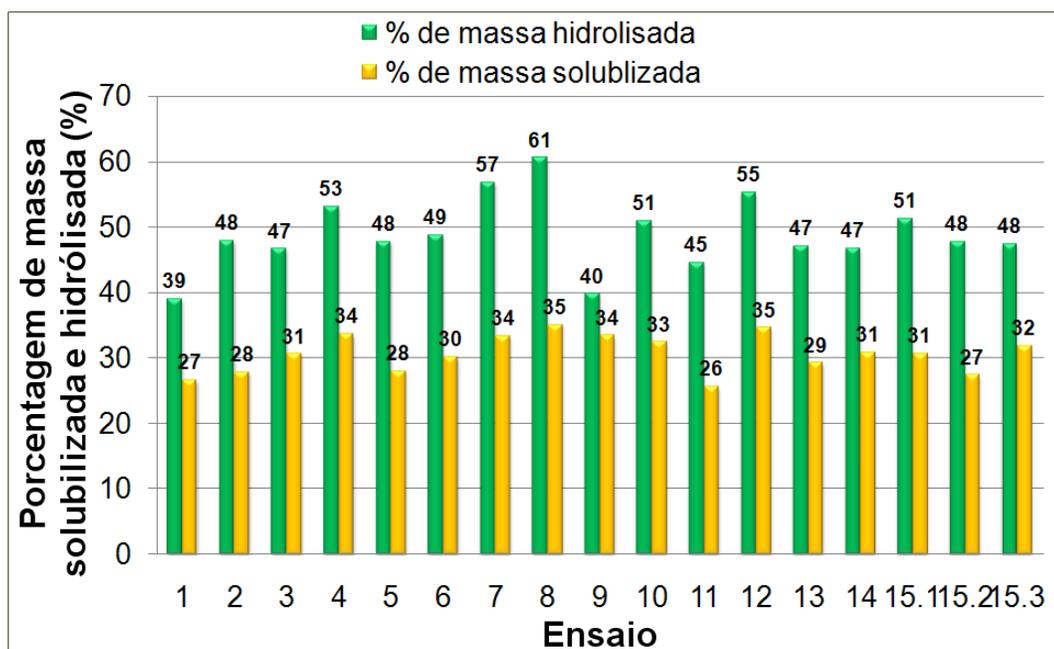
**Tabela 4.3:** Matriz de planejamento composto central com três pontos centrais com suas respostas.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração de cal (g/g)	Glicose (g/g)	ART (g/g)
1	20	60	0,25	0,140	0,243
2	20	60	0,55	0,169	0,258
3	20	80	0,25	0,164	0,370
4	20	80	0,55	0,186	0,315
5	54	60	0,25	0,182	0,283
6	54	60	0,55	0,174	0,347
7	54	80	0,25	0,200	0,366
8	54	80	0,55	<b>0,205</b>	0,386
9	7,41	70	0,40	0,136	0,230
10	64,6	70	0,40	0,197	0,371
11	37	53,2	0,40	0,177	0,288
12	37	86,8	0,40	0,192	0,419
13	37	70	0,15	0,183	0,348
14	37	70	0,65	0,176	0,330
15.1	37	70	0,40	0,188	0,362
15.2	37	70	0,40	0,177	0,402
15.3	37	70	0,40	0,179	0,345

Na referida tabela observa-se que a maior liberação de glicose e de ART ocorreu nos ensaios 8 e 12, respectivamente. A maior produção de glicose aconteceu no nível +1 para todos os fatores (54 h, 80 °C e 0,55 g cal/g biomassa) com um valor de 0,205 g glicose/g biomassa seca e a maior produção de ART foi de 0,419 g/g biomassa seca quando o tempo e a concentração de cal estavam nos valores de ponto central e a temperatura no nível máximo considerado (+1,41).

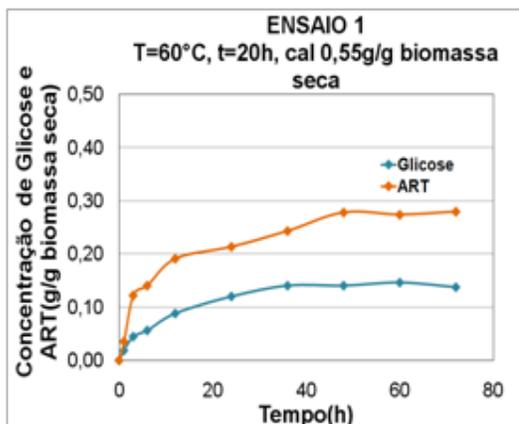
A figura 4.2 mostra as massas restantes após o pré-tratamento de 4 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado. Nela nota-se que aproximadamente 30% de biomassa foi solubilizada no pré-tratamento e 50% de massa é hidrolisada. Além disso, observa-se que a maior perda de massa ocorreu no ensaio 8 da etapa de pré-tratamento, igualmente, este ensaio foi o que apresentou maior produção de glicose na hidrólise.

A baixa perda de massa no pré-tratamento com hidróxido de cálcio pode ser explicada pela pouca remoção de hemicelulose, característica deste tipo de pré-tratamento. Este tem um alto efeito na acessibilidade da área superficial do substrato, pois altera a estrutura da lignina e da hemicelulose facilitando o ataque enzimático (MOISER *et al.* 2005).

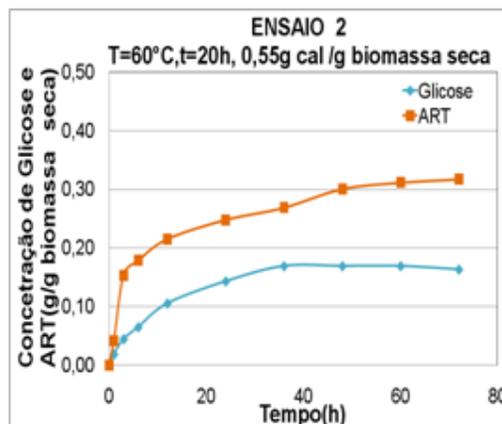


**Figura 4.2:** Massa de bagaço solubilizada após o pré-tratamento de 4 g de bagaço e após a hidrólise enzimática de 1 g de bagaço pré-tratado.

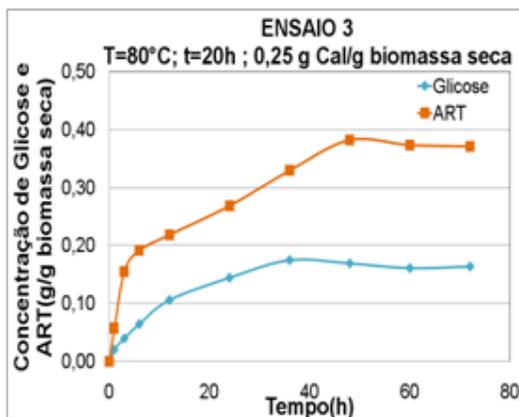
Os gráficos apresentados na figura 4.3 (a-o) mostram os perfis da liberação de glicose e de ART na hidrólise de bagaço pré-tratado em termos de massa, com o fim de avaliar a etapa do pré-tratamento. Os dados experimentais das figuras podem ser visualizados no anexo C. Na figura referida observa-se uma maior liberação de ART em comparação com glicose. A quantificação de ART inclui a concentração de glicose e de todas as outras hexoses e pentoses liberadas, assim como da celobiose.



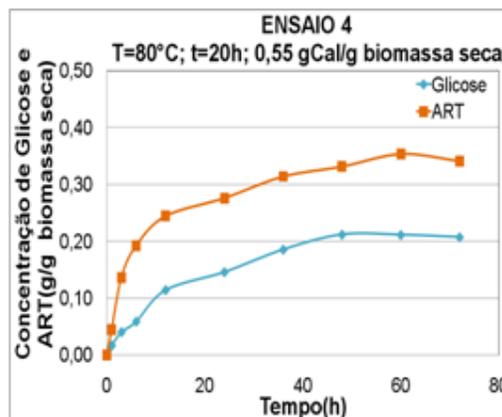
(a)



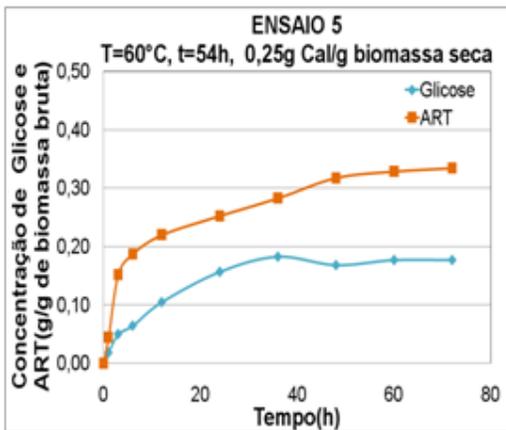
(b)



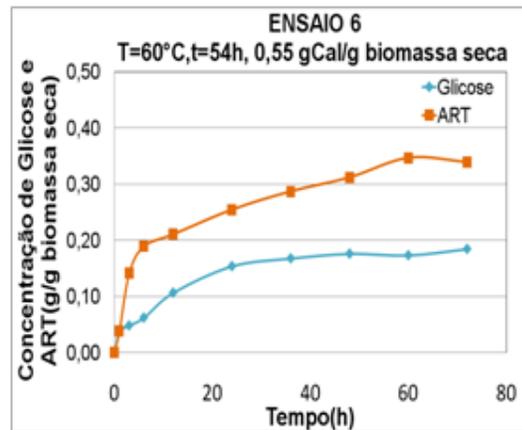
(c)



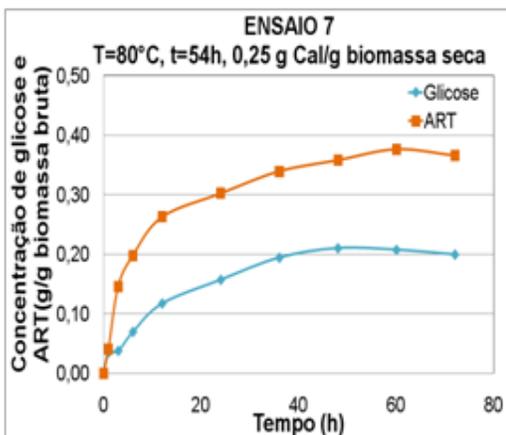
(d)



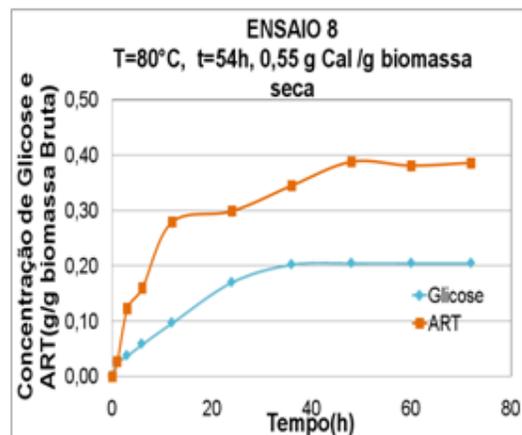
(e)



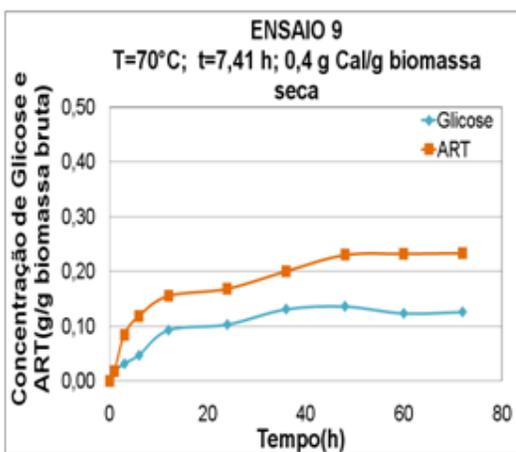
(f)



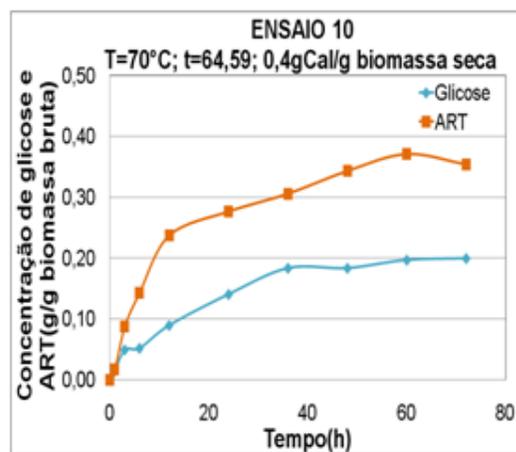
(g)



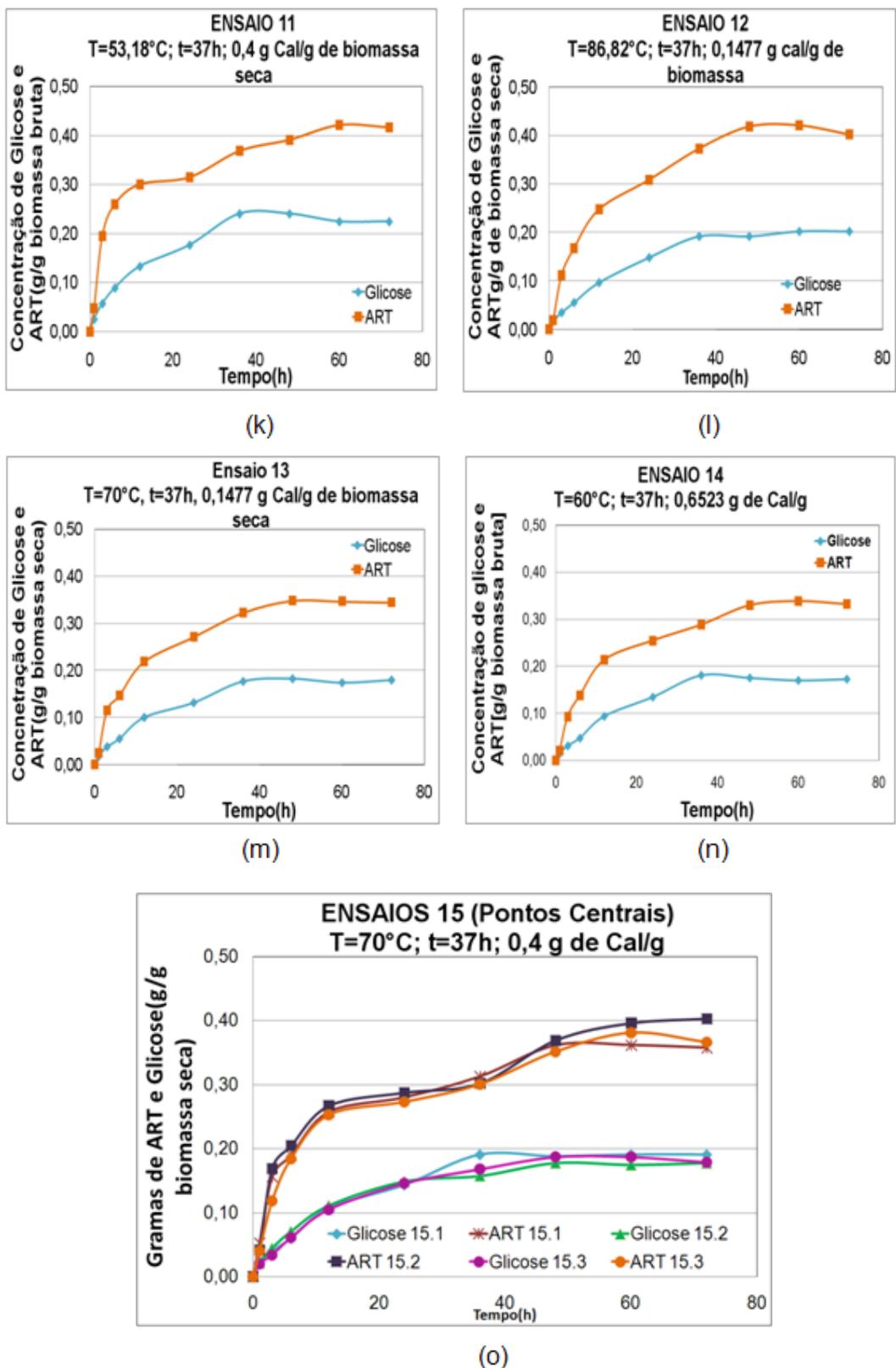
(h)



(i)



(j)



**Figura 4.3:** Perfis de hidrólises dos ensaios do 1º planejamento composto central das concentrações de glicose e ART por grama de biomassa seca.

#### 4.3.1.1. Análise estatística da produção de glicose (g/g) do 1º planejamento composto central

Com o fim de avaliar a etapa do pré-tratamento com cal, foi tomada como variável de resposta mais importante na análise estatística a produção de glicose na hidrólise enzimática posterior.

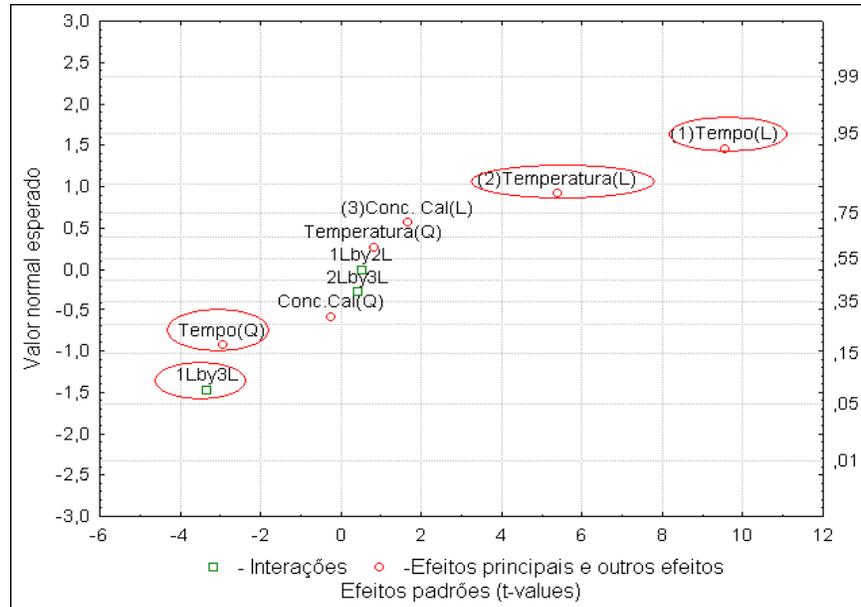
A análise dos efeitos principais e das interações no planejamento composto central pode ser visualizada na tabela 4.4 considerando um nível de confiança de 90%. O efeito principal com maior significância na produção de glicose foi o tempo, seguido da temperatura, sendo os dois efeitos positivos. Além disto, se mostraram significativos o termo quadrático do tempo e a interação entre o tempo e a concentração de cal (“1 e 3”).

**Tabela 4.4:** Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para a concentração de glicose (g/g) produzida.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coeficiente
Média	$1,812 \times 10^{-1}$	$3,325 \times 10^{-3}$	$5,449 \times 10^1$	$3,370 \times 10^{-4}$	$1,812 \times 10^{-1}$
(1)Tempo	$2,979 \times 10^{-2}$	$3,123 \times 10^{-3}$	9,539	$1,081 \times 10^{-2}$	$1,490 \times 10^{-2}$
Tempo(Q)	$-1,012 \times 10^{-2}$	$3,437 \times 10^{-3}$	-2,946	$9,846 \times 10^{-2}$	$-5,064 \times 10^{-3}$
(2)Tempe.	$1,682 \times 10^{-2}$	$3,123 \times 10^{-3}$	5,386	$3,278 \times 10^{-2}$	$8,411 \times 10^{-3}$
Tempe(Q)	$2,780 \times 10^{-3}$	$3,437 \times 10^{-3}$	$8,100 \times 10^{-1}$	$5,027 \times 10^{-1}$	$1,393 \times 10^{-3}$
(3)Conc de cal(g/g )	$5,160 \times 10^{-3}$	$3,123 \times 10^{-3}$	1,652	$2,402 \times 10^{-1}$	$2,580 \times 10^{-3}$
Conc. de cal(g/g) (Q)	$-8,200 \times 10^{-4}$	$3,437 \times 10^{-3}$	$-2,390 \times 10^{-1}$	$8,329 \times 10^{-1}$	$-4,120 \times 10^{-4}$
1 e 2	$2,079 \times 10^{-3}$	$4,080 \times 10^{-3}$	$5,090 \times 10^{-1}$	$6,610 \times 10^{-1}$	$1,040 \times 10^{-3}$
1 e 3	$-1,361 \times 10^{-2}$	$4,080 \times 10^{-3}$	-3,336	$7,931 \times 10^{-2}$	$-6,806 \times 10^{-3}$
2 e 3	$1,680 \times 10^{-3}$	$4,080 \times 10^{-3}$	$4,140 \times 10^{-1}$	$7,190 \times 10^{-1}$	$8,450 \times 10^{-4}$

As significâncias dos efeitos também podem ser determinadas no gráfico normal apresentado na figura 4.4. Verifica-se que os efeitos que passam por uma reta próxima do valor “0” do eixo “x” são os efeitos não significativos tais como: a temperatura quadrática, a massa de cal linear e quadrática, e as interações de dois fatores “2 e 3” e “1 e 2”. Os efeitos que se encontram afastados do zero, são fatores que têm significância estatística, como foram os efeitos linear e quadrático do tempo, o efeito linear da temperatura e a interação “1 e 3”. A significância determinada por meio da análise dos gráficos normais depende do nível de confiança. Como a análise

por gráfico normal deu resultados similares à análise da tabela 4.4, que considerou nível de confiança de 90%, a escolha do nível de confiança é adequada.



**Figura 4.4:** Gráfico normal dos efeitos na produção de glicose

Comprovando o resultado da tabela dos efeitos com o gráfico normal se prossegue a reportar o modelo quadrático completo descrito na equação 4.1 com os valores dos coeficientes das variáveis (tabela 4.4).

$$\begin{aligned}
 \text{Glicose} \left( \frac{g}{g} \right) = & 0,1811 + 0,0148t - 0,0050t^2 + 0,0084T + 0,001393T^2 \\
 & + 0,002580m - 0,000412m^2 + 0,01040tT - 0,0068tm \\
 & + 0,000845Tm
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

<sup>1</sup> Equação 4.1 apresentada em variáveis codificadas;  $t$ =tempo,  $T$ =temperatura,  $m$ =concentração de cal

Para que o modelo anterior possa ser usado para fins preditivos é necessário que as duas condições do teste F sejam cumpridas:

O valor do teste  $F_{\text{regressão}}$  calculado deve ser maior do que o tabelado para verificar a significância da regressão, e para verificar a falta de ajuste o teste  $F_{\text{faj}}$  calculado pelo modelo deve apresentar um valor menor que o valor tabelado. Se essas duas condições forem satisfeitas, o modelo é considerado apropriado para fins preditivos. A seguir são apresentados os valores tabelados

dos testes F para a produção de glicose com seus respectivos graus de liberdade:

$F_{(tab.)_{9,7}} = 2,72$  no nível de 90% para a regressão (BARROS NETO *et al.*, 2003).

$F_{(tab.)_{5,2}} = 9,29$  no nível de 90% para a falta de ajuste (BARROS NETO *et al.*, 2003).

Assim, analisando a tabela 4.5, podemos perceber que o valor do teste  $F_{regressão}$  calculado para o modelo completo foi de 6,63, sendo maior que o valor tabelado ( $F_{9,7} = 2,72$ ). A segunda condição também foi satisfeita, já que o  $F_{faj}$  calculado apresentou um valor de 3,03, o qual foi menor que o valor tabelado ( $F_{(tab.)_{5,2}} = 9,29$ ). Com estes resultados a equação do modelo quadrático pode ser considerada significativa com 90% de confiança, podendo ser usada para fins preditivos.

**Tabela 4.5:** Análise de variância (ANOVA) – Glicose

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Fcal
Regressão (R)	$4,87 \times 10^{-03}$	9	$5,41 \times 10^{-04}$	*6,63
Resíduo (r)	$5,71 \times 10^{-04}$	7	$8,15 \times 10^{-05}$	
Falta de ajuste (faj)	$5,04 \times 10^{-04}$	5	$1,01 \times 10^{-04}$	**3,03
Erro puro (ep)	$6,66 \times 10^{-05}$	2	$3,33 \times 10^{-05}$	
Total (T)	$5,44 \times 10^{-03}$	16		
%Variação explicada ( $R^2$ )	89,5			
Máxima variação explicada	98,8			

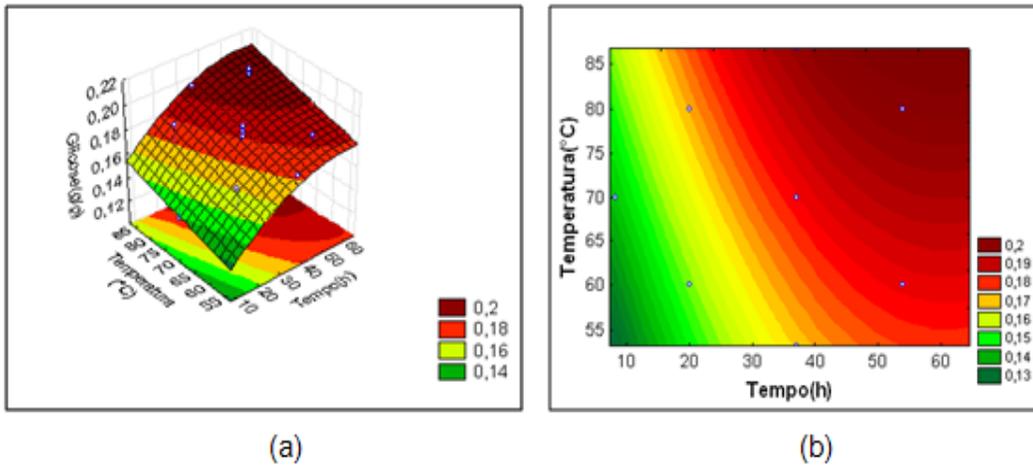
\* Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

\*\*Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

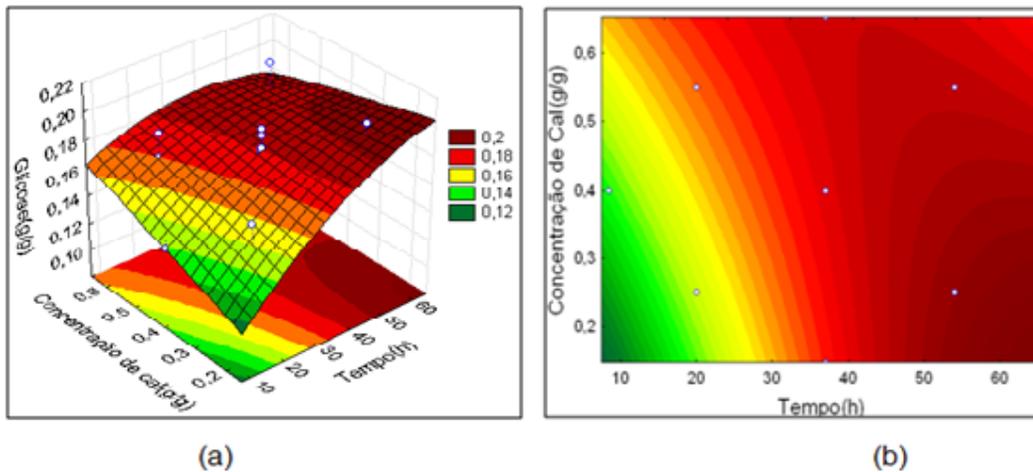
#### 4.3.1.1.1 Análise da superfície de resposta de glicose do 1º planejamento composto central

As superfícies de resposta traçadas com o modelo descrito pela equação 4.1 são apresentadas nas figuras 4.5 a 4.7. Da figura 4.5 nota-se que, mantendo a concentração de cal no ponto central, as variáveis do tempo e da temperatura atingem a maior liberação de glicose no nível +1,41 com uma

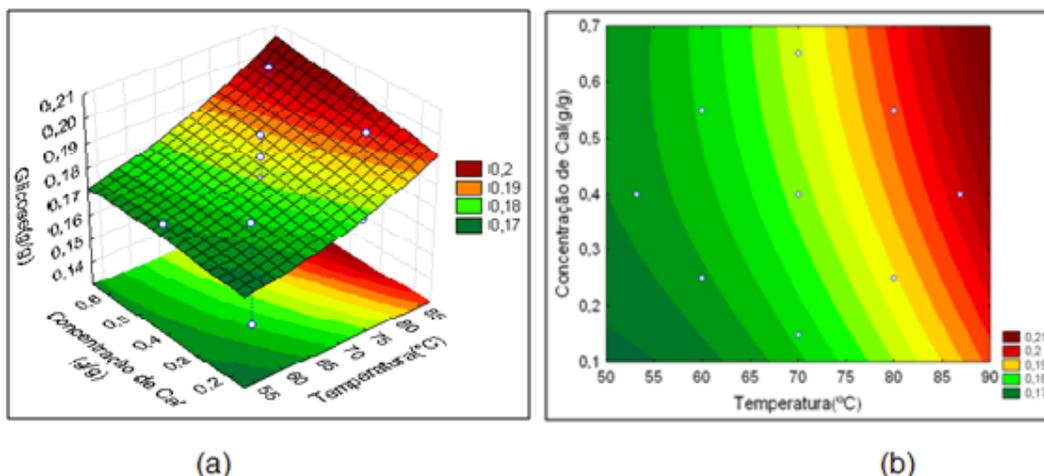
produção de glicose de 0,2 g/g biomassa bruta. Observando-se a curva de nível é aconselhável trabalhar nos maiores tempos e temperaturas para obter maior concentração de glicose.



**Figura 4.5:** Superfície de resposta (a) e Curva de nível (b) para a glicose em função do tempo e da temperatura, mantendo a concentração de cal no ponto central



**Figura 4.6:** Superfície de resposta(a) e Curva de nível (b) para a variável glicose em função do tempo e da concentração de cal, mantendo a temperatura no ponto central.



**Figura 4.7:** Superfície de resposta (a) e curva de nível (b) para a variável glicose em função da concentração de cal e da temperatura, mantendo o tempo no ponto central.

Quando a temperatura é mantida no ponto central (figura 4.6), a massa de cal parece não ter influência a 90% de confiança. Com aumentos de tempo de pré-tratamento a superfície apresenta um comportamento de um plano ascendente buscando atingir um máximo de produção de glicose. Este mesmo comportamento é notório quando o tempo é fixado no ponto central (figura 4.7), ou seja, pode-se concluir que mantendo a temperatura e o tempo nos maiores valores considerados no planejamento, a concentração de cal tem baixa influência na liberação de glicose após a hidrólise. Segundo CHANG (1998), o pré-tratamento com cal é um pré-tratamento lento que requer tempos longos e temperaturas moderadas para obter uma maior liberação de açúcares.

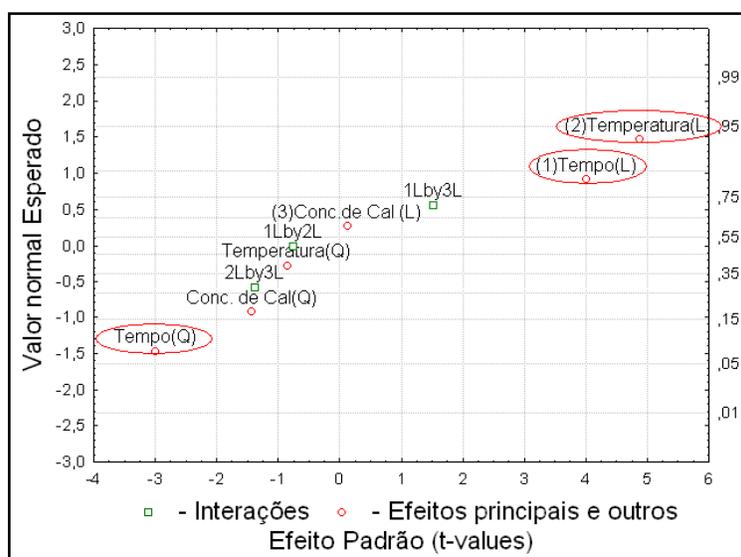
#### 4.3.1.2. Análise de produção de ART (g/g) do 1º planejamento composto central

Na tabela 4.6 é mostrada a análise dos efeitos principais e de interação na produção de ART, sendo a variável resposta, a concentração de ART produzida na hidrólise do bagaço pré-tratado. Os efeitos com valores de  $p \leq 0,1$  são significativos, estes foram: o efeito linear e quadrático do tempo e o efeito linear da temperatura.

**Tabela 4.6:** Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para a massa de ART(g/g) produzida.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coefficiente
Média	$3,702 \times 10^{-1}$	$1,688 \times 10^{-2}$	$2,192 \times 10^1$	$2,074 \times 10^{-3}$	$3,702 \times 10^{-1}$
(1)Tempo	$6,358 \times 10^{-2}$	$1,585 \times 10^{-2}$	4,010	$5,694 \times 10^{-2}$	$3,179 \times 10^{-2}$
Tempo(Q)	$-5,233 \times 10^{-2}$	$1,745 \times 10^{-2}$	-2,998	$9,558 \times 10^{-2}$	$-2,616 \times 10^{-2}$
(2)Tempe.	$7,712 \times 10^{-2}$	$1,585 \times 10^{-2}$	4,863	$3,978 \times 10^{-2}$	$3,856 \times 10^{-2}$
Tempe(Q)	$-1,495 \times 10^{-2}$	$1,745 \times 10^{-2}$	$-8,567 \times 10^{-1}$	$4,819 \times 10^{-1}$	$-7,470 \times 10^{-3}$
(3) Conc. de cal (g/g )	$1,960 \times 10^{-3}$	$1,585 \times 10^{-2}$	$1,239 \times 10^{-1}$	$9,127 \times 10^{-1}$	$9,820 \times 10^{-4}$
Conc.de cal (g/g) (Q)	$-2,509 \times 10^{-2}$	$1,745 \times 10^{-2}$	-1,437	$2,872 \times 10^{-1}$	$-1,254 \times 10^{-2}$
1 e 2	$-1,557 \times 10^{-2}$	$2,072 \times 10^{-2}$	$-7,519 \times 10^{-1}$	$5,306 \times 10^{-1}$	$-7,790 \times 10^{-3}$
1 e 3	$3,141 \times 10^{-2}$	$2,072 \times 10^{-2}$	1,516	$2,687 \times 10^{-1}$	$1,571 \times 10^{-2}$
2 e 3	$-2,876 \times 10^{-2}$	$2,072 \times 10^{-2}$	-1,388	$2,995 \times 10^{-1}$	$-1,438 \times 10^{-2}$

Constataram-se as respostas da tabela 4.6 com o gráfico normal apresentado na figura 4.8. Os efeitos não significativos são os que se encontram sobre a reta que passa pelo valor "0" do eixo "x". Os efeitos afastados da reta são efeitos significativos. A análise concorda com a tabela 4.6 dos efeitos, o qual quer dizer que a porcentagem de 90% utilizada é adequada para analisar o modelo.



**Figura 4.8:** Gráfico normal do primeiro planejamento composto central para a produção de ART(g/g)

Assim, a equação 4.2, reporta o modelo quadrático completo da produção de ART.

$$ART \left( \frac{g}{g} \right) = 0,37019 + 0,03179t - 0,02616t^2 + 0,038562T - 0,00747T^2 + 0,000982m - 0,01254m^2 - 0,01254Tt + 0,015709tm - 0,01438Tm \quad (4.2^2)$$

<sup>2</sup> Equação 4.2 apresentada em termos de variáveis codificadas

Sendo:  $t$ =tempo;  $T$ =temperatura,  $m$ = concentração de cal.

Para a validação do modelo é realizada a análise da tabela ANOVA (tabela 4.7) onde são calculados os valores F para falta de ajuste e de regressão. Os valores tabelados da distribuição F com seus respectivos graus de liberdade a 90% de confiança são:

$F(\text{tab.})_{9,7} = 2,72$  para a regressão (BARROS NETO *et al.*, 2003).

$F(\text{tab.})_{5,2} = 9,29$  para a falta de ajuste (BARROS NETO *et al.*, 2003).

Como foi dito anteriormente, para que o modelo possa ser usado para fins preditivos o teste F deve cumprir as condições:

$$F(\text{regressão calculado}) > F(\text{regressão tabelado})_{9,7} = 10,60 > 2,72$$

$$F(\text{Falta ajuste calculado}) < F(\text{Falta de ajuste tabelado})_{5,2} = 3,91 < 9,29$$

**Tabela 4.7:** Análise de variância (ANOVA) – ART (g/g)

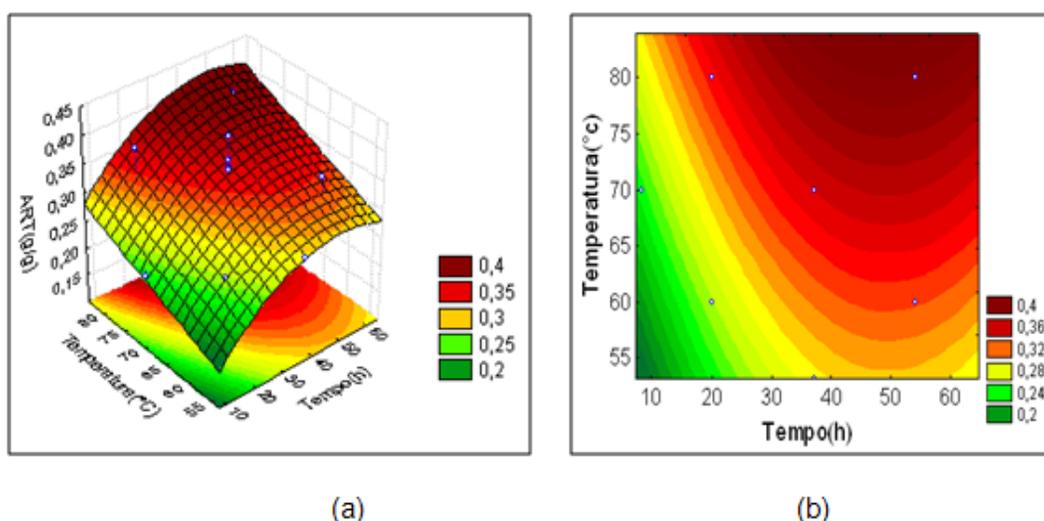
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Fcalculado
Regressão (R)	$4,63 \times 10^{-02}$	9	$5,14 \times 10^{-03}$	10,60*
Resíduo (r)	$3,39 \times 10^{-03}$	7	$4,85 \times 10^{-04}$	
Falta de ajuste (faj)	$1,68 \times 10^{-03}$	5	$3,35 \times 10^{-04}$	3,91**
Erro puro (ep)	$1,72 \times 10^{-03}$	2	$8,59 \times 10^{-04}$	
Total (T)	$4,97 \times 10^{-02}$	16		
% Variação explicada( $R^2$ )	93,20			
Máxima % variação explicada	96,50			

\*Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

\*\*Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Assim, as duas condições foram satisfeitas para o teste F, de forma que se considera o modelo estatisticamente significativo a 90% de confiança, podendo este ser usado para fins preditivos na faixa estudada.

Foram traçadas as superfícies de resposta e as curvas de nível na figura 4.9 para se observar o comportamento da produção de ART com respeito as variáveis independentes. Em ela observa-se que a maior produção de ART encontra-se nas maiores temperaturas do planejamento e em valores de tempo de pré-tratamento de 40 a 60 h, atingindo uma produção de 0,4 g de ART/g biomassa seca. Como o efeito linear e o quadrático da concentração de cal, e nenhuma das interações envolvendo a massa de cal não foram estatisticamente significativas, esta variável foi retirada da análise, concluindo-se que a liberação de ART após da hidrólise é independente da concentração de cal na faixa estudada.



**Figura 4.9:** Superfície de resposta (a) e, curva de nível (b) para a resposta de ART em função do tempo e da temperatura, mantendo a concentração de cal no ponto central.

#### 4.3.2. 2º Planejamento Composto central do Pré-tratamento com cal

Como os valores de tempo, temperatura e concentração de cal que levaram à máxima produção de glicose no planejamento anterior estavam na extremidade da faixa estudada, novos ensaios de pré-tratamento foram realizados, visando alcançar o ponto ótimo de produção de glicose. Para este fim se continuou usando a metodologia de superfícies de resposta, e foram aumentadas as faixas de tempo e temperatura como foi indicado pela análise estatística realizada anteriormente (item 4.3.1.1.1). A massa de cal no 1º planejamento não mostrou significância, porém, o efeito de interação entre ela e o tempo foi significativo, motivo pelo qual se resolveu não tirar do planejamento

esta variável e trabalhar no mesmo intervalo anteriormente estudado. As novas faixas de estudo se encontram reportadas na tabela 4.8.

**Tabela 4.8:** Faixa das variáveis estudadas na otimização.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
<b>Tempo de contato (h)</b>	53,1	65	82,5	100	111,9
<b>Temperatura (°C)</b>	83,3	86	90	94	96,7
<b>Concentração de Cal (g/g)</b>	0,15	0,25	0,4	0,55	0,65

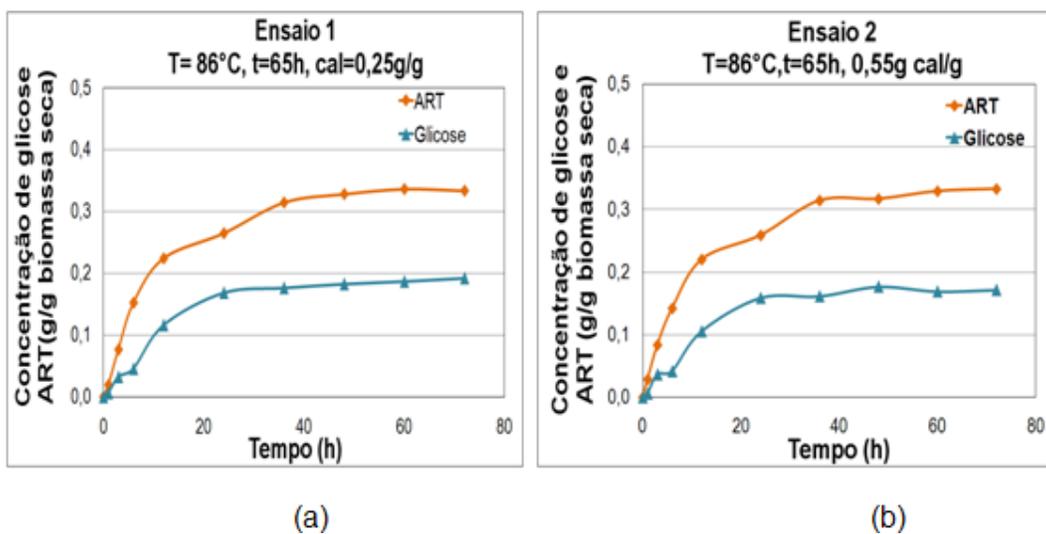
Na tabela 4.9 é apresentado a matriz do 2<sup>o</sup> planejamento composto central com suas respectivas respostas (glicose e ART). A maior produção de glicose foi obtida nos ensaios 15 (pontos centrais) com uma produção de 0,23 g de glicose/g biomassa bruta correspondente a uma concentração de 0,36 g ART/g biomassa bruta. Os ensaios realizados nas condições menores de tempo e temperatura mostraram menor produção de açúcares.

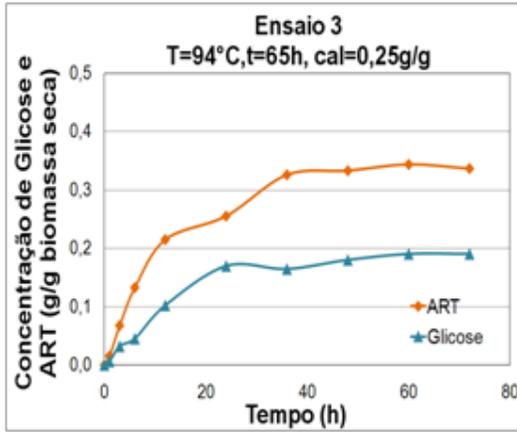
**Tabela 4.9:** Matriz de 2<sup>o</sup> planejamento composto central com três pontos centrais com suas respostas.

Ensaio	Tempo (h)	Temperatura (°C)	Concentração de cal (g/g)	Glicose (g/g)	ART (g/g)
1	65	86	0,25	0,192	0,336
2	65	86	0,55	0,177	0,333
3	65	94	0,25	0,190	0,344
4	65	94	0,55	0,175	0,349
5	100	86	0,25	0,203	0,379
6	100	86	0,55	0,207	0,367
7	100	94	0,25	0,209	<b>0,385</b>
8	100	94	0,55	0,192	0,348
9	53,07	90	0,4	0,191	0,326
10	111,93	90	0,4	0,202	0,354
11	82,5	83,27	0,4	0,199	0,381
12	82,5	96,73	0,4	0,199	0,337
13	82,5	90	0,15	0,178	0,360
14	82,5	90	0,65	0,200	0,350
15.1	82,5	90	0,4	0,239	0,366
15.2	82,5	90	0,4	0,230	0,367
15.3	82,5	90	0,4	0,228	0,365

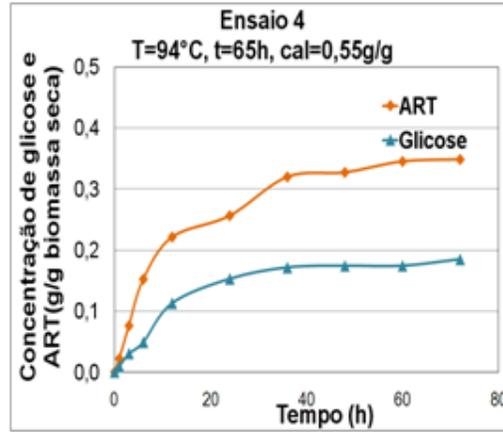
A tabela 4.9 também permite concluir que nos ensaios do ponto central a produção de glicose aumentou em pequena proporção comparada com o ponto ótimo do primeiro planejamento. Este aumento na liberação de glicose ocorreu, entre outros fatores, devido à maior remoção de hemicelulose ocorrida com o aumento do tempo e da temperatura na etapa do pré-tratamento. Este resultado pode ser corroborado observando o perfil de hidrólise apresentado na figura 4.10(o), onde se mostram uma menor concentração de ART produzida na hidrólise enzimática comparada com o ensaio 8 da análise anterior (Figura 4.3h).

Na figura 4.10 pode-se observar em todos os perfis de glicose nas primeiras horas de hidrólise apresentam uma pequena inibição, que provavelmente é causada pela liberação de celobiose que não é rapidamente convertida a glicose. Aproximadamente após 36 h de hidrólise é obtida a maior produção de açúcares, que se mantém constante até as 60 h de hidrólise. Os pontos centrais 15.1, 15.2 e 15.3 apresentam boa reprodutibilidade, como se pode observar nos perfis deles mostrados na figura 4.10.(o).

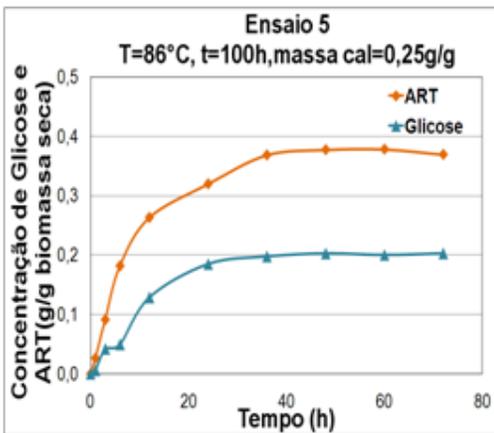




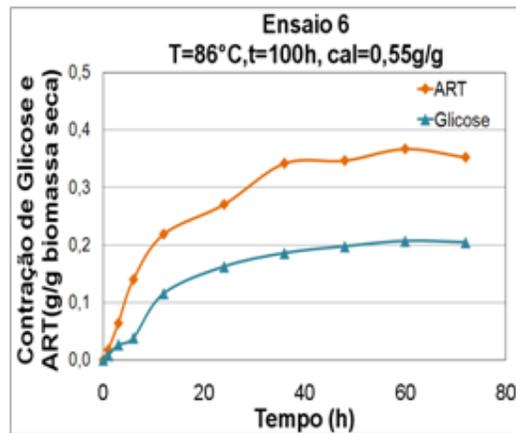
(c)



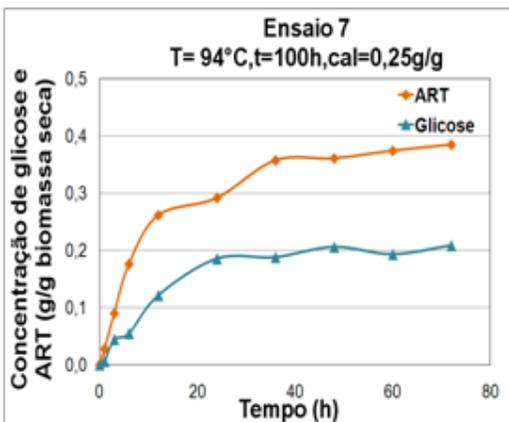
(d)



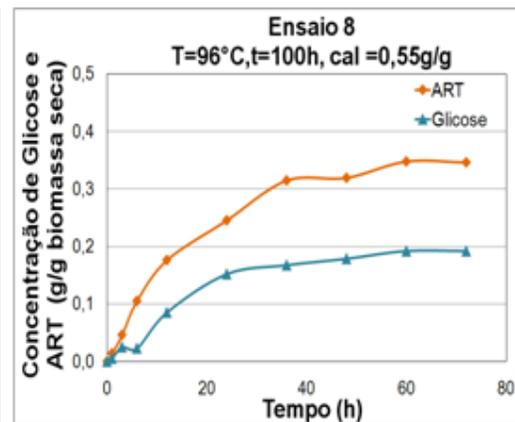
(e)



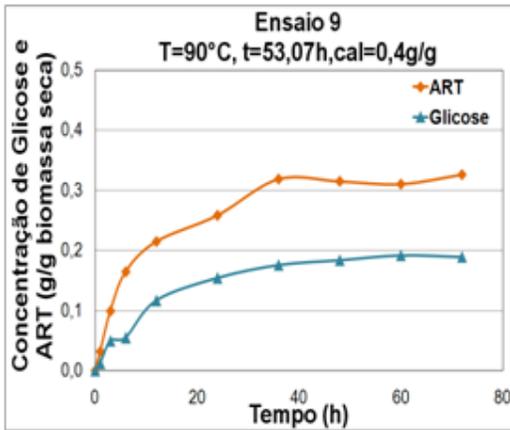
(f)



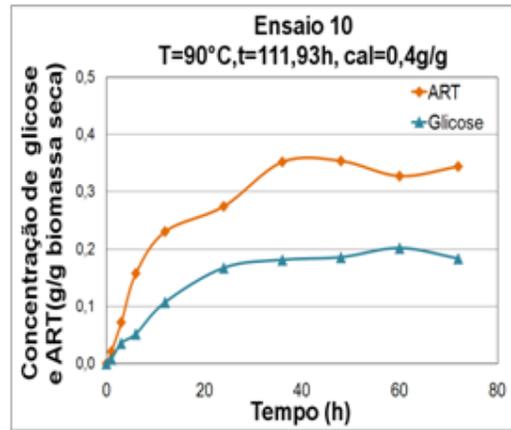
(g)



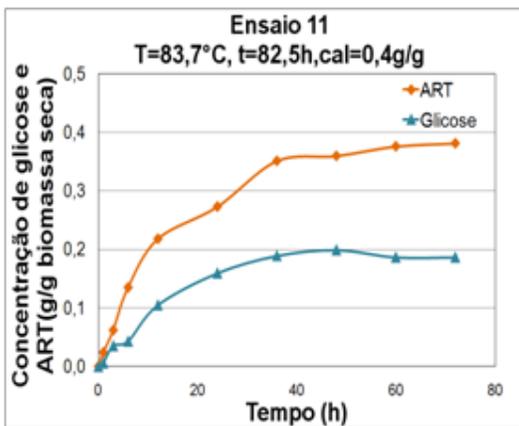
(h)



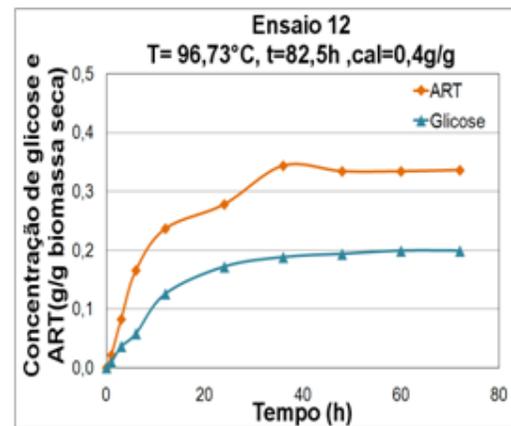
(i)



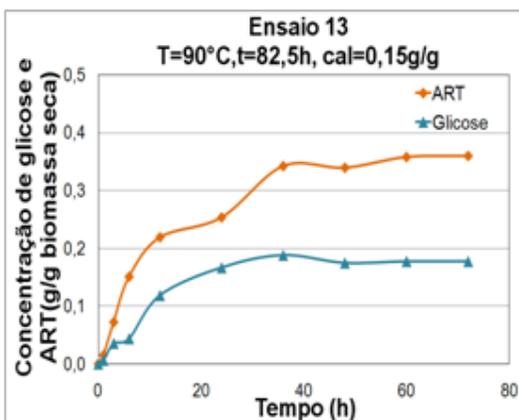
(j)



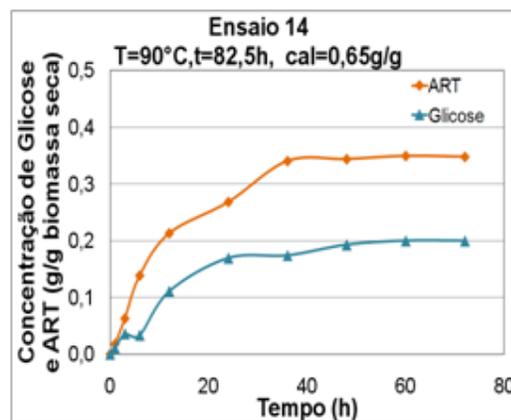
(k)



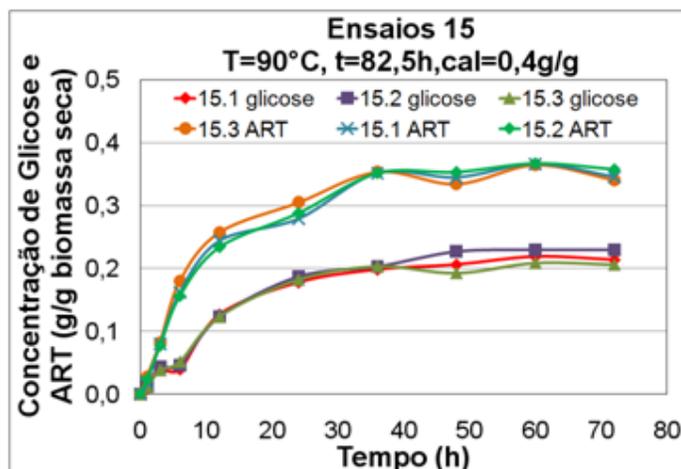
(l)



(m)



(n)



(o)

**Figura 4.10:** Perfis de hidrólise dos ensaios da otimização do planejamento composto central de concentrações de glicose e ART.

#### 4.3.2.1 Análise de produção de Glicose (g/g) do 2º planejamento composto central

Na análise estatística apresentado na tabela 4.10 e com o gráfico normal apresentado na figura 4.11, observa-se que o efeito linear e quadrático do tempo, o efeito quadrático da temperatura e o efeito quadrático da concentração de cal foram estatisticamente significativos a 90% de confiança, já que apresentaram um valor de  $p < 0,1$ , sendo o maior efeito o quadrático da concentração de cal. Os efeitos de interação, e os efeitos lineares da concentração de cal e da temperatura não apresentaram significância na faixa estudada.

A equação 4.3 mostra o modelo completo que foi obtido com os valores dos coeficientes tomados da tabela 4.10. Para validar este modelo foi necessário realizar o teste F. Para que o modelo possa ser usado para fins preditivos é necessário passar pelas duas condições; uma esta relacionada com a regressão e a outra com a falta de ajuste.

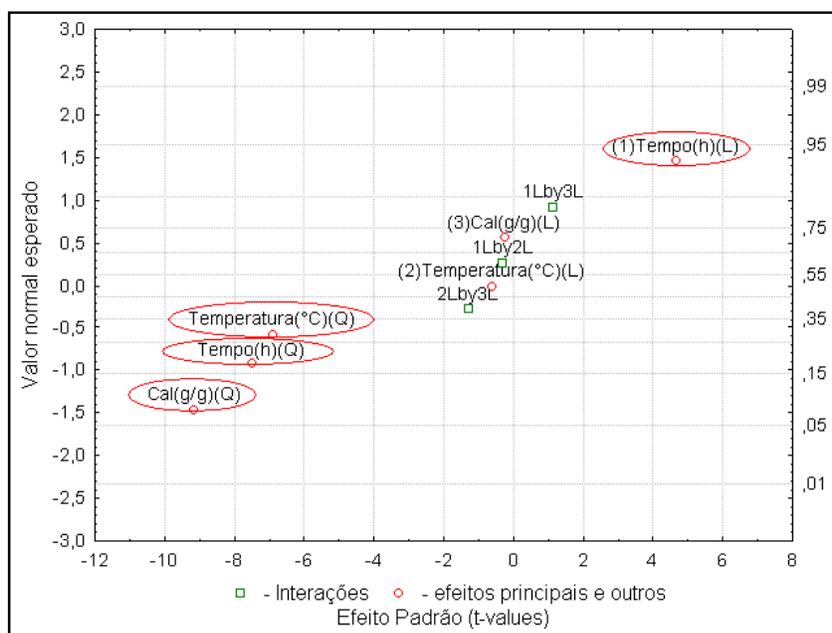
$$\begin{aligned} \text{Glicose}(g/g) = & 0,2321 + 0,00704t - 0,01252t^2 - 0,00095T - 0,01153T^2 - \\ & 0,00038m - 0,01524m^2 - 0,00063Tt + 0,00224tm - 0,00257Tm \end{aligned} \quad (4.3)^3$$

<sup>3</sup>Equação 4.3 apresentada em termos de variáveis codificadas

Sendo:  $t$ =tempo,  $T$ =temperatura,  $m$ =concentração de cal

**Tabela 4.10:** Análise dos efeitos principais e de interações do 2º planejamento composto central, utilizando o erro puro para a massa de glicose (g/g) produzida.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coefficiente
Média	$2,322 \times 10^{-1}$	$3,220 \times 10^{-3}$	$7,199 \times 10^1$	$1,900 \times 10^{-4}$	$2,322 \times 10^{-1}$
(1)Tempo	$1,408 \times 10^{-1}$	$3,030 \times 10^{-3}$	4,648	$4,330 \times 10^{-2}$	$7,040 \times 10^{-3}$
Tempo(Q)	$-2,504 \times 10^{-1}$	$3,330 \times 10^{-3}$	-7,511	$1,727 \times 10^{-2}$	$-1,252 \times 10^{-2}$
(2)Tempe.	$-1,900 \times 10^{-3}$	$3,030 \times 10^{-3}$	$-6,268 \times 10^{-3}$	$5,948 \times 10^{-1}$	$-9,500 \times 10^{-4}$
Tempe(Q)	$-2,305 \times 10^{-2}$	$3,330 \times 10^{-3}$	-6,915	$2,028 \times 10^{-2}$	$-1,153 \times 10^{-2}$
(3)Conc. de cal(g/g )	$-7,700 \times 10^{-4}$	$3,030 \times 10^{-3}$	$-2,542 \times 10^{-1}$	$8,231 \times 10^{-1}$	$-3,800 \times 10^{-4}$
Conc. Cal (g/g ) (Q)	$-3,053 \times 10^{-2}$	$3,330 \times 10^{-3}$	-9,157	$1,172 \times 10^{-2}$	$-1,526 \times 10^{-2}$
1 e 2	$-1,260 \times 10^{-3}$	$3,960 \times 10^{-3}$	$-3,184 \times 10^{-1}$	$7,803 \times 10^{-1}$	$-6,300 \times 10^{-4}$
1 e 3	$4,480 \times 10^{-3}$	$3,960 \times 10^{-3}$	1,132	$3,750 \times 10^{-1}$	$2,240 \times 10^{-3}$
2 e 3	$-5,150 \times 10^{-3}$	$3,960 \times 10^{-3}$	-1,301	$3,231 \times 10^{-1}$	$-2,570 \times 10^{-3}$



**Figura 4.11:** Gráfico normal para a produção de glicose (g/g)

A equação 4.3 mostra o modelo completo que foi obtido com os valores dos coeficientes tomados da tabela 4.10. Para validar este modelo foi necessário realizar o teste F. Para que o modelo possa ser usado para fins preditivos é necessário passar pelas duas condições; uma esta relacionada com a regressão e a outra com a falta de ajuste.

$$\text{Glicose}(g/g) = 0,2321 + 0,00704t - 0,01252t^2 - 0,00095T - 0,01153T^2 - 0,00038m - 0,01524m^2 - 0,00063Tt + 0,00224tm - 0,00257Tm \quad (4.3)^3$$

<sup>3</sup>Equação 4.3 apresentada em termos de variáveis codificadas

Sendo:  $t$ =tempo,  $T$ =temperatura,  $m$ =concentração de cal

Na tabela 4.11 são exibidos os valores calculados do teste F, e os valores da distribuição F tabelados a 90% de confiança são:

$F(\text{tab.})_{9,7} = 2,72$  para a regressão (BARROS NETO *et al.* 2003).

$F(\text{tab.})_{5,2} = 9,29$  para a falta de ajuste (BARROS NETO *et al.* 2003).

Como anteriormente dito o teste F deve cumprir com as duas condições de regressão e de falta de ajuste sendo:

$$F(\text{regressão calculado}) > F(\text{regressão teórico})_{9,7} = 4,72 > 2,72$$

$$F(\text{Falta ajuste calculado}) < F(\text{Falta de ajuste teórico})_{5,2} = 4,40 < 9,29$$

Assim, as duas condições foram satisfeitas para o teste F, de forma que o modelo é estatisticamente significativo a 90% de confiança e pode ser usado para fins preditivos.

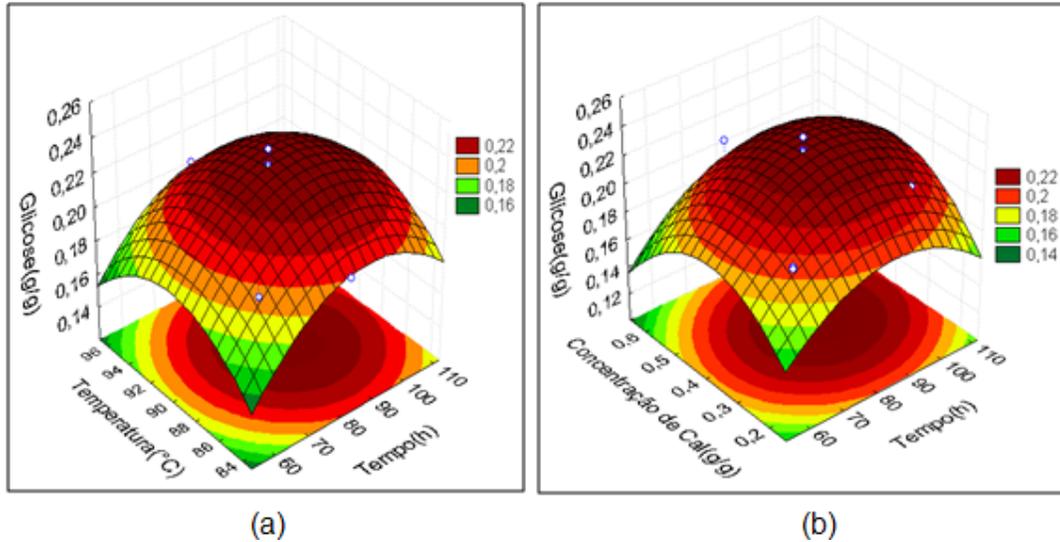
**Tabela 4.11:** Análise de variância (ANOVA) para o 2º planejamento composto central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	F calculado
Regressão (R)	$4,56 \times 10^{-03}$	9	$5,06 \times 10^{-04}$	4,72*
Resíduo (r)	$7,51 \times 10^{-04}$	7	$1,07 \times 10^{-04}$	
Falta de ajuste (faj)	$6,89 \times 10^{-04}$	5	$1,38 \times 10^{-04}$	4,40**
Erro puro (ep)	$6,26 \times 10^{-05}$	2	$3,13 \times 10^{-05}$	
Total (T)	$5,31 \times 10^{-03}$	16		
% Variação explicada ( $R^2$ )	85,84			
Máxima variação explicada (%)	98,81			

\* Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

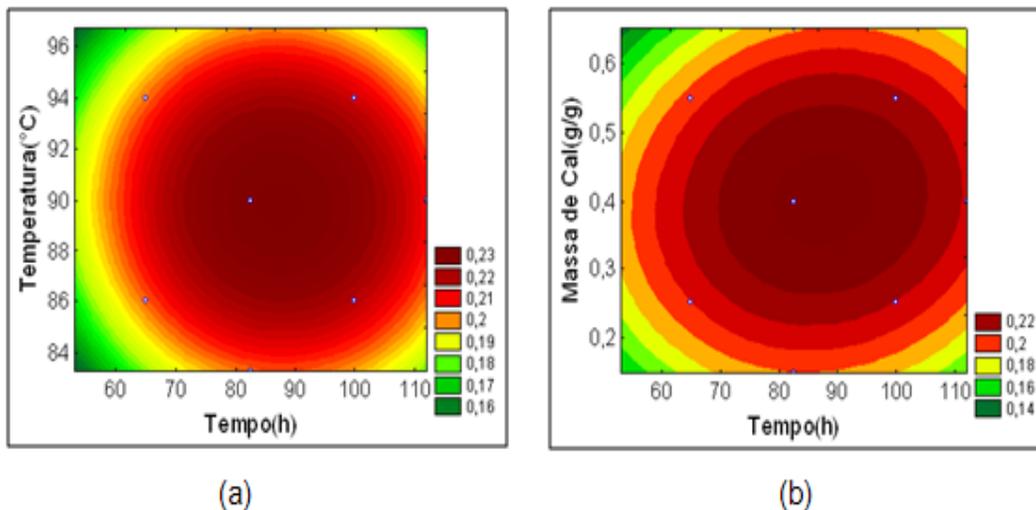
\*\*Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Com o objetivo de encontrar a região ótima foram traçadas as superfícies de resposta apresentadas na figura 4.12, onde é encontrada uma máxima produção de glicose de aproximadamente 0,22 g/g biomassa seca.



**Figura 4.12:** Superfícies de resposta da produção de glicose, (a) concentração de cal no ponto central, (b) temperatura no ponto central

As curvas de níveis apresentadas na figura 4.13 podem ser usadas para definir melhor a região da produção máxima de glicose. Fica claro que as condições ótimas se encontram em torno do ponto central, havendo uma faixa ampla de temperatura, tempo e concentração de cal onde há rendimentos altos.



**Figura 4.13:** Curvas de nível para a variável glicose (a), concentração de cal no ponto central, (b) temperatura no ponto central.

Para quantificar os valores das condições ótimas o modelo apresentado na equação 4.3 é derivado parcialmente em relação a cada um

dos fatores e as equações são igualadas à zero. As derivadas com respeito a cada variável são:

$$\frac{\partial M_{\text{glicose}(g/g)}}{\partial t} = 0,007039 - 0,02504t - 0,000630T + 0,002241m = 0 \quad (4.4)$$

$$\frac{\partial M_{\text{glicose}(g/g)}}{\partial T} = -0,000949 - 0,023052T - 0,000630t - 0,002574m = 0 \quad (4.5)$$

$$\frac{\partial M_{\text{glicose}(g/g)}}{\partial m} = -0,000385 - 0,030528m - 0,002241t - 0,002574T = 0 \quad (4.6)$$

Resolvendo o sistema de equações lineares temos os valores ótimos das variáveis em termos codificados:

$$t = 0,2834$$

$$T = -5,03045 \times 10^{-2}$$

$$m = 1,2440 \times 10^{-2}$$

Decodificação das variáveis:

$$\frac{1 - t}{-1 - 0} = \frac{100 \text{ h} - \text{Tempo}}{65 \text{ h} - 82,5 \text{ h}}$$

$$\text{Tempo} = 87,45 \text{ h}$$

$$\frac{1 - T}{-1 - 0} = \frac{94 \text{ °C} - \text{Temperatura}}{86 \text{ °C} - 90 \text{ °C}}$$

$$\text{Temperatura} = 89,79 \text{ °C}$$

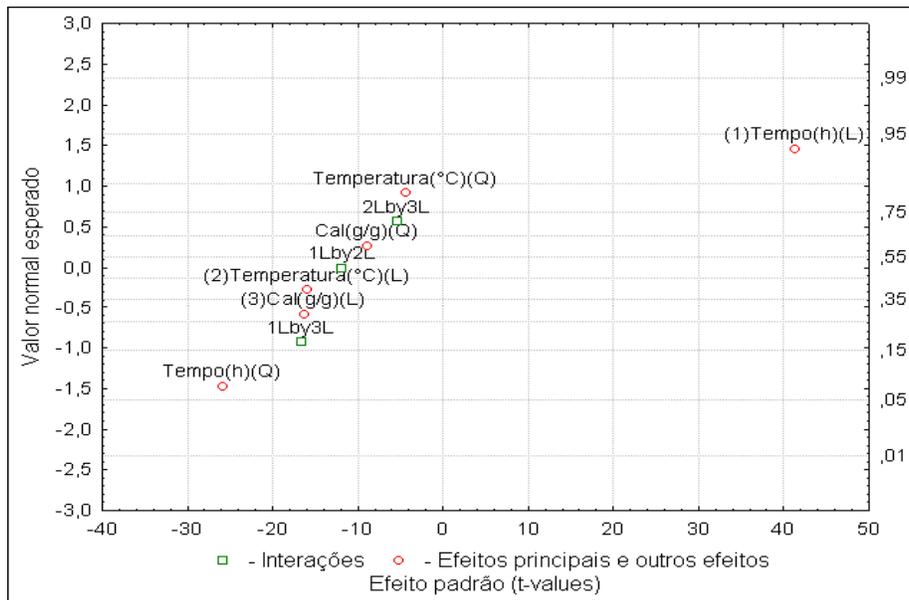
$$\frac{1 - m}{-1 - 0} = \frac{0,55 - \text{concentração de cal}}{0,25 - 0,4}$$

$$\text{Concentração de cal} = 0,4018 \text{ g/g biomassa bruta.}$$

Logo, com os resultados anteriores o modelo prediz que o ótimo global para a produção de glicose encontra-se nas condições de pré-tratamento devem realizar-se á uma temperatura de 89,79 °C durante 87,45 h com uma concentração de cal de 0,4 g/g. Com o objetivo de trabalhar com valores inteiros, o ótimo foi aproximado a condições de 90 °C, 90 h, e 0,4 g de cal/g biomassa bruta.

**4.3.2.2. Análise estatística da produção de ART(g/g) do 2º planejamento**

Para a produção de ART são analisados a tabela 4.12 e o gráfico normal apresentado na figura 4.14, concluindo-se que todos os efeitos principais e de interação apresentaram  $p < 0,1$ , sendo estatisticamente significativos a 90% de confiança. O maior efeito é o do tempo de pré-tratamento (linear e quadrático), seguido do efeito de interação tempo/concentração de cal. Entre os três fatores, o que apresenta menor efeito na produção de ART é a temperatura.



**Figura 4.14:** Gráfico Pareto para a produção de ART(g/g) no segundo planejamento composto central.

Na tabela 4.12 são apresentados os coeficientes do modelo completo obtido para representar a produção de ART(g/g) na região de estudo, representada na equação 4.7.

$$ART(g/g) = 0,36773 + 0,012004t - 0,008290t^2 - 0,004667T - 0,00141T^2 - 0,00474m - 0,00286m^2 - 0,00452tT - 0,00634tm - 0,0206Tm \quad 4.7^4$$

<sup>4</sup>Equação 4.7 apresentada em termos de variáveis codificadas

Sendo:  $t$ =tempo,  $T$ =temperatura,  $m$  = concentração de cal

**Tabela 4.12:** Análise dos efeitos principais e de interações do 2º planejamento composto central, utilizando o erro puro para ART(g/g) produzida.

	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coefi.
<b>Fator</b>					
Média	<b>3,658x10<sup>-01</sup></b>	6,190 x10 <sup>-04</sup>	5,906x10 <sup>2</sup>	3,000 x10 <sup>-06</sup>	3,658 x10 <sup>-1</sup>
(1)Tempo	<b>2,400 x10<sup>-02</sup></b>	5,820 x10 <sup>-04</sup>	4,127 x10 <sup>1</sup>	5,870 x10 <sup>-04</sup>	1,200 x10 <sup>-2</sup>
Tempo(Q)	<b>-1,658 x10<sup>-02</sup></b>	6,400 x10 <sup>-04</sup>	-2,590 x10 <sup>1</sup>	1,488 x10 <sup>-03</sup>	-8,290 x10 <sup>-3</sup>
(2)Tempe.	<b>-9,330 x10<sup>-03</sup></b>	5,820 x10 <sup>-04</sup>	-1,605 x10 <sup>1</sup>	3,862 x10 <sup>-03</sup>	-4,660 x10 <sup>-3</sup>
Tempe(Q)	<b>-2,830 x10<sup>-03</sup></b>	6,400 x10 <sup>-04</sup>	-4,420	4,756 x10 <sup>-02</sup>	-1,410 x10 <sup>-3</sup>
(3)Conc. de cal(g/g )	<b>-9,490 x10<sup>-03</sup></b>	5,820 x10 <sup>-04</sup>	-1,632 x10 <sup>1</sup>	3,731 x10 <sup>-03</sup>	-4,740 x10 <sup>-3</sup>
Conc. de cal(g/g) (Q)	<b>-5,720 x10<sup>-03</sup></b>	6,400 x10 <sup>-04</sup>	-8,938	1,229 x10 <sup>-02</sup>	-2,860 x10 <sup>-3</sup>
1 e 2	<b>-9,050 x10<sup>-03</sup></b>	7,600 x10 <sup>-04</sup>	-1,191 x10 <sup>1</sup>	6,974 x10 <sup>-03</sup>	-4,520 x10 <sup>-3</sup>
1 e 3	<b>-1,268 x10<sup>-02</sup></b>	7,600 x10 <sup>-04</sup>	-1,668 x10 <sup>1</sup>	3,573 x10 <sup>-03</sup>	-6,340 x10 <sup>-3</sup>
2 e 3	<b>-4,130 x10<sup>-03</sup></b>	7,600 x10 <sup>-04</sup>	-5,446	3,210 x10 <sup>-02</sup>	-2,060 x10 <sup>-3</sup>

A tabela 4.13 mostra a ANOVA, usada para a validação do modelo descrito na equação 4.7. A referida tabela apresenta um coeficiente de determinação de 77%, indicando que o modelo explica esta porcentagem em torno da média em termos de produção de ART, sendo os 23% restantes devidos aos resíduos.

A seguir são apresentadas as duas condições que o teste F deve satisfazer para a validação do modelo.

$$F_{(\text{regressão calculado})} > F_{(\text{regressão teórico})_{9,7}} = 2,74 > 2,72$$

$$F_{(\text{Falta ajuste calculado})} < F_{(\text{Falta de ajuste teórico})_{5,2}} = 190,46 < 9,29$$

**Tabela 4.13:** Análise de variância (ANOVA) para ART, 2º planejamento composto central

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Teste F
Regressão (R)	3,89x10 <sup>-03</sup>	9	4,32x10 <sup>-04</sup>	2,74
Resíduo (r)	1,10x10 <sup>-03</sup>	7	1,57x10 <sup>-04</sup>	
Falta de ajuste (faj)	1,10x10 <sup>-03</sup>	5	2,20x10 <sup>-04</sup>	190,46
Erro puro (ep)	2,24x10 <sup>-06</sup>	2	1,12x10 <sup>-06</sup>	
Total (T)	4,99x10 <sup>-03</sup>	16		
% Variação explicada (R <sup>2</sup> )	77,90			
Máxima variação explicada	99,95			

\* Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

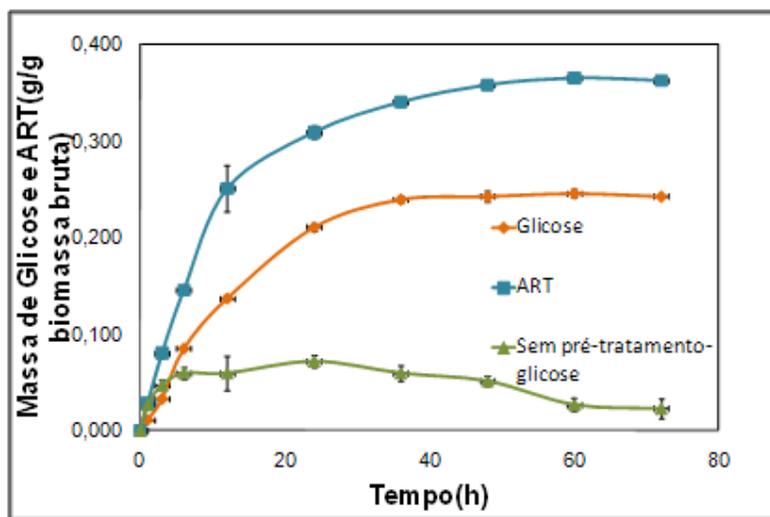
\*\*Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Ao analisarmos os resultados do teste F obtidos podemos perceber que o valor da primeira condição de regressão é satisfeita, embora bem no limite, mas o modelo estudado apresenta evidência de falta de ajuste, pois não satisfaz a segunda condição. Assim, o modelo que descreve a concentração de ART liberada durante a hidrólise do bagaço não é estatisticamente significativo a 90% e não deve ser usado para fins preditivos.

Como o objetivo principal deste trabalho era encontrar as condições ótimas do pré-tratamento com cal para a liberação de glicose, e elas já foram encontradas no item 4.3.2.1, não é necessário fazer estudos adicionais para a maximização da produção de ART.

#### 4.3.3. Análise e caracterização Química do bagaço pré-tratado nas condições otimizadas

Com o fim de validar o valor ótimo encontrado pelo modelo estatístico foi realizado um ensaio em triplicata nas condições ótimas de pré-tratamento de 0,4 g de cal/g biomassa bruta a uma temperatura de 90 °C durante um tempo de 90 h. Após esta etapa efetuou-se a hidrólise enzimática realizada nas mesmas condições do item 3.8 descrito anteriormente.



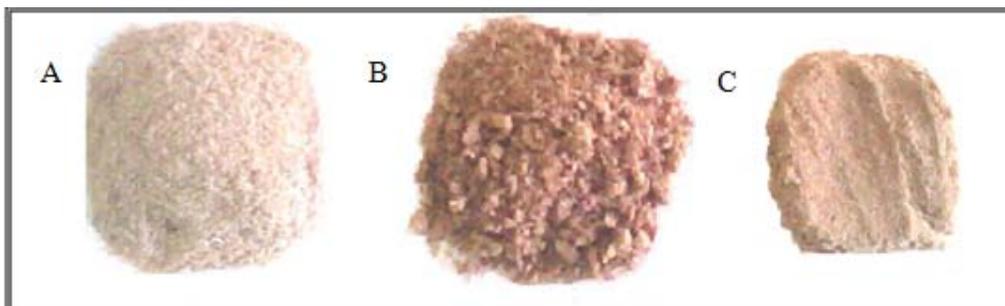
**Figura 4.15:** Perfil de Hidrólise de glicose das condições ótimas do pré-tratamento

A figura 4.15 apresenta os perfis de hidrólise enzimática, observando-

se uma liberação máxima de 0,246 g de glicose/g de biomassa bruta e 0,356 g de ART/g biomassa bruta. Com bagaço sem pré-tratamento obteve-se um rendimento de glicose de 14,30%, e o rendimento foi de 59,64% quando o bagaço foi pré-tratado nas condições ótimas. O rendimento foi calculado com a equação 4.8.

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{g \text{ glicose hidrolisada} * \text{fator}}{g \text{ glucana na biomassa não tratada}} =$$

$$\text{Rendimento}(\%) = \frac{g \text{ glicose}}{g \text{ glucana}} \times \frac{162,2}{180,2} \times 100\% \quad 4.8$$



**Figura 4.16:** Aspecto do bagaço de cana (A) antes e (B) após o pré-tratamento. (C) Após a etapa de hidrólise enzimática.

Na figura 4.16 observa-se o bagaço sem e com pré-tratamento, assim como o bagaço hidrolisado. Na etapa de pré-tratamento, aproximadamente 50% da biomassa foram solubilizadas nas condições ótimas e 70% da biomassa foi hidrolisada na etapa de hidrólise.

**Tabela 4.14:** Caracterização química do bagaço antes e após do pré-tratamento

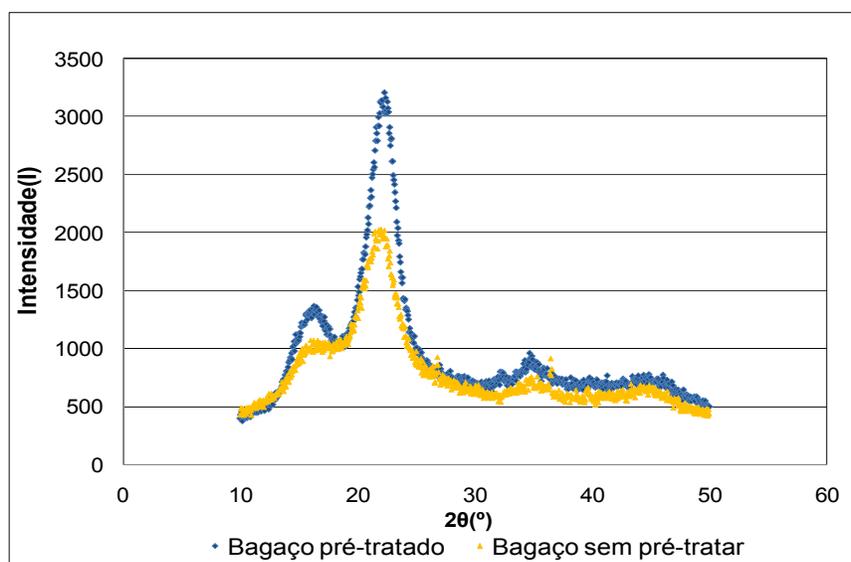
Compostos	Antes do pré-tratamento 100 g	Após o pré-tratamento 58,73 g
Cinzas	1,79 g ± 0,48 g	-
Celulose	37,35 g ± 0,51 g	35,50 g ± 0,52 g
Hemicelulose	23,66 g ± 0,88 g	12,53 g ± 0,34 g
Lignina	25,10 g ± 0,48 g	9,16 g ± 0,14 g
Extrativos	3,25 g ± 0,20 g	-
Outros	9,11 g ± 0,00 g	1,54 g ± 0,00 g

A tabela 4.14 apresenta o balanço de massa para as composições do bagaço antes e após o pré-tratamento. A caracterização do material foi realizada com a metodologia descrita no item 3.3. Os teores de extrativos e

cinzas não foram observados para o material pré-tratado com cal, pois estes dois componentes são degradados durante a etapa de pré-tratamento.

Observa-se na referida tabela que o pré-tratamento com cal aproximadamente um 5% de celulose, 27% de hemicelulose e um 39% de lignina foram solubilizados. A literatura caracteriza o pré-tratamento com cal como um pré-tratamento capaz de modificar a estrutura da lignina e da hemicelulose para facilitar o ataque enzimático. Cabe-se ressaltar que com o planejamento composto central foi possível trabalhar com menor tempo de pré-tratamento do que os encontrados na literatura (tempos maiores a uma semana) (PLAYNE, 1984; KIM, 2005; COTLEAR, 2004).

O índice de cristalinidade foi medido para o bagaço antes e após a etapa de pré-tratamento, como é mostrado na figura 4.17. O índice de cristalinidade para o bagaço pré-tratado foi de 64,23%, enquanto para o bagaço bruto foi de 46,37%, ou seja, houve um aumento no índice de cristalinidade após o pré-tratamento. De acordo com Kim (2004), o índice de cristalinidade é uma medida da quantidade relativa de celulose cristalina no sólido. Como o pré-tratamento com cal remove lignina e hemicelulose, amorfas, há um aumento no índice de cristalinidade. O aumento no índice de cristalinidade após pré-tratamento foi reportado em vários outros trabalhos (Chang e Holtzapple, 2000; Tanahashi *et al.*, 1983; Kim 2004)



**Figura 4.17** : Difração de raios X para o bagaço de cana pré-tratado e sem pré-tratamento

#### 4.4. Aumento de carga de sólidos no pré-tratamento

Foram realizados testes para aumentar a carga de sólidos no pré-tratamento. Esta análise foi realizada nas condições ótimas encontradas no pré-tratamento (90 °C por um período de 90 h com 0,4 g de cal/g de bagaço) com variação de sólidos de 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10% (p/v). A hidrólise enzimática foi realizada com as condições descritas anteriormente no item 3.8.

Na realização dos experimentos, observou-se que com o aumento da carga de sólidos, tornava-se mais difícil obter a homogeneização de todo o material, pois a maioria deste não permanecia no meio reacional, ficando aderido nas paredes no transcorrer do tempo e, conseqüentemente, queimando. Além disso, o líquido reacional foi insuficiente, o que não possibilitava o contato efetivo da cal com a biomassa. Estes foram uns dos motivos do porque com um aumento de sólidos para 10% mostrou-se uma menor liberação de carboidratos comparada com o pré-tratamento com 4% de sólidos (figura 4.18).

Ao analisar a figura 4.18 observa-se que o perfil de hidrólise do bagaço que não foi submetido à etapa do pré-tratamento atingiu uma pequena produção de 0,052 g de glicose/g biomassa seca. Comparando este resultado com o bagaço pré-tratado com 4% de sólidos, a produção dele supera mais de três vezes que o produzido sem pré-tratamento.

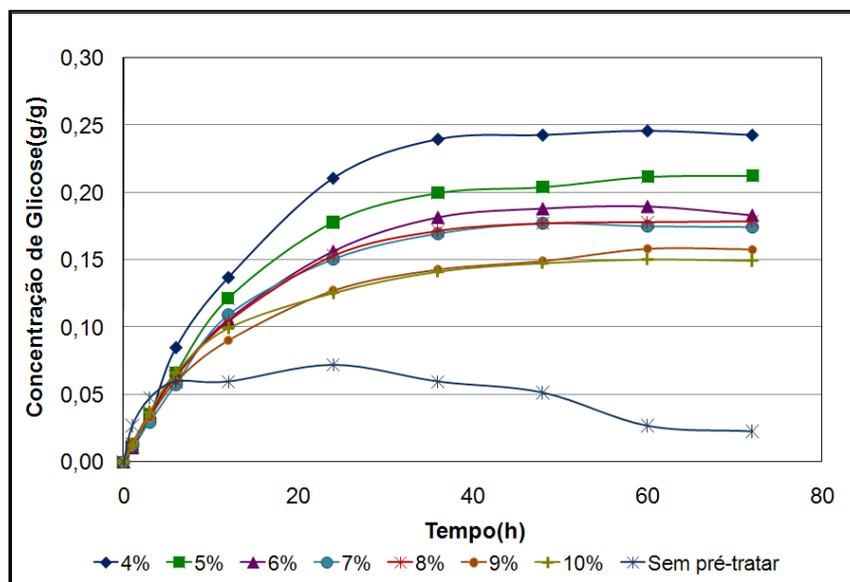


Figura 4.18: Influência de carga de sólidos no pré-tratamento com cal

#### **4.5. Conclusões**

A agitação foi considerada uma variável importante no pré-tratamento com cal, devido à importância de ter o material homogeneizado no meio reacional para obter o maior contato entre substrato e reagente. A melhor condição de agitação encontrada foi de 150 rpm e a realização dos experimentos no shaker e no reator de 500 mL levou a resultados semelhantes.

As melhores condições para produção de glicose na hidrólise enzimática determinadas usando planejamento de experimentos e a metodologia das superfícies de resposta foram realizando o pré-tratamento com 0,4 g de cal/g de biomassa bruta a uma temperatura de 90 °C durante 90 h. O rendimento de produção de glicose nas condições ótimas de pré-tratamento e hidrolisadas com 5 FPU de celulase/g biomassa bruta e 1 CBU de  $\beta$ -glicosidase/g biomassa bruta, foi de 59,64%. Por tratar-se só de avaliar a etapa de pré-tratamento, se trabalhou com baixas cargas enzimáticas. Entretanto, outros experimentos mostraram que maiores rendimentos podem ser obtidas com maiores cargas enzimáticas.

Ao realizar a hidrólise enzimática com o bagaço que não foi submetido à etapa de pré-tratamento, os rendimentos da hidrólise enzimática foram muito baixos. Isto mostra a importância de se retirar ou modificar as estruturas da lignina e das hemiceluloses usando um pré-tratamento.

Durante o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, baixa remoção de hemicelulose e pouca solubilização de glicose foram encontradas. Na hidrólise enzimática uma considerável massa de ART foi liberada comparada com a glicose. Os açúcares redutores incluem não só a glicose, mas também pentoses e hexoses presentes na hemicelulose, que também é hidrolisada em algum grau pelas enzimas celulasas (RABELO, 2007). Entre os açúcares redutores também há celobiose, como será mostrado nas análises posteriores realizadas em HPLC.

## CAPITULO 5- OBTENÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO NO PRÉ-TRATAMENTO COM CAL

Durante o pré-tratamento com cal, parte da holocelulose é removida pela ação de íons hidróxido (KIM 2004). As massas de cada componente da biomassa mudam devido à solubilização dos componentes durante o pré-tratamento alcalino. Neste capítulo o pré-tratamento de bagaço com cal foi realizado em 4 temperaturas diferentes (60, 70, 80 e 90 °C) e balanços de massa foram realizados para o cálculo da massa perdida dos componentes durante o processo de deslignificação a fim de mostrar o comportamento e encontrar a cinética de deslignificação do pré-tratamento.

### 5.1. Revisão bibliográfica

O mecanismo de deslignificação pode ser descrito em três etapas: a Inicial, a “bulk” (dominante) e a residual (AURELL 1964, DE GROOT 1994) como mostrado na figura 5.1. Na etapa inicial, alguns compostos fenólicos com ligações  $\alpha$ -O-4 e  $\beta$ -O-4 têm estas ligações quebradas (GIERER *et al.* 1985). Na etapa dominante, a principal reação que ocorre é a ruptura das ligações não fenólicas  $\beta$ -O-4, (GIEREN e NÓREN 1980) e durante a etapa residual da deslignificação, ligações carbono-carbono na lignina são quebradas e os carboidratos são degradados (DE GROOT 1995).

DOLK *et al.* (1989) considerou a possibilidade de que a fase inicial, devido à sua rapidez, pode não ser controlada pela reação química, e sim pela difusão. LI e MUI (1999), confirma esta teoria e sugere a diminuição no tamanho das partículas e da temperatura para medir a cinética química desta etapa.

DE GROOT *et al.* (1995), descreveram a deslignificação da madeira como descrito anteriormente por AURELL (1964). Para os autores, a etapa inicial remove uma grande quantidade de hemiceluloses e pouca lignina. Na etapa dominante ocorre a maior remoção de lignina e hemiceluloses e, finalmente, na fase residual, a celulose e o restante da hemicelulose são decompostas, enquanto a remoção da lignina ocorre lentamente.

Etapa de Deslignificação	Principais Quebras de ligações	Taxa Relativa
Inicial	Ligações Fenólicas $\alpha$ -O-4 $\beta$ -O-4	Rápida
Bulk	Ligações não Fenólicas $\beta$ -O-4	Media
Residual	Ligações C-C	Lenta

**Figura 5.1.** Etapas de deslignificação no processo da transformação da madeira (Kim 2004).

FERNANDEZ *et al.*(1985) mostraram que a lignina do bagaço de cana é mais reativa e acessível do que a lignina da madeira. No caso do pré-tratamento com soda a altas temperaturas (100-165 °C), SEBATIER *et al.* (1993) mostraram que o bagaço não apresentava a etapa inicial na deslignificação, motivo pelo qual o autor considera no modelo apenas a etapa dominante e a residual. Eles sustentam esta afirmação mostrando que o processo de deslignificação alcalina no bagaço tem início com uma alta remoção de lignina comparada com a pouca remoção de hemicelulose, o que na madeira não é característico da etapa inicial e sim da etapa dominante.

COTLEAR (2004) estudou a deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com hidróxido de sódio, com e sem a adição de oxigênio. Ele mostrou que em períodos longos de pré-tratamento, em temperaturas inferiores a 60 °C, o bagaço apresenta uma diminuição no conteúdo de lignina rapidamente e pouca remoção de hemicelulose durante a primeira semana, o que o autor conclui ser devido à carência da etapa inicial. Além disso, observa-se o começo da etapa residual após a primeira semana, na qual a deslignificação se caracteriza por ocorrer muito lentamente.

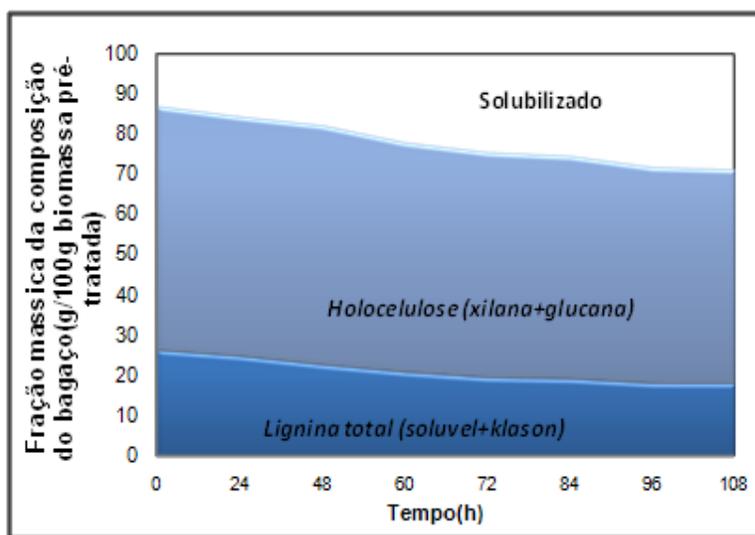
KIM (2004), estudou a deslignificação da palha de milho pré-tratado com hidróxido de cálcio, com e sem adição de oxigênio. A palha de milho foi moída até um tamanho de partícula menor que 0,6 mm com a finalidade de evitar problemas de difusão durante a deslignificação. O modelo cinético foi determinado empiricamente por três reações simultâneas de primeira ordem. A energia de ativação para a deslignificação oxidativa e não oxidativa, para a fase dominante, foi de 50,15 kJ/mol e 70,24 kJ/mol, respectivamente.

## 5.2. Descrição da metodologia

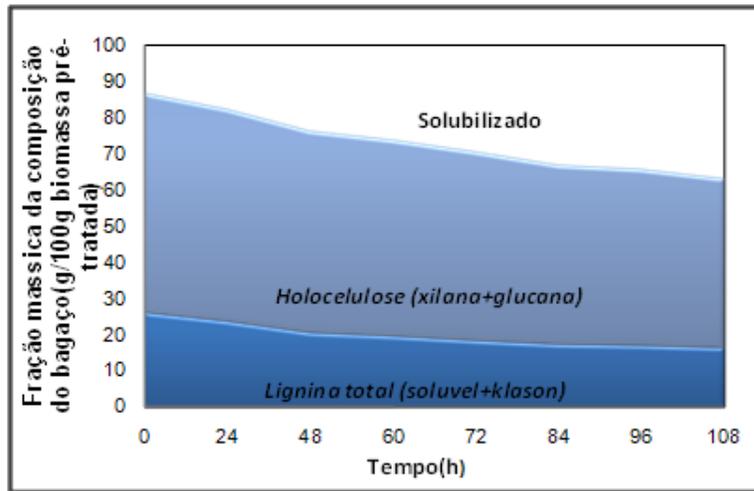
Dados cinéticos foram coletados em torno do ponto ótimo do pré-tratamento. 4 g de bagaço moído e seco foram tratados com 0,4 g de cal/g de biomassa bruta a diferentes condições de temperaturas 60, 70, 80, e 90 °C. Para cada uma destas isotermas foram realizados experimentos finalizando a reação a diferentes tempos de 24, 48, 60, 72, 84, 90 e 110 h. Após do pré-tratamento o material foi ajustado pH até ser neutralizado (item 3.7.1) para a remoção de cal que não foi consumida, seguidamente foi lavado, seco e levado a uma posterior hidrólise acida para a quantificação de celulose, hemicelulose e lignina (ver procedimento 3.3.4).

## 5.3. Resultados e Discussões

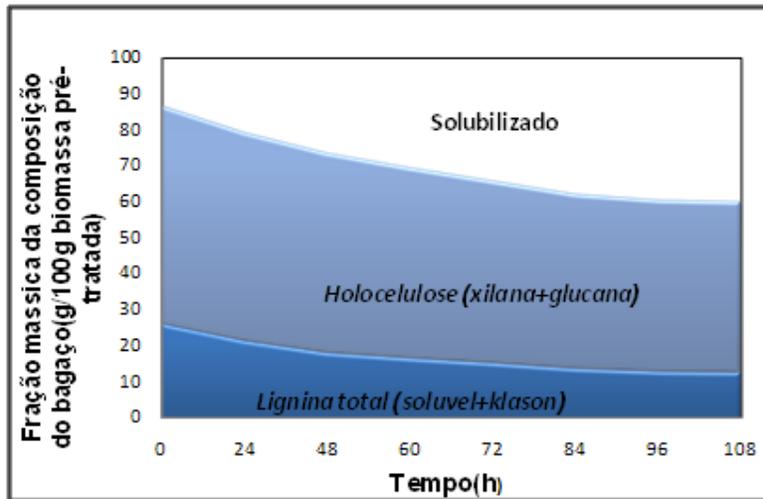
Durante o pré-tratamento com cal pode-se observar, com o transcorrer do tempo, a degradação da holocelulose (xilanas+glicanas) e da lignina (solúvel+insolúvel (Klason)). Como mostra a figura 5.2, a perda de massa é favorecida com o aumento da temperatura e do tempo. 30% do material foi solubilizado com 108 horas de pré-tratamento e 90 °C.



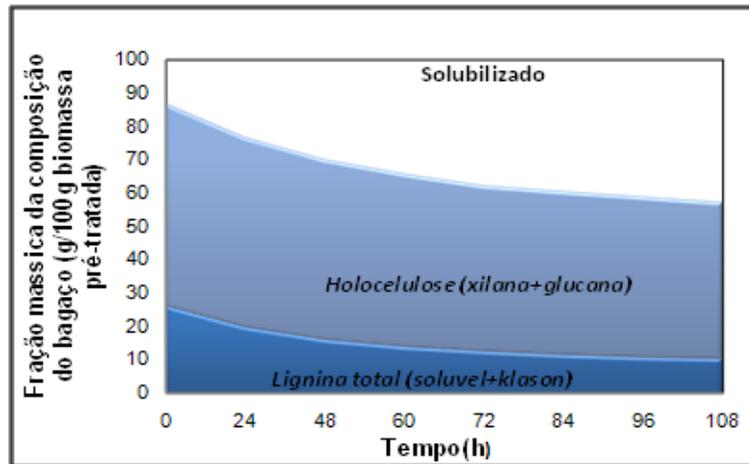
(a)



(b)



(c)

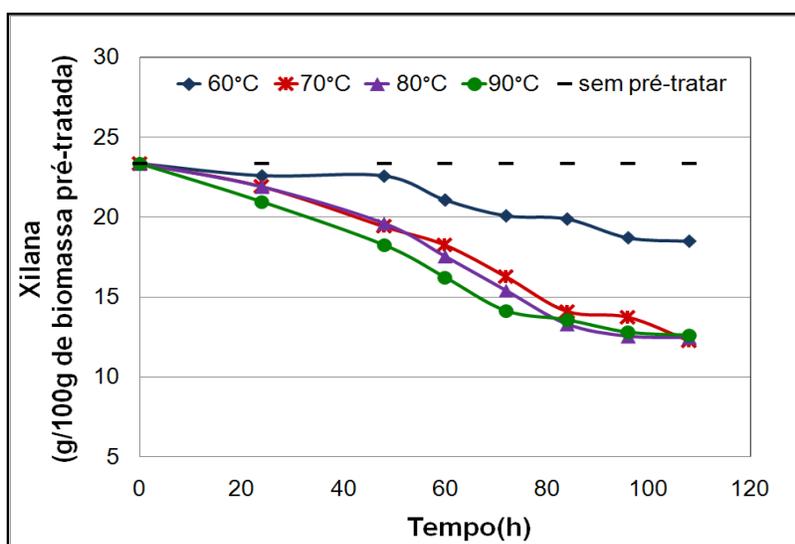


(d)

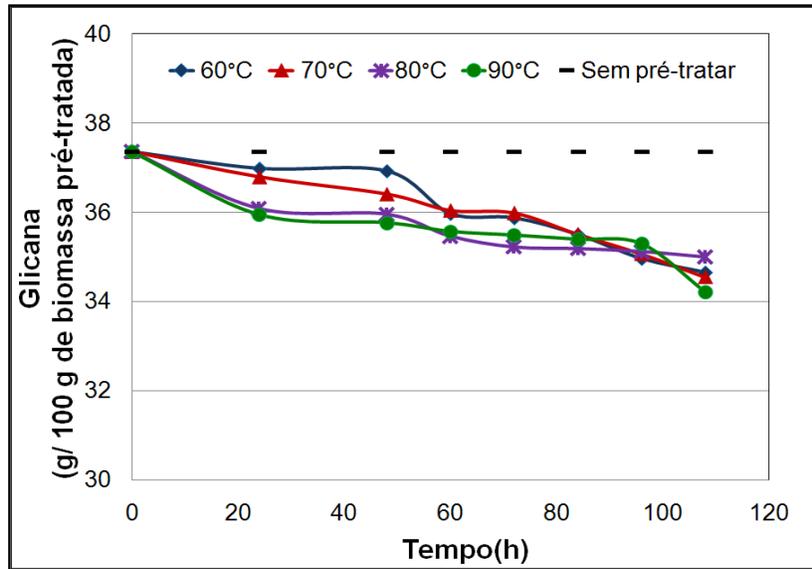
**Figura 5.2:** Massa total de sólidos, holocelulose, lignina total a: (a) 60°C, (b) 70°C, (c) 80°C, (d) 90°C.

Nas figuras 5.3 e 5.4 são mostrados os conteúdos de xilana e glicana no bagaço durante a deslignificação com cal a diferentes temperaturas. A maior perda de glicana ocorreu a 90 °C, e a maior solubilização de xilanas ocorreu a temperaturas maiores que 70 °C, ambos no tempo máximo de pré-tratamento. Por outro lado, a menor perda ocorreu a 60 °C para tempos menores que 48 h, sendo observado para os dois açúcares. Entretanto, estas foram as condições onde houve menor degradação de lignina, como é visualizado nas figuras 5.5 e 5.6, as quais mostram os conteúdos de lignina Klason e lignina solúvel no bagaço. Destas figuras pode-se observar que a degradação da lignina é favorecida com incrementos do tempo e da temperatura. A tendência da redução no conteúdo da lignina solúvel foi semelhante à da lignina Klason. O conteúdo de lignina no bagaço pré-tratado a 90 °C durante 108 h diminuiu de 24,47 para 9,10 g lignina Klason/100 g biomassa pré-tratada, equivalentes a uma remoção de 63% da lignina klason inicial, e 1,72 g passaram para 0,66 g lignina solúvel/ 100 g biomassa pré-tratada.

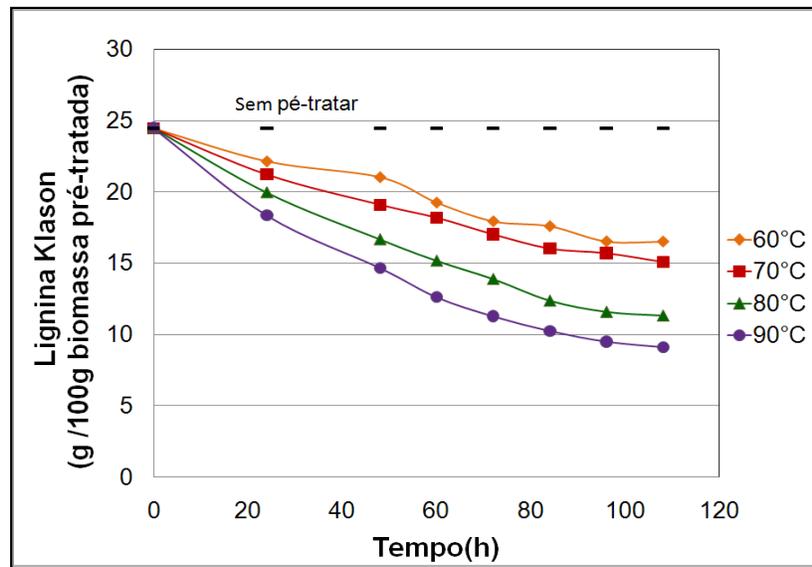
Nos perfis das figuras 5.3 a 5.6 nota-se que o aumento de temperatura favorece bastante a deslignificação, mas influencia menos a perda de xilana e glicana, ao contrário do aumento tempo de pré-tratamento, que influencia as três variáveis (lignina, glicana e xilana). Isto indica que talvez seja interessante avaliar a possibilidade de realizar o pré-tratamento em temperaturas mais altas e por menores tempos em estudos futuros.



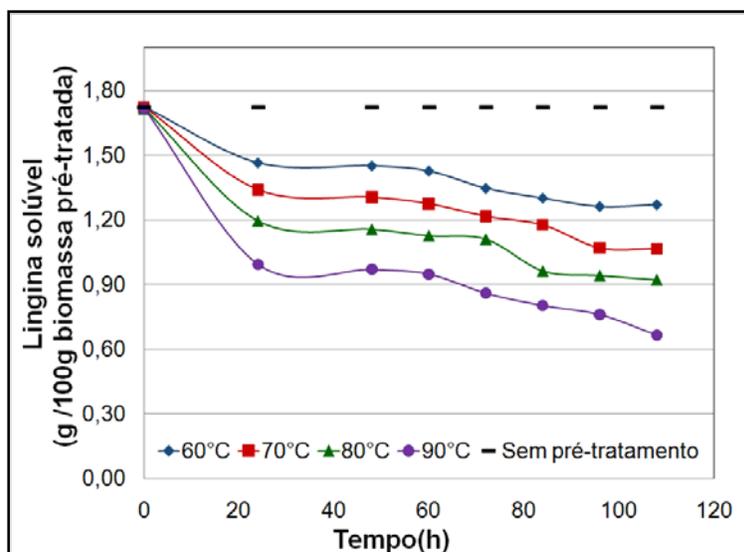
**Figura 5.3:** Conteúdo de xilanas em função do tempo durante a etapa de deslignificação



**Figura 5.4:** Conteúdo de glicana em função do tempo durante a etapa de designificação



**Figura 5.5:** Comportamento do conteúdo de lignina Klason em função do tempo durante a etapa de designificação



**Figura 5.6:** Degradação da lignina solúvel durante a deslignificação com cal

A equação 5.1 foi utilizada para o cálculo das conversões de lignina durante a etapa de deslignificação para cada isoterma. A figura 5.7 mostra os perfis da conversão de lignina total em função do tempo. A maior conversão obtida foi de 52% e 62% para as temperaturas de 80 °C e 90 °C, respectivamente. A menor conversão de lignina atingiu 30% para a deslignificação realizada a 60 °C. Nestas figuras pode-se também observar que as maiores deslignificações ocorreram nos tempos máximos de pré-tratamento para todas as temperaturas estudadas.

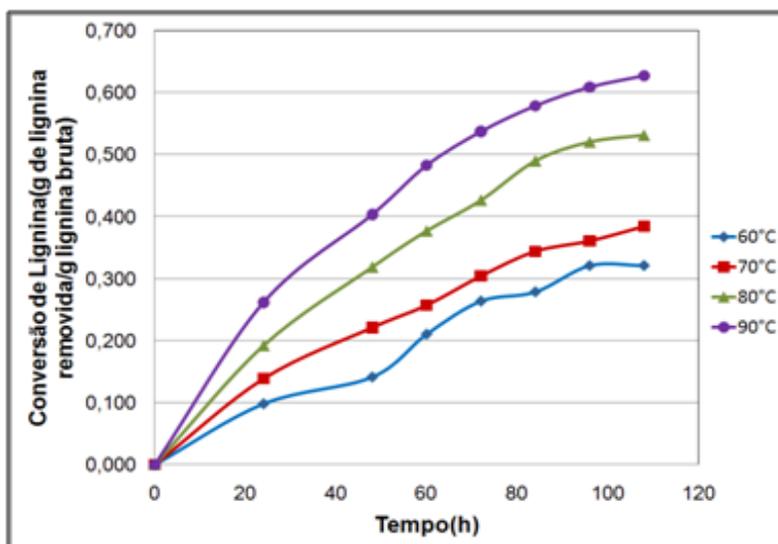
$$L_c = \frac{L_{T_0} - L_T}{L_{T_0}} \times 100\% \quad 5.1$$

Onde:

$L_c$  = Conversão de lignina total no tempo t, g de lignina removida no tempo t/g lignina inicial t=0.

$L_{T_0}$  = Conteúdo de lignina total no t=0, g de lignina total no tempo t=0/g biomassa pré-tratada.

$L_T$  = Conteúdo de lignina total no t, g de lignina total no tempo t/g biomassa pré-tratada.



**Figura 5.7:** Conversão da Lignina total em função do tempo a 60, 70, 80 e 90 °C.

A seletividade da deslignificação (g de holocelulose perdida/ g lignina removida) é um parâmetro de vital importância devido ao fato que esta descreve a eficácia do processo. Idealmente, uma boa deslignificação no processo deve remover altos conteúdos de lignina sem uma significativa perda de holocelulose: Portanto, valores pequenos de seletividade são desejáveis (COTLEAR 2004). A figura 5.8 (a-d) mostra a perda de holocelulose em relação à degradação de lignina a diferentes temperaturas, a qual foi calculada através da equação 5.2.

$$M_P = M_o - M_t \quad 5.2$$

Onde:

$M_P$  = Massa perdida de holocelulose ou de lignina Klason, (g/100 g de biomassa pré-tratada).

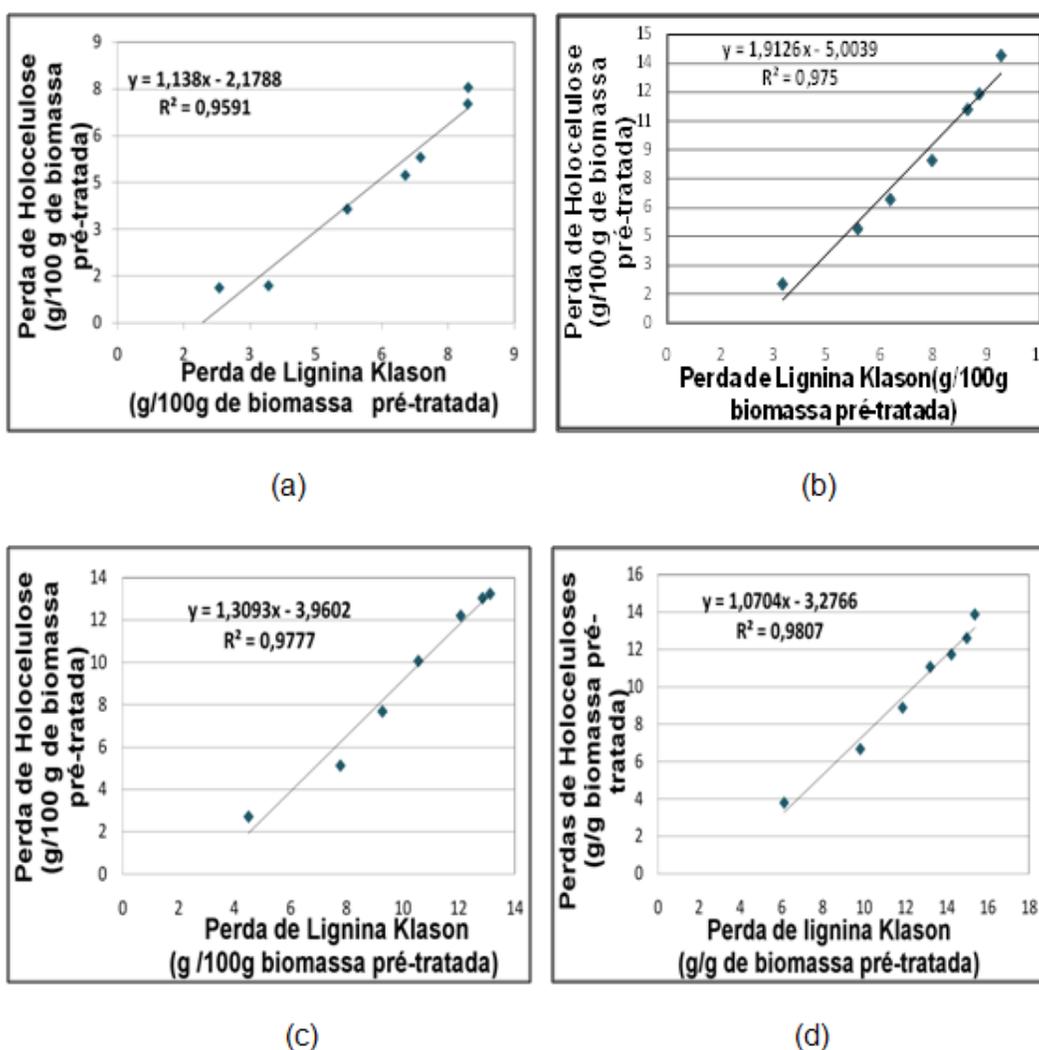
$M_o$  = Massa inicial de lignina Klason ou holocelulose no tempo  $t=0$ , (g/100 g de biomassa pré-tratada).

$M_t$  = Massa de lignina Klason ou holocelulose no tempo  $t$ , g/100 g de biomassa pré-tratada.

Estas correlações reportadas na figura referida não incluem o ponto inicial de perda de holocelulose e lignina removida no tempo  $t=0$ . Este ponto o qual pertence a etapa inicial não apresenta um comportamento similar ao demais dados de deslignificação. Observa-se também que inicialmente houve

maior perda lignina comparada com a remoção de hemicelulose, sendo esta, a principal característica da etapa dominante e não da etapa inicial. SEBATER *et al.*(1995), propôs que a deslignificação do bagaço ocorre inicialmente com uma alta taxa de remoção de lignina comparada com a perda de carboidratos, fato pelo qual justifica a falta da etapa inicial na deslignificação alcalina do bagaço.

Foram utilizadas regressões lineares para obter a inclinação da reta, que representa a seletividade. O processo se mostrou mais seletivo quando a deslignificação é realizada a uma temperatura de 90 °C, onde houve maior solubilização de lignina com baixa perda de holocelulose.



**Figura 5.8:** Perdas de holocelulose versus remoção de lignina Klason no pré-tratamento com cal a: (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C e (d) 90 °C.

### 5.3.1. Cinética da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar

Como foi visto na revisão bibliográfica deste capítulo, a degradação da lignina ocorre em três fases: a inicial, a dominante e a residual. Do ponto de vista cinético, a lignina pode ser classificada em três diferentes classes de acordo com a fase onde é degradada (equação 5.3). KIM e HOLTZAPPLE, (2005) mostraram que, dependendo do substrato e do reagente utilizado no pré-tratamento, algumas fases podem não estar presentes na deslignificação.

$$\frac{L_k}{L_{k0}} = a_i \exp(-k_i \times t) + a_b \exp(-k_b \times t) + a_r \exp(-k_r \times t) \quad 5.3$$

Esta equação está restrita pela condição de:  $a_i + a_b + a_r = 1$ , quando

$$\frac{L_k}{L_{k0}} = 1 \text{ para } t=0.$$

Onde:

$L_k$  = Conteúdo total de lignina no tempo  $t$ , g lignina no tempo  $t$ / g total de sólidos secos.

$L_{k0}$  = Conteúdo total de lignina em  $t=0$ , g lignina no tempo  $0$ / g biomassa bruta seca.

$a$  = Fração de lignina que pode ser removida em uma etapa especificada, g lignina na etapa especificada no tempo  $t=0$ /g lignina no tempo  $t=0$ .

$k$  = Constantes cinéticas para a etapa especificada, 1/h

Com os resultados obtidos de seletividade e conversão de lignina obtidos no item 5.5, conclui-se que a deslignificação do bagaço em tempos menores de 108 h só apresenta uma fase (dominante ou "bulk"). A carência da fase inicial na deslignificação foi observada no estudo de seletividade, já que a remoção de lignina inicialmente foi maior que a perda de hemicelulose; característica principal da etapa dominante e não da etapa inicial.

A carência da etapa residual na deslignificação realizada para tempos curtos ( $\leq 108$  h) foi observada com os resultados de seletividade e conversão de lignina. A principal característica da fase residual é que a remoção da lignina procede muito lentamente, enquanto os carboidratos são degradados (DE GROOT *et al.*, 1995). Este fato não foi observado nos estudos de

deslignificação para as condições de pré-tratamento deste trabalho. Em todos os casos a degradação da lignina é significativa durante todo o pré-tratamento.

Portanto, mediante as condições de trabalho, concluímos que a deslignificação do bagaço de cana pré-tratado com cal carece da etapa inicial e residual para tempos curtos e temperaturas entre 60-90 °C. Este resultado está de acordo com os obtidos por COTLEAR, (2004), que verifica o surgimento de tal etapa somente após a primeira semana de pré-tratamento.

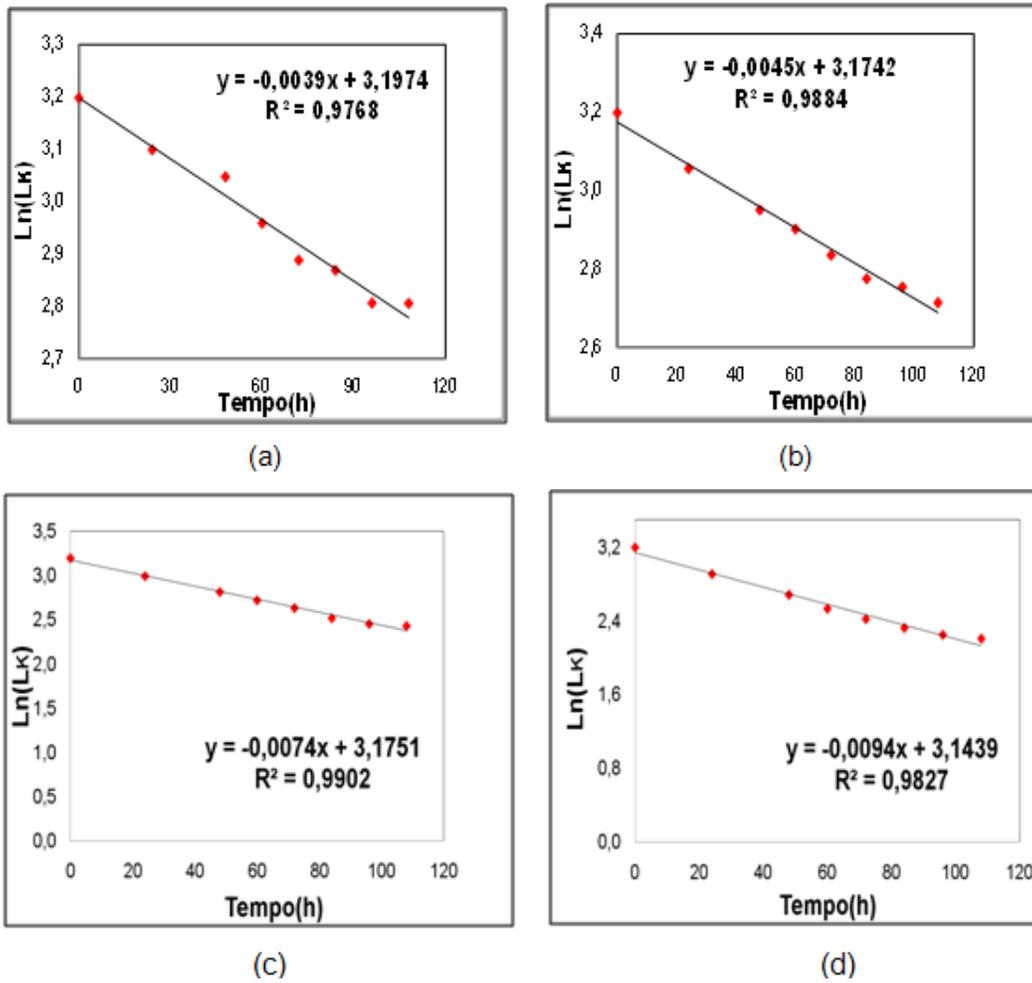
SEBATIER *et al.* (1995) mostram que o bagaço submetido à deslignificação com soda não apresenta a etapa inicial. Os autores confirmam este fato mostrando que processos de deslignificação alcalinos para o bagaço inicialmente começam com altas degradações de lignina, comparada com às degradações dos carboidratos, o que não é característico da fase inicial e sim da fase residual (DE GROOT *et al.*, 1995). Este mesmo fato foi observado por COTLEAR (2004), pré-tratando o bagaço com cal. O autor afirma que esta fase é tão pequena que não poderia ser detectada por uma simples inspeção visual.

Considerando só a fase dominante, o modelo apresentado na equação 5.4 é reduzido à equação 5.5.

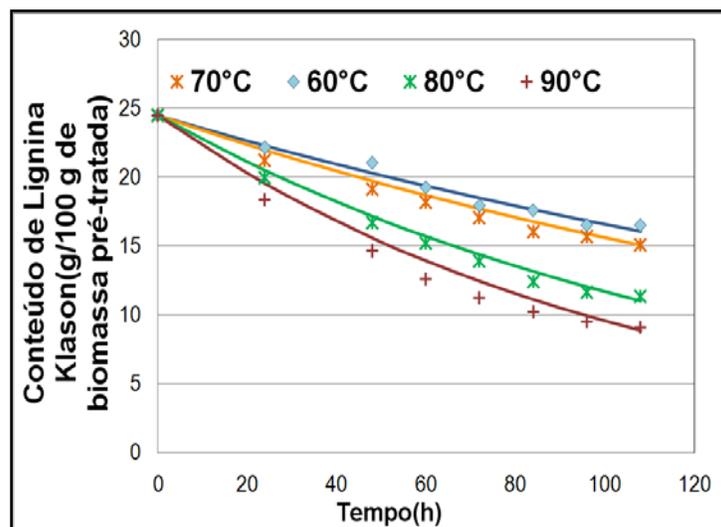
$$\ln(L_k) = -k_b \times t + \ln L_{ok} \quad (5.5)$$

Plotando  $\ln(L_k)$  contra o tempo (figura 5.9), foi possível determinar, a partir da inclinação da reta, as constante de velocidade, "k<sub>b</sub>", para as temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C como: k<sub>b1</sub>= 0,0039 h<sup>-1</sup>, k<sub>b2</sub>= 0,0045 h<sup>-1</sup>, k<sub>b3</sub>= 0,0074 h<sup>-1</sup> e k<sub>b4</sub> = 0,0094 h<sup>-1</sup>, respectivamente. O coeficiente linear representa o logaritmo neperiano da composição inicial da lignina Klason. Os resultados mostram que a constante cinética aumenta com o aumento da temperatura.

A figura 5.10 apresenta a degradação da lignina em função do tempo calculada pelo modelo apresentado na equação 5.5 (linhas contínuas) e os dados obtidos experimentalmente (pontos) para cada temperatura. Comparando o modelo com os dados experimentais, observa-se que houve um bom ajuste com as hipóteses consideradas.



**Figura 5.9:** Gráficos de logaritmo natural da lignina Klason versus tempo para as temperaturas de: (a) 60 °C, (b) 70 °C, (c) 80 °C e (d) 90 °C.



**Figura 5.10:** Modelo cinético para a predição da lignina Klason

Embora o modelo apresentado na equação 5.5 seja semi-empírico, uma das suas importantes características é que com as constantes cinéticas obtidas anteriormente pode ser calculada a energia de ativação do processo de deslignificação utilizando a equação de Arrhenius (DOLK *et al.*, 1989; CHIANG *et al.*, 1990):

$$\ln(k) = \ln(A) + \left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (5.6)$$

Onde:

$A$  = Fator pré-exponencial ou fator de frequência (1/h)

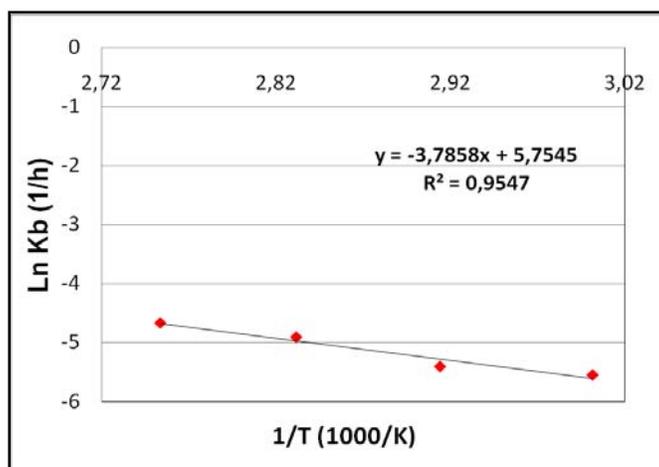
$T$  = Temperatura, K,

$E_a$  = Energia de ativação Joule/mol

$k$  = Constantes cinéticas para cada temperatura, 1/h

$R$  = Constante universal dos gases, 8.314 J/(mol\*K)

A energia de ativação foi determinada plotando o  $\ln(K_b)$  versus  $1/T$ , como é ilustrado na figura 5.11, e o valor obtido foi de 31,47 kJ/mol. Este valor foi menor que a energia de ativação para a madeira e palha de trigo (aproximadamente 120-130 kJ/mol e 50kJ/mol, respectivamente) na fase dominante (Kim, 2005), quando estas matérias-primas foram deslignificadas com cal em condições oxidativas. O bagaço parece ter uma estrutura mais favorável que a madeira e que o milho para remoção de lignina nas condições alcalinas estudadas, por ter uma menor energia de ativação na deslignificação.



**Figura 5.11:** Gráfico  $\ln(k/s^{-1})$  versus  $103/T(K)$  para a determinação da  $E_a$  para deslignificação do bagaço.

Sabe-se que a energia de ativação é a energia mínima que os reagentes necessitam para a formação dos produtos. Assim, o fator exponencial “ $e^{-Ea/RT}$ ” pode ser interpretado como a fração de colisões que têm energia suficiente para promover a reação. Com o resultado anterior poderíamos interpretar que seria necessária uma energia de ativação mínima de 31,47 kJ/mol para obter uma remoção de lignina do bagaço pré-tratado nas condições estudadas.

#### **5.4. Conclusões**

O processo de deslignificação se mostrou mais seletivo quando o bagaço foi pré-tratado a temperaturas de 90 °C. Nestas condições, foram obtidas as maiores remoções de lignina e as menores perdas de carboidratos. Isto confirma a temperatura de 90 °C como a melhor temperatura para pré-tratamento de bagaço de cana com cal na faixa operacional considerada, como já tinha sido determinado durante os planejamentos de experimentos realizados no capítulo 4.

O modelo cinético da deslignificação do bagaço de cana tratado com hidróxido de cálcio foi empiricamente estabelecido como uma reação de primeira ordem, correspondendo à fase dominante, para tempos de pré-tratamentos menores ou iguais a 108 h. A energia de ativação da deslignificação foi estimada com um valor de 31,47 kJ/mol, o qual é menor que a energia de ativação da deslignificação para a madeira e a palha de milho (120-139 kJ/mol e 50 kJ/mol, respectivamente) pré-tratadas com cal em condições oxidativas (KIM e HOLTZAPPLE, 2006).

## **CAPITULO 6- OBTENÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA**

A hidrólise enzimática apresenta-se como uma das alternativas mais adequadas para a produção de açúcares a partir de biomassas lignocelulósicas. Este processo se caracteriza por utilizar condições suaves durante o processo, o que leva a uma menor quantidade de subprodutos tóxicos na fermentação, além de, produzir altos rendimentos em glicose. A hidrólise enzimática é afetada por diferentes fatores tais como: a temperatura, o tempo, o pH, a carga enzimática, a concentração de substrato, a concentração de produtos e as características estruturais da biomassa. Uma maior concentração de substrato, dentro de uma margem, ajuda a aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis produzidos na hidrólise para uma mesma relação enzima:substrato. Do mesmo modo, o emprego de elevadas concentrações de substrato lograria diminuir os requerimentos de água do processo. Porém, aumentar a quantidade de substrato leva a uma serie de inconvenientes: por um lado, aumenta-se a concentração de compostos inibidores gerados durante o pré-tratamento (degradação da lignina, hemicelulose, etc.), e, dada a maior liberação de açúcares durante a hidrólise, a inibição por produto final também aumenta. Outra dificuldade é manter uma boa homogeneização de todo o material, o que dificulta a difusão das enzimas.

Alguns dos fatores que afetam a hidrólise enzimática, tais como o aumento na carga de sólidos e a variação de carga de enzimática, foram estudados neste capítulo com o fim de fornecer dados cinéticos ao nosso grupo de pesquisa para posteriores estudos de modelagem cinética da hidrólise enzimática.

### **6.1. Obtenção de Dados Cinéticos Variando a Carga de Sólidos na Hidrólise Enzimática**

Neste item é estudado o comportamento da hidrólise enzimática com a variação na concentração de sólidos, com a finalidade de obter dados que possibilitem um estudo cinético detalhado do processo, como também avaliar a possibilidade de se trabalhar com maiores concentrações de sólidos, o que resulta em uma redução no consumo da água.

### 6.1.2. Descrição da Metodologia

Neste estudo, bagaço previamente pré-tratado nas condições ótimas descritas no capítulo 4, foi submetido à etapa de hidrólise com o objetivo de avaliar a influência da concentração de bagaço na hidrólise enzimática. Experimentos foram realizados com 1, 2, 3, 4 e 5% (p/v) de sólidos, usando como solução tampão citrato com 0,07g de azida. Este meio foi utilizado com o fim de evitar a proliferação de microrganismos. A carga enzimática empregada para esta análise foi de 500 FPU/L de celulase e 500 CBU/L de  $\beta$ -glicosidase para todas as porcentagens de sólidos. O pH foi ajustado com ácido acético até ficar estável em um valor de 4.8. As condições de temperatura e agitação foram mantidas à 50 °C e 150 rpm, respectivamente. Alíquotas foram retiradas aos 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h de reação, sendo a reação interrompida pelo aumento da temperatura a 80 °C durante 10 minutos. Foram realizadas as leituras em HPLC para a quantificação dos açúcares. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A tabela 6.1 apresenta as cargas enzimáticas da  $\beta$ -glicosidase e celulase para cada concentração de substrato em unidades da enzima por grama de biomassa pré-tratada.

**Tabela 6.1:** Condições das cargas enzimáticas a diferentes concentrações de bagaço

Concentração de bagaço (m/v)	Concentração de celulase e beta-glicosidase (CBU ou FPU/g.b.s)
1 %	50
2%	25
3%	16,7
4%	12,5
5%	10

*g.b.s= gramas de biomassa seca*

### 6.1.3. Análises de Resultados

Nas figuras de 6.1 a 6.3 são apresentados os perfis de hidrólise em termos de concentração (g/L) para a celobiose, glicose, xilose e arabinose. Os valores experimentais são reportados no anexo F. Nas figuras referidas observou-se maior liberação de açúcares com o aumento na concentração de sólidos. Com 5% obteve-se uma produção de glicose de 25,20 g/L, enquanto a

menor produção ocorreu com 1% de sólidos, quando atingiu-se uma concentração de 6,62 g de glicose/L. A maior concentração de celobiose ocorreu na concentração de sólidos de 5%, sendo que a concentração deste açúcar diminui com a diminuição da carga de sólidos. Apesar de se obter maiores concentrações de glicose com cargas de sólidos maiores, a figura 6.1 mostra que seria necessário utilizar maiores cargas enzimáticas de  $\beta$ -glicosidase para converter maior quantidade de celobiose nas concentrações de 3, 4 e 5%.

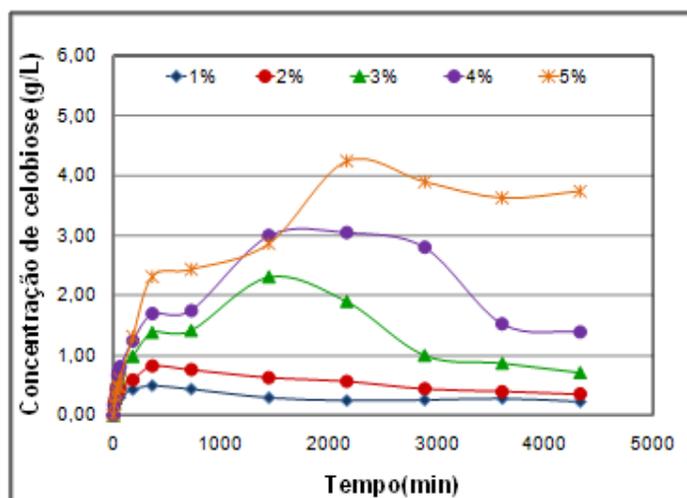


Figura 6.1. Perfis de hidrólise de celobiose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos

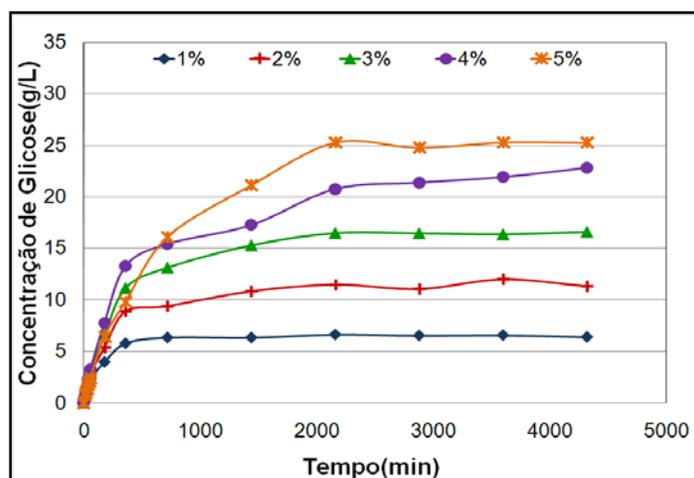


Figura 6.2: Perfis de hidrólise de glicose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos

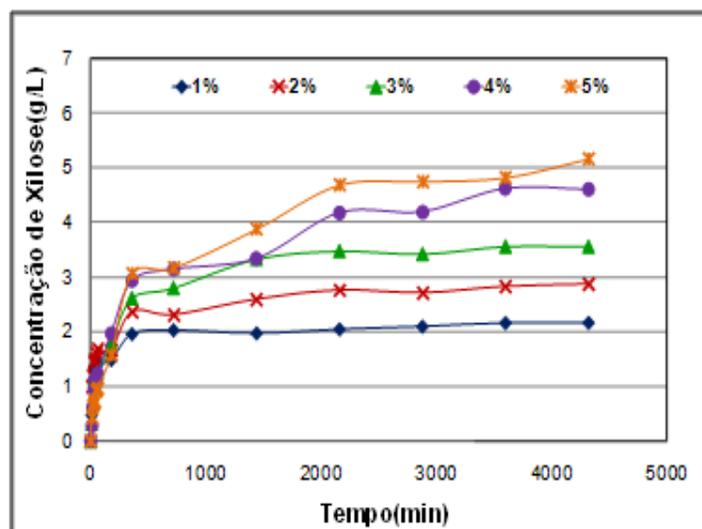


Figura 6.3: Perfis de hidrólise de xilose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos

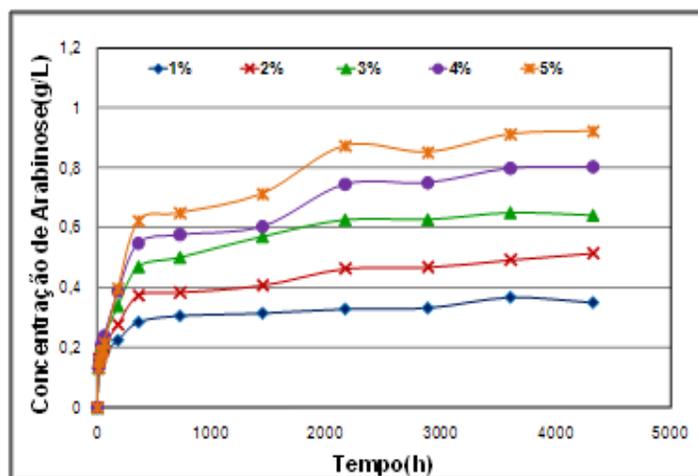


Figura 6.4: Perfis de hidrólise de arabinose (g/L) com 1, 2, 3, 4 e 5% de sólidos

BREULI (1991), reporta que concentrações de celobiose estiveram presentes em todas as hidrólises com concentrações de substrato de 10% (m/v). Este autor, conseguiu aumentar a conversão de celobiose com o incremento na quantidade de  $\beta$ -glicosidase, a qual foi inibida pelas altas concentrações de glicose. ZHU (2005), reporta que, incrementos na concentração de substrato têm dois efeitos na hidrólise das glicanas, afetando o rendimento: 1) incrementos nas concentrações de substrato e enzima elevam a formação do complexo enzima-substrato, acelerando a taxa de hidrólise, e (2) causam maiores concentrações de produtos finais, os quais inibem as enzimas.





## 6.2. Obtenção de Dados Cinéticos com Variação na Carga Enzimática

A carga enzimática e as características estruturais estão intimamente interligadas durante a hidrólise enzimática dos materiais lignocelulósicos, ou seja, biomassas com características estruturais mais acessíveis para a enzima necessitarão menores cargas de enzima para atingir elevados teores de açúcares, enquanto, a digestibilidade da biomassa com características recalcitrantes pode ser melhorada, em certa medida, com altas cargas enzimáticas. Devido ao alto preço das enzimas, reduzir a quantidade de enzima necessária para atingir altos rendimentos a partir da biomassa se torna um dos alvos da hidrólise enzimática. Este estudo analisará o efeito de carga enzimática para as condições ótimas de pré-tratamento com o fim de encontrar a carga enzimática ideal para obter maior produção de açúcares fermentescíveis, além de fornecer dados cinéticos para posteriores estudos de modelagem.

### 6.2.1. Metodologia Experimental

Neste estudo, a concentração de sólidos foi fixada em 3% (m/v) (3 gramas de bagaço pré-tratado nas condições ótimas). Ao bagaço pesado foram adicionados 100 mL de tampão citrato com 0,07 g de azida. O meio reacional foi ajustado ao pH 4.8 durante três dias. As condições de temperatura e agitação foram mantidas a 50 °C e 150 rpm. A cada ensaio foram adicionadas diferentes concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase de acordo com um planejamento composto central  $2^2$  com três pontos centrais. A tabela 6.2 mostra a matriz de planejamento. Na primeira e na terceira colunas encontram-se expressas as concentrações enzimáticas de celulase e  $\beta$ -glicosidase por grama de bagaço pré-tratado, na segunda e na quarta colunas estão mostradas as concentrações enzimáticas equivalentes em termos de concentração de enzima por litro de solução. Alíquotas foram retiradas aos 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h de reação e a reação foi interrompida com o aumento na temperatura até 80 °C durante 10 min, sendo realizadas as leituras em HPLC para a quantificação dos açúcares.

**Tabela 6.2:** Matriz de planejamento composto central para a variação de carga enzimática

Ensaio	Celulase (FPU/g.b.s)	Celulase (FPU/L)	Beta-glicosidase (CBU/g.b.s)	Beta-glicosidase (CBU/L)
1	5,83	175	7,33	220
2	5,83	175	42,66	1280
3	25,83	775	7,33	220
4	25,83	775	42,66	1280
5	1,66	50	25	750
6	30	900	25	750
7	15,83	475	0	0
8	15,83	475	50	1500
9 (C)	15,83	475	25	750
10 (C)	15,83	475	25	750
11 (C)	15,83	475	25	750

g.b.s = gramas de biomassa seca

### 6.2.2. Análise de Resultados

Na tabela 6.3 é apresentada a matriz de planejamento com as respostas concentração de glicose e rendimento em glicose obtido na hidrólise enzimática. Nela pode-se notar que, a maior produção de glicose ocorreu nos pontos centrais, onde as concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase adicionadas foram de 475 FPU/L e 750 CBU/L, respectivamente. O valor máximo atingido foi de 15,88 g/L de glicose com um rendimento de 78,55%. O segundo maior rendimento foi obtido no ensaio 3. Este ensaio atingiu um valor de 78,55% de rendimento o qual foi próximo ao máximo encontrado.

A menor liberação de glicose ocorreu no ensaio 5, que foi realizado com a menor carga enzimática de celulase. O ensaio 7 atingiu um rendimento de glicose de 66,24%, sendo o segundo mais baixo. Apesar de não ter sido adicionada  $\beta$ -glicosidase neste ensaio, o rendimento não foi tão baixo comparado com o ensaio que continha baixa carga de celulase.

**Tabela 6.3:** Matriz de planejamento composto central com as respostas de glicose e rendimento

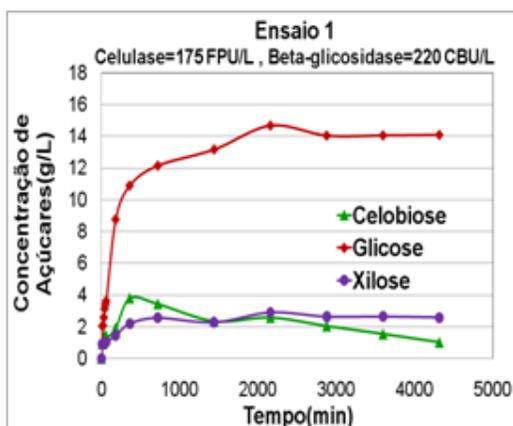
Ensaio	Celulase (FPU/L)	$\beta$ -glicosidase (CBU/L)	Glicose (g/L)	Rendimento Glicose(%)
1	175	220	14,65	71,08
2	175	1280	14,29	70,99
3	775	220	15,50	78,55
4	775	1280	14,73	74,64
5	50	750	12,39	62,76
6	900	750	14,88	75,39
7	475	0	13,07	66,24
8	475	1500	14,80	74,99
9 (C)	475	750	15,88	80,48
10 (C)	475	750	15,82	80,15
11 (C)	475	750	14,97	75,86

Na figura 6.7 são apresentados os perfis de hidrólise para cada ensaio com sua respectiva produção de glicose, xilose e celobiose. Nos ensaios 3 e 4 (figuras 6.7c e 6.7d) observou-se uma mesma concentração de xilose liberada. Entre estes dois ensaios manteve-se a mesma concentração de celulase e variou-se a concentração de  $\beta$ -glicosidase (220 e 1280 CBU/L, respectivamente). A figura 6.7i apresenta a media dos pontos centrais com seus respectivos desvios padrão.

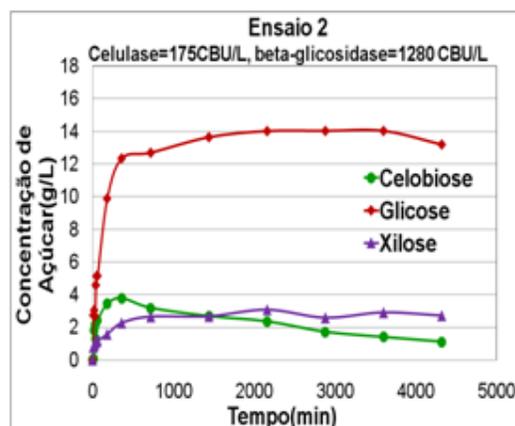
Observa-se da tabela 6.3 que, mantendo a concentração de celulase fixa, e aumentar muito a concentração de  $\beta$ -glicosidase não favorece a liberação de glicose. Isto pode ser confirmado ao comparamos o ensaio 1 com o ensaio 2, o ensaio 3 com o ensaio 4 e o ensaio de ponto central com o ensaio 8. Uma explicação possível para este fato é a alta afinidade que a lignina tem pela  $\beta$ -glicosidase (HUANG e PENNER, 2002). Grandes concentrações de  $\beta$ -glicosidase provavelmente levam a alta adsorção desta enzima quando há lignina no material, o que cobre o material lignocelulósico, diminuindo os sítios ativos e impedindo o passo da celulase à celulose. Por outro lado, comparando o ensaio 7 com os ensaios de ponto central ou com o ensaio 8, nota-se que quando a concentração de  $\beta$ -glicosidase é muito baixa, o aumento da concentração desta enzima favorece o aumento do rendimento.

No ensaio 7 observa-se uma grande quantidade de celobiose que não foi convertida em glicose (figura 6.7 g), já que não houve adição de  $\beta$ -glicosidase e esta enzima é a responsável por hidrolisar a celobiose em glicose. Apesar do complexo da celulase conter  $\beta$ -glicosidase, se observa a necessidade de adicionar quantidades puras desta enzima para obter maiores rendimentos de glicanas e diminuir a inibição causada pela celobiose.

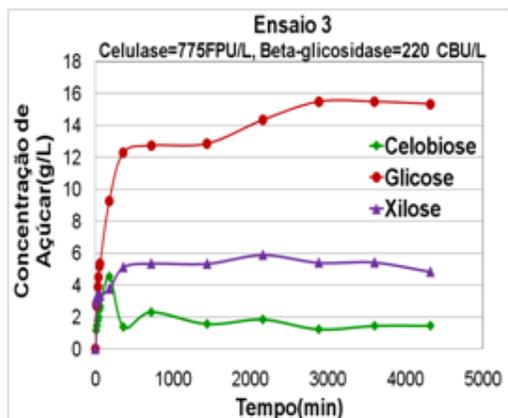
Da tabela 6.3 pode-se observar também que, a partir de uma dada concentração de celulase, mantendo-se a concentração de  $\beta$ -glicosidase fixa, aumentar a concentração de celulase causa um aumento no rendimento. Isto pode ser observado ao se comparar o ensaio 1 com o ensaio 3, o ensaio 2 com o ensaio 4, e o ensaio 5 com o ensaio 6. No entanto um aumento excessivo na concentração de celulase diminui o rendimento da hidrólise, como pode ser visto ao se comparar o ensaio 6 com os ensaios de ponto central.



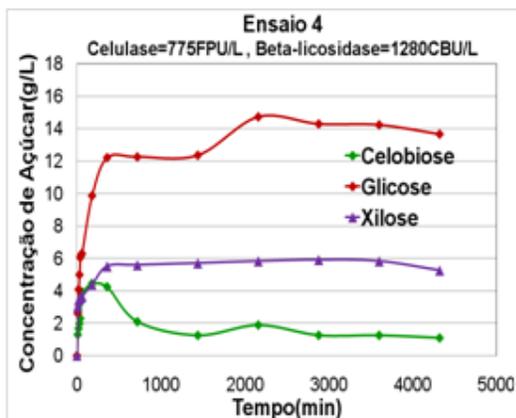
(a)



(b)



(c)



(d)

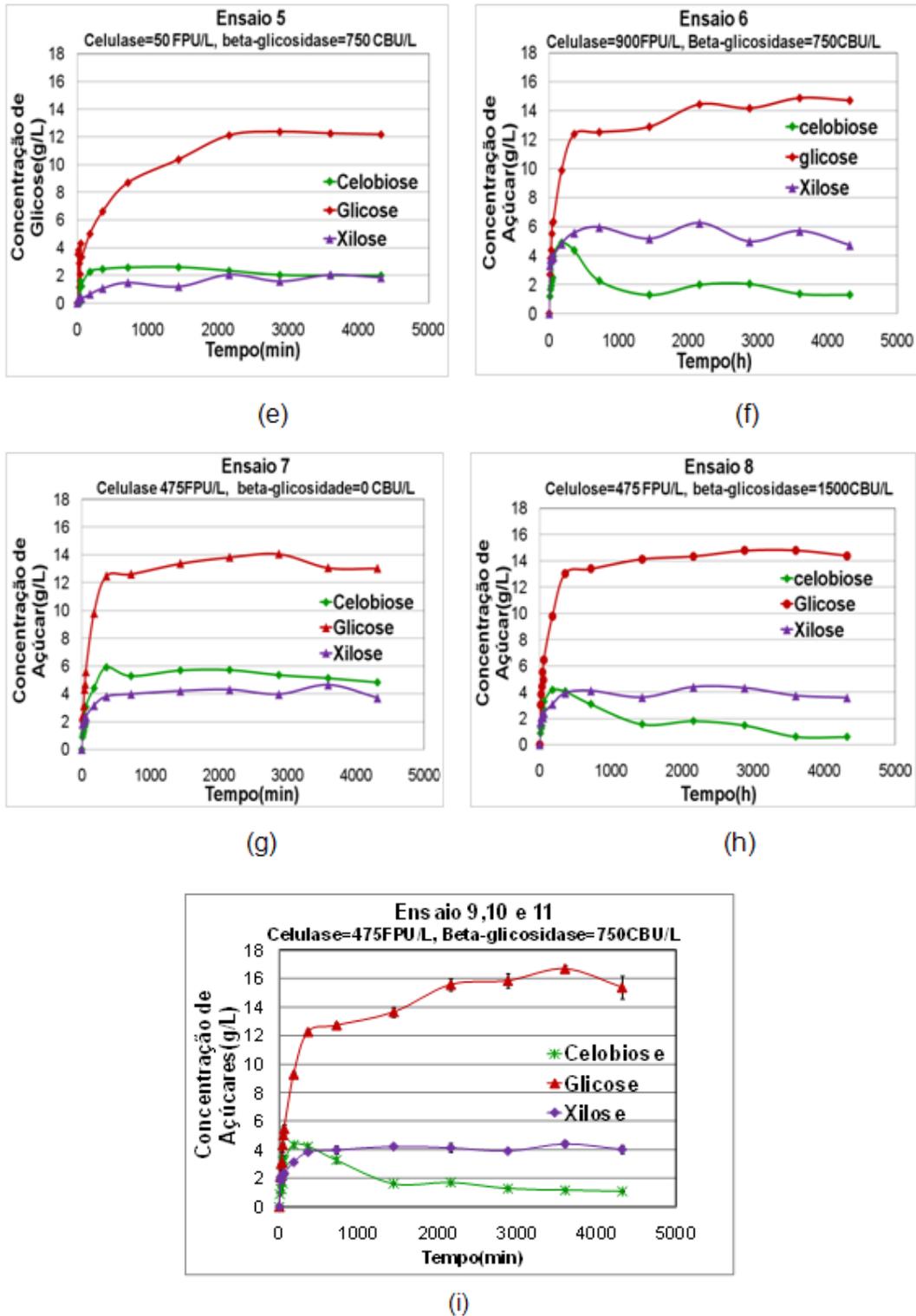
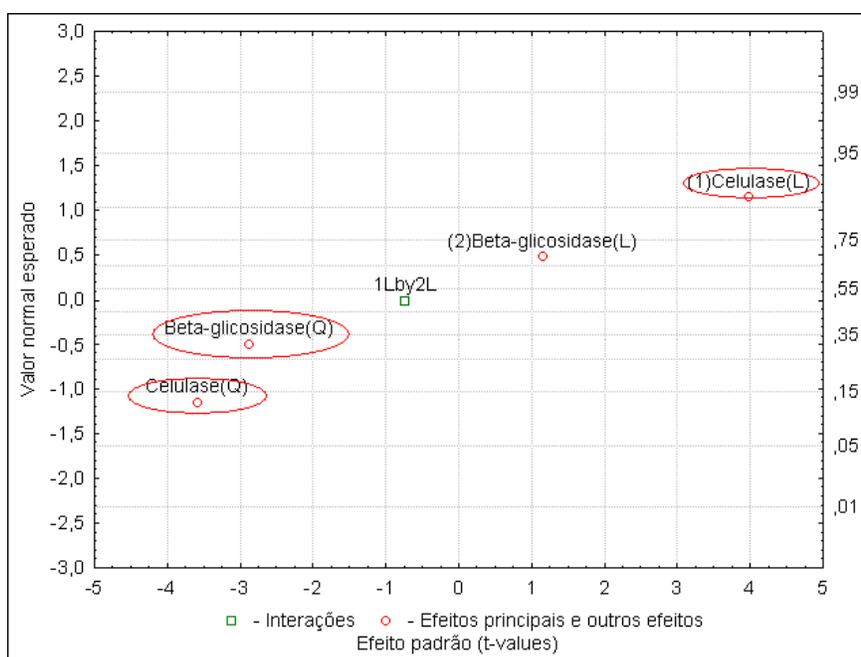


Figura 6.7: Perfis de Hidrólise enzimática para a variação de carga enzimática da celulase e da  $\beta$ -glicosidase

### 2.2.1. Análise estatística para o rendimento de glicose do planejamento composto central

Para a análise dos efeitos das concentrações de enzima no rendimento em glicose são analisados a tabela 6.4 e o gráfico normal apresentado na figura 6.8. Neles nota-se que somente o efeito linear e quadrático da concentração de celulase apresentaram um valor  $p < 0,1$ , o que quer dizer que são estatisticamente significativos a 90% de confiança, sendo o efeito quadrático da concentração de celulase o efeito de maior significância, com valor negativo, indicando uma região de máximo rendimento.



**Figura 6.8:** Gráfico normal para o rendimento em glicose

A equação 6.1 mostra o modelo completo que foi obtido com os valores dos coeficientes tomados da tabela 6.4. Com o fim de validar este modelo é necessário realizar o teste F. Para que o modelo possa ser usado para fins preditivos é necessário passar pelas duas condições; uma esta relacionada com a regressão e a outra com a falta de ajuste.

$$\text{Rendimento} = 78,83 + 3,61C - 3,87C^2 + 1,04B - 3,11B^2 - 0,95CB \quad 6.1^5$$

<sup>5</sup>Equação 6.1 apresentada em termos de variáveis codificadas

Sendo: C=Concentração de celulase, B=concentração de  $\beta$ -glicosidase

**Tabela 6.4:** Análise dos efeitos principais e de interações do planejamento composto central, utilizando o erro puro para o rendimento em glicose

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(2)	P	Coeficiente
<b>Media</b>	<b>7,883 x10<sup>1</sup></b>	1,487	5,301 x10 <sup>1</sup>	3,560 x10 <sup>-4</sup>	7,883 x10 <sup>1</sup>
<b>(1)Celulase</b>	<b>7,219</b>	1,818	3,971	5,797 x10 <sup>-2</sup>	3,609
<b>Celulase(Q)</b>	<b>-7,736</b>	2,160	-3,581	6,991 x10 <sup>-2</sup>	-3,868
<b>(2)Beta-glicosidase</b>	2,091	1,821	1,148	3,697 x10 <sup>-1</sup>	1,045
<b>Beta-glicosidase(Q)</b>	-6,225	2,168	-2,872	1,029 x10 <sup>-1</sup>	-3,112
<b>1L by 2L</b>	-1,902	2,571	-7,396 x10 <sup>-1</sup>	5,366 x10 <sup>-1</sup>	-9,508 x10 <sup>-1</sup>

Na tabela 6.5 é mostrada a tabela ANOVA para analisar a significância do modelo. Em seguida são apresentadas as duas condições que o teste F deve satisfazer o para que o modelo seja significativo.

$$F_{(\text{regressão calculado})} > F_{(\text{regressão teórico})_{5,5}} = 2,69 > 3,45$$

$$F_{(\text{Falta ajuste calculado})} < F_{(\text{Falta de ajuste teórico})_{3,2}} = 3,56 < 9,16$$

**Tabela 6.5:** Análise de variância (ANOVA) para o modelo completo

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Media Quadrática	Teste F
Regressão (R)	226,49	5	45,30	2,69*
resíduo (r)	84,16	5	16,83	
falta de ajuste (faj)	70,89	3	23,63	3,56**
erro puro (ep)	13,27	2	6,63	
Total (T)	310,65	10		
% variação explicada (R <sup>2</sup> )	52,30			
Máxima variação explicável	95,54			

\* Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

\*\*Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

Ao analisarmos os resultados do teste F obtidos podemos perceber que o valor da segunda condição de regressão é satisfeita, mas o modelo estudado apresenta evidência na regressão, pois não satisfaz a primeira condição. Assim, o modelo que descreve o rendimento de glicose durante a hidrólise do bagaço não pode ser utilizado para calcular as concentrações

ótimas de celulase e  $\beta$ -glicosidase. Observa-se que o coeficiente de determinação é de apenas 52,30%, o que quer dizer que o modelo descreve apenas 52,30% da variação dos dados em torno da média. O comportamento da resposta considerada, rendimento em glicose, em função das concentrações de enzimas é altamente não linear e um modelo polinomial simples como o da equação 6.1 não é capaz de descrevê-lo, sendo necessário um modelo mais complexo.

### **6.3. Conclusões**

No primeiro estudo, quando a concentração de bagaço na hidrólise enzimática foi aumentada, constatou-se que apesar das concentrações de açúcares aumentarem, o rendimento da hidrólise diminuiu com o aumento na carga de sólidos. À medida que a concentração de sólidos é aumentada, a liberação de açúcares na hidrólise enzimática é afetada pela transferência de massa, que ocasiona dificuldade na adsorção das enzimas.

No segundo estudo, quando foi fixada a concentração de sólidos e variada a carga enzimática, foi possível confirmar a necessidade de adicionar  $\beta$ -glicosidase, já que com ela foi possível converter maior quantidade de celobiose presente no meio para glicose, o que diminui o efeito inibitório. Concluiu-se que o aumento das concentrações de celulase e  $\beta$ -glicosidase tiveram efeito positivo até certo ponto, quando um aumento das concentrações resultou em diminuição de rendimento.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Nos próximos trabalhos são sugeridos os seguintes temas:

- Modelagem cinética durante a etapa de hidrólise enzimática usando modelos determinísticos e/ou redes neuronais.
- Caracterização das ligninas e das hemiceluloses obtidas durante a etapa de pré-tratamento com hidróxido de cálcio e determinação de formas possíveis de aproveitamentos destas frações.
- Comparação da cinética de deslignificação do bagaço de cana usando cal obtida neste trabalho com a deslignificação com peróxido de hidrogênio obtida por GARCIA, (2009).
- Quantificação dos compostos inibidores para a fermentação, como o ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.
- Determinação da cinética durante a etapa de fermentação usando como substrato misturas de melaço e de hidrolisado provenientes do pré-tratamento com hidróxido de cálcio.
- Análise de custos e balanços de massa para avaliar a viabilidade do pré-tratamento, para realizar a comparação com diversos pré-tratamentos
- Determinação da cristalinidade durante o processo da hidrólise enzimática para a encontrar uma relação entre o índice de cristalinidade e a digestibilidade da biomassa durante a hidrólise.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AURELL, R. Kraft pulping of birch, Part I. The changes in the composition of the wood residue during the cooking process. *Svensk Papperstidn.* v.67,n.2, p.43-49, 1964

BARROS NETO, B., SCARMIN, I. S, BRUNS, R. E. Como fazer experimentos – pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 2ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

BEGUIN, P., AUBERT, J. P. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.13, p.25-58, 1994.

BELDMAN, G., VORAGEN, A. G. J., ROMBOOTS, F. M., PILNIK, W. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglicanases and exoglicanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 173–178, 1988.

BIDLACK, J., MALONE, M., BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science.* v72, p.51-56, 1992.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Prog. Polym. Sci.* v.19, pp. 797–841, 1994.

BOISSET, C., FRASCHINI, C., LEIN, M., HENRISSAT, B., CHANZY, H. Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A. *Applied and environmental microbiology.* v.66, p.1444-1452, 2000.

BOUSSAID, A., SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme Microbial Technol.*, 24:138-143, 1999.

BREUIL, C., CHAN, M., GILBERT, M., SADDLER, J. Influence of  $\beta$ -glucosidase on the filter paper activity and hydrolysis of lignocellulosic substrate. *Biores. Technol.*, v. 39, p.139-142.

CARRARD, G., KOIVULA, A., SODERLUND, H. Y BEGUIN, P. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.97, p.10342-10347, 2000.

CAULFIELD, DE., MOORE, WE. Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Wood Sci*. v.6, p.375-379, 1974.

CHANG, V. S., BURR, B., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of switchgrass. *Applied Biochem. Biotechnology*. v.63-65, p.3-19, 1997.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.74, p.135–159, 1998.

CHANG, V.S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochem. Biotechnology*. v. 86, p. 5-37, 2000.

CHANG, V. S., NAGWANI, M., KIM, C. H., HOLTZAPPLE, M. T. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.94, p.1–28, 2001.

CHEN, H., HAYN, M., ESTERBAUER, H. Purification and characterization of two extracellular beta-glicosidase from *Trichoderma reesei*. *Biochem. Biophys. Acta*. v.1121, p.54-60, 1992.

CHESF. Fontes energéticas brasileiras - inventário/tecnologia: Bagaço de cana-de-açúcar. Pernambuco, 1987. 438 p.

CHIANG, V.L, YU, J. Isothermal reaction kinetics of Kraft delignification of Douglas-fir. *J. Wood Chem. Technol*. v10, n.3, p 293–310, 1990.

CHUM ,H. L, JOHNSON D. K, BLACK, S., BAKER, J., GROHMANN, K., SARKANEN, K. V. Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: 1. Enzymatic hydrolysis of cellulosic residues. *Biotech Bioeng*. v. 31, p. 643-649, 1988.

CONVERSE, A.O., OPTEJAR, J.D. A synergistic kinetics model for enzymatic cellulose hydrolysis compared to degree-of-synergism experimental results. *Biotechnol Bioeng.* v.42, p.145–148.

COPERSUCAR. Academia do açúcar e do álcool: a cana-de-açúcar. Piracicaba. Disponível em: <[www.copersucar.com.br](http://www.copersucar.com.br)>. Acesso em: 15 nov.2005.

COTLEAR G. Sugarcane juice extraction and preservation, and long-term lime pretreatment of bagasse. Tese Doutorado, Texas A&M University. 2004.

COWARD-KELLY G, AIELLO-MAZZARI C, KIM SEHOON, GRANDA C, HOLTZAPPLE MT. Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulose activity. *Biotech. and Bioeng.* 82(6):745-749. 2003

D ALMEIDA, M. L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: *Celulose e Papel- Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica*. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo. , 2ª. Ed., vol. 1, 1998.

DALE BE, MOREIRA MJ. Freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis. *Biotechnology Bioeng symp.* v.12, p.31, 1982

DATTA R. Energy-requirement for lignocellulose pretreatment processes. *Process Biochem* 16:19-25, 1981.

DE GROOT, B., VAN DAM, J.E.G., VAN 'T RIET, K. Alkaline pulping of hemp woody core: kinetic modeling of lignin, xylan and cellulose extraction and degradation. *Holzforschung* 49(4), p. 332–342. 1995.

DOLK, M., YAN, J.F., MCCARTHY, J.L. Lignin 25. Kinetics of delignification of western Hemlock in flow-through reactors under alkaline conditions. *Holzforschung.* v.43, n.2, p.91-98, 1989

DRAUDE, K.M. DRAUDE, C.B. KURNIAWAN. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. *Bioresour Technol.* V.79, p. 113–120. 2001.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol*, v.55: p.1-33, 1996.

EL-MASRY., H.G. Utilization of Egyptian rice straw in production of cellulases and microbial protein: Effect of various pretreatments on yields and enzyme activity. *Journal of the Science of food and agriculture*, v.34, p. 725-732, 1983.

ESTEGHLALIAN, A., R., BILODEAU, M., MANSFIELD, S.D. Y SADDLER, J.N. Do enzymatic hydrolyzability and Simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes? *Biotechnology Progress* . v.17, p.1049-1054, 2001

FAN LT, LEE YH, BEARDMORE DH. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* v.23, p.419-424, 1981.

FAN LT, LEE Y. H, GHARPURAY, M.M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Adv. Biochem. Eng.* v.23, p.157-187, 1982.

FAN LT, GHARPURAY M.M, LEE Y-H. Cellulose hydrolysis. Berlin: Springer-Verlag. 198 p, 1987.

FENGEL, D., WEGENER, G. *Wood Chemistry ultrastructure Reactions*. Berlín: Walter de Gruyter, 610 p, 1989.

FERNÁNDEZ, J., ACUÑA, L., VILLAR, J.C. La deslignificación del bagazo en digestores de recirculación forzada. *Invest. Tec. Papel* . v.32, n.126, p. 772–784, 1995.

FERRAZ, A., BAEZA, J., RODRIGUEZ, J., FREER, J. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIF spectroscopy and multivariate analysis. *Bioresouce Technology*, v74, p.201, 2000.

GACÉN, J., MAILLO, J. Algodón y celulosa. Estructura y propiedades. Terrasa (España): Universidad Politécnica de Cataluña, 1987.

GAN, Q., ALLEN, S. J., TAYLOR, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochemistry*, 38, 1003-1018, 2003.

GARCIA, D. *Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior*. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Tese de mestrado. 2009.

GARCÍA HORTAL, J.A. Constituyentes Fibrosos de pastas y Papeles. Terrasa (España): Departamento de Ingeniería Textil y Papelera. Especialidad Papelera y Gráfica. (1994).

GHARPURAY, Y.H. LEE and L.T. FAN. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 25, pp. 157–172C, 1983.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. *Pure Appl Chem*, 59:257-268, 1987.

GIERER J. Chemistry of delignification. Part I: general concept and reactions during pulping. *Wood Science and Technology*. v.19, p. 289-312, 1985.

GIERER J, NORÉN I. On the course of delignification during Kraft pulping. *Holzforschung*. v.34, n.6, p.197-200, 1980.

GOLLAPALLI, L. E., DALE, B. E., RIVERS, D. M. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX) treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 98–100, p.23–35, 2002.

GOLDEMBERG, J. The challenge of biofuels. *Energy & Environmental Science*, v. 1, p. 523-525, 2008.

GRABBER, J.H. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Sci*. v.45, p.820–831, 2005.

GUSAKOV, A. V., SINITSYN, A. P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and  $\beta$ -

glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol. Bioeng.*, v.40, p. 663-671, 1992.

HENRISSAT, B., TEERI, T. T. WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyze the polysaccharides in the cell walls of plants. *FEBS Letters*. v.425, p.352-354, 1998.

HENRISSAT, B., DRIGUEZ, H. , VIET, C., SCHÜLEIN, M., Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio. Technology*. v.3 , p.722–726, 1985.

HON, D.N.S. Chemical Modification of Lignocellulosic Materials. New York: *Marceç Dekker*, p 370, 1996.

HOLTZAPPLE MT. Cellulose. In: Macrae R, Robinson R K, Sadler MJ, editors. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition, vol. 2. London: Academic Press. p. 2731-2738. 1993a.

HOLTZAPPLE, M. T. Cellulose, hemicellulose, and lignin. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Saddler, J.M. (Eds.), *Encyclopedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition*. Academic Press, London, p. 2324–2334, 2731–2738, 1993b.

HOLTZAPPLE, M. T., CARAM, H. S., HUMPHREY, A. E. Determining the inhibition constants of the HCH-1 model of cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng*, 26:753-7, 1984.

HOLTZAPPLE, M. T., COGNATA, M., SHU, Y., HENDRICKSON, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* v.36, p.275-287, 1990.

HOLTZAPPLE MT. Hemicellulose. In: Macrae R, Robinson R K, Sadler MJ, editors. Encyclopedia of food science, food technology and nutrition, vol. 2. London: Academic Press. p.2324-2334, 1993b.

HUANG X., PENNER H. M. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulose system. *J. Agric. Food Chem.* v.39, n.11, p. 2096-2100, 2002.

HSU, T. A. Pretreatment of Biomass. In: Wyman, C.E. (Ed.), Handbook on Bioethanol, Production and Utilization. Taylor & Francis, Washington, DC. 1996.

KAAR WE, HOLTZAPPLE MT using lime pretreatment to facilitate the enzymatic hydrolysis of corn stover. Biomass Bioenergy v.18, p.189–199, 2000.

KASTEL'YANOS, O., SINITSYN, A. P., VLASENKO, E. Y. Effects of various factors on the kinetics of cellulose hydrolysis by an enzyme preparation from *Penicillium verruculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 31:425-430, 1995.

KIRK, T. K., CULLEN D. Enzymology and molecular genetics of wood degradation by wood degrading fungi. In: Young, R.A. & Akhtar, M. (eds.): Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, John Wiley & Sons, New York, p. 273-307, 1998.

KIM, S. *Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover*. Texas A&M University. 2004. Tese (Doutorado).

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology*, vol. 96, n° 18, pp.1994-2006, 2005.

KIM, S., HOLTZAPPLE, M. T. Delignification kinetics of corn stover in lime pretreatment. *Biosource Technology*, v. 97, p. 778-785, 2006.

KIRK, T. K, FARRELL R. L. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* v.41, p. 465-505, 1987.

KLYOSOV, A. A., SINITSYN, A. P., RABINOWITCH, M. L. (1980). The comparative role of exoglucosidase and cellobiase in glucose formation from cellulose, In: *Weetall HW, Royer GP, editors. Enzyme Engineering, vol. 5*. New York: Plenum Press, p. 153-165.

KRAULIS, P. J., CLORE, G. M., NILGES, M., JONES, T. A., PETTERSSON, G., KNOWLES, J., GRONEBORN, A. M. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry*, 28:7241-7257, 1989.

LADISCH, M. R., DALE, B. E.; TSAO, G. T. Symposium on fuels and chemicals from biomass introduction. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, p. 1-2, 1983.

LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. *Journal of Biotechnology*. v.56, p.1, 1997

LESOING, G., KLOPFENSTEIN, T., RUSH, I., WARD. Chemical treatment of wheat straw. *J. J. Anim. Sci.* v.51, n.2, p.263–269, 1981

LI, J., MUI, C.. Effect of lignin diffusion on Kraft delignification kinetics as determined by liquor analysis. Part I: an experimental study. *J. Pulp Pap. Sci.* v.25, n.11, p.373–377, p.1999

LU Y, YANG B, GREGG D, SADDLER JN, MANSFIELD SD. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.98-100, p.641-654, 2002.

LYND, L. R, WEIMER, P. J, ZYLWH, V, PRETORIUS I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* v.66, p. 506-577, 2002.

MANSFIELD, S. D., MOONEY, C., SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Prog.*, v.15, p.804-816, 1999.

MATSUMO, R.; TANIGUCHI, M.; TANAKA, M.; KAMIKUBO, T. A model for hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellulase. *Enzyme Engineering*, v. 7, p. 158-160, 1984.

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*. American Chemical Society, Washington, DC, p. 292–324, 1994.

MEDVE, J., KARLSSON, J., LEE, D., TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from

*Trichoderma reesei*: Adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, v.59, p.621-634,1998.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., TOUHY, M. G., SADDLER, J. N. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresource Technology* v.64, p.113-119, 1998

MOONEY, C. A., MANSFIELD, S. D., BEATSON, R. P., SADDLER, J. N. Effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates. *Enzyme Microbial Technol.*, v.25, p. 644-650, 1999.

MOSIER, N., WYMAN, C. E., DALE, B., ELANDER, R., LEE, Y.Y., HOLTZAPPLE, M. T., LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. v.96, n.6, p. 673–686, 2005

MUSSATO SI, ROBERTO IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technol.* v.93, p. 1-10, 2004.

NAGWANI, M. *Calcium hydroxide pretreatment of biomass*. Texas A&M University, 1992. Tese (Doutorado).

National Renewable Energy Laboratory, Golden. Standard Procedure n. 07; preparation of dilute-acid pretreated biomass. HSU, 1995, 2-13 p.

National Renewable Energy Laboratory, HYMAN. Standard Procedure; Determination of acid-soluble lignin concentration curve by UV-VIS spectroscopy, 2-7 p, 2007.

National Renewable Energy Laboratory, TEMPLETON. Standard Procedure n. 01; Determination of total solids in biomass, 1996, 1-9 p.

National Renewable Energy Laboratory, SLUITER. Standard Procedure n. 10; Determination of extractives in biomass, 2005, 1-10 p.

National Renewable Energy Laboratory, GOLDEN. Standard Procedure n. 02; Determination of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography, Ruiz e Ehrman, 1995, p 1-11.

NIDETZKY, B., STEINER, W., HAYN, M., CLAEYSSENS, M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.*, v.298, p.705-710, 1994.

OOSHIMA H, BURNS DS, CONVERSE AO. Adsorption of cellulase from *Trichoderma reesei* on cellulose and lignaceous residue in wood pretreated by dilute sulfuric acid with explosive decompression. *Biotechnol. Bioeng.* v.36, p. 446-452. 1990

OTT, E., SPURLIN, H. M., GRAFFLIN, M. W. Cellulose and Cellulose Derivatives. Part I. 2ª Ed. New York: *Interscience Publishers.* (1963).

PALMQVIST E, HAHN-HÅGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.* v.74, p.25-33, 2000.

PATURAU, J. M. By-products of the cane sugar industry - an introduction to their industrial utilization. 3ª. Ed. Amsterdam, *Elsevier*, p.435, 1989.

PFEIFER PA, BONN G, BOBLETER O. Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces carlsbergensis* W 34. *BiotechLett.* v.6 , n.8, p. 541-546, 1984.

PLAYNE, M. J. Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion. *Biotechnol. Bioeng.* v.26, p. 426-433, 1984.

PURI, V.P. Effect of cristallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. *Bioetchnol. Bioeng.* v.26, p.1219-1222, 1984.

RABELO S, FILHO R, COSTA A. Lime pretreatment of sugarcane for bioethanol production, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008.

RABELO S, FILHO R, COSTA A. A comparison between lime and alkaline hydrogen peroxide pretreatments of sugarcane bagasse for ethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v.148, p. 45-48, 2008.

RABELO, S. *Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.* São Paulo: Escola Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2007. Tese (Mestrado)

RAMOS, L. P., BREUIL, C., KUSHNER, D. J., SADDLER, J. N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalyptus viminalis* wood chips. *Holzforschung* v.46, p.149-154, 1992.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials. *Química Nova*, v.26, p. 863-871, 2003.

RONALD H.W. Microbial Conversion of lignocellulose-derived carbohydrates into Bioethanol and lactic acid. Wageningen University, the Netherlands, 2008. Tese (Doutorado).

ROUVINEN, J.; BERGFORS, T.; TEERI, T.; KNOWLES, C. K. J.; JONES, T. A. Three dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science*, v. 249, p. 380-386, 1990.

SABATIER, J., PENICHE, C., FERNANDEZ, N. Soda pulping of bagasse: delignification phases and kinetics. *Holzforschung*. v. 47, n. 4, p. 313–317. 1993.

SAHA, B.C., COTTA, M.A. Fuel ethanol production from crop residues and processing Fuel ethanol production from agricultural residues: current status and future prospects *Journal of Biotechnology*, 2008

SATTLER, W.; ESTERBAUER, H.; GLATTER, O.; STEINER, W. The effect of enzyme concentration on the rate of hydrolysis of cellulose, *Biotechnol. Bioeng.*, v. 33, p. 1221-1234, 1989.

SCALLAN, A.M. A quantitative picture of the fringed micellar model of cellulose. *Textile Research Journal*, 41(8): 647-653, 1971.

SCHWALD, W., BROWNELL, H. H., SADLER, J.N., 1988. Enzymatic hydrolysis of steam treated aspen wood: Influence of partial hemicellulose and lignin removal prior to pretreatment. *J. Wood Chem. Tech.* v.8, n.4, p. 543-560.

SCHLITTLER, L. A. F. S. *Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar*. Rio Janeiro: Escola de Química, Universidade Federal do Rio Janeiro, 2006. Tese (Mestrado)

SCHUERCH, C. The hemicelluloses In: Browing, B.L; The chemistry of Wood. New York: interscience, 1963.

SCHUCHARDT, U., RIBEIRO, M. L., GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: Como substituir o petróleo como matéria prima. *Química Nova*, v. 24, n.2, p. 247 –251, 2001.

SEGAL, L., CREELY, J. J., MARTIN, A. E., CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-e diffractometer. *Textile Research Journal*, v. 29, p.786-764, 1959.

SEGEL, L.H. *Biochemical Calculations*. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley, New York 1975.

SEWALT V., GLASSER W., BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. *J Agri. Food Chem.*, v.45, p.1823–1828, 1997.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R., SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D. Determination of Total Solids in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-6, 2005.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review Department of Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University, Raleigh, 2001.

TANAHASHI, M., TAKADA, S., AOKI., GOTO, T., HIGUCHI, T., HANAI, S. Characterization of explosion wood.1. Structure and physical properties. *Wood Research*, v.9, p 36-31. 1983.

TEERI, T. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotech.*, v.15, p.160-167, 1997.

TEMPLETON, D., EHRMAN, T. Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass. *National Renewable Energy Laboratory (NREL)*, 1-14, 1995.

TEYMOURI, F., PERES, L., ALIZADEH H, DALE, BE. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource technology*. v.96, p.2014, 2006.

THOMPSON DN, CHEN HC. Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area. *Biores. Techno.* v.39, p.155-163. 1992.

UNICA - União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Safra de cana-de-açúcar 2008/09. Projeções apontam para crescimento de 16% no volume de cana colhida, com 32 novas usinas entrando em operação na região centro-sul ao longo da safra, disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=21696>. Acesso em: 10-02-2009.

UNICA-União da Indústria de Cana-de-açúcar e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA. Produção de açúcar do Brasil. Disponível em: <http://www.unica.com.br/downloads/estatisticas/processcanabrasil.xls>. Acesso em: 22-03-2009.

VERMA, M. L. Practical aspects of treatment of crop residues. In The utilization of fibrous agricultural residues, Pearce, G. R., ed. Australian Government Publishing Service, Canberra, A.C.T., p. 85-99, 1983.

VIDAL PF, MOLINIER J. Ozonolysis of lignin-improvement of *in vitro* digestibility of poplar sawdust. *Biomass* v.16, p.1-17. 1988.

TRAN AV, CHAMBERS RP. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolyzate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. *Enz. Microbiol. Tech.* v.8, n.7, p. 439-444, 1986.

WALKER, L. P., WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, v.36, p.3-14, 1991.

WOODWARD, J., HAYES, M.K. and LEE, N.E. *Bio/Tecnology*. v.6, p.301-304, 1988.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M.. Methods for measuring cellulase activities. In W. A. WOOD, S. T.; KELLOG. *Methods in enzymology*. California: Academic Press, 1988, v. 160, p. 87-116.

WYMAN, C. E., *Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities and Commercial Challenges*, *Annu. Rev. Energy Environ.*, v.24, p.189-226, 1999.

ZHENG Y., PAN Z., ZHANG R., LABAVITCH, J., WANG, D. Adsorption characteristics of cellulose and  $\beta$ -glucosidase to lignin, cellulose and pretreated creeping wild ryegrass. *Annual International Meeting Sponsored by ASABE*. 2007

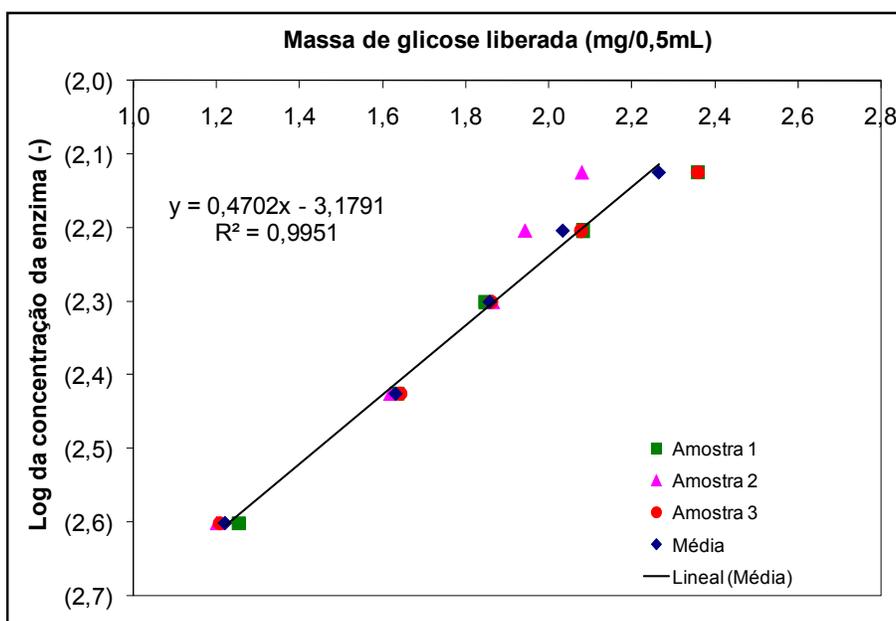
ZHU LI. *Fundamental study of structural features affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass*. Texas A&M University. 2005. Tese(Doutorado).

## ANEXOS

## ANEXO A

## Determinação da Atividade Enzimática da Celulase

A atividade da celulase Novozyme nos experimentos foi determinada com a metodologia descrita no item 3.5.1 com o fim de conhecer a concentração de enzima inicial das enzimas. A figura A.1 apresenta a correlação dos dados obtidos na determinação da atividade da celulase.



**Figura A.1.** Gráfico da concentração da enzima em cada diluição em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL da enzima diluída em condições reacionais pré-determinadas.

Pela Equação 3.8 mostrada na seção 3.5.1, observando-se a Figura A.1 e a equação da reta encontrada, calculou-se a atividade apresentada pela enzima celulase.

$$\log[\text{enzima}] = -2,2387$$

$$[\text{enzima}] = 5,7717 \times 10^{-3}$$

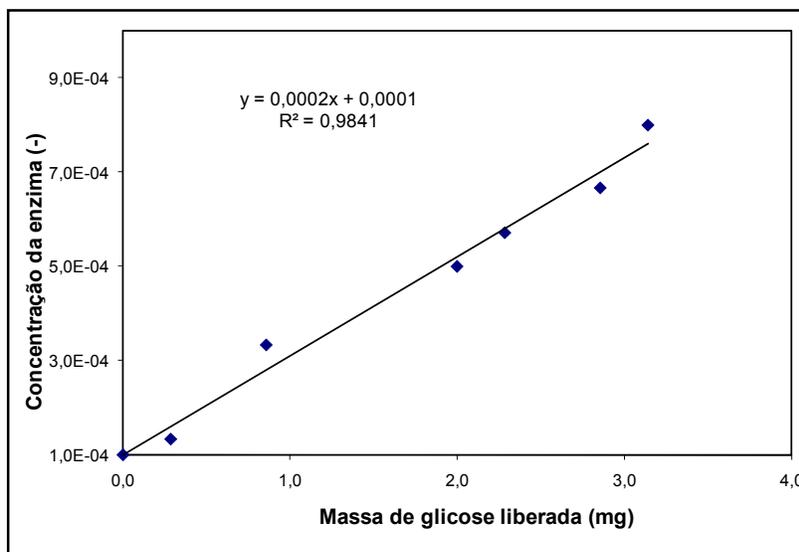
$$\frac{FPU}{mL} = \frac{0,037}{[\text{enzima diluída}]} = \frac{0,037}{5,7717 \times 10^{-3}} = 64,106 \text{ FPU/mL}$$

O valor encontrado para a atividade da celulase foi de 64,106 FPU/mL e passou a ser adotado para que fosse possível encontrar o volume de enzima a ser empregado na etapa de hidrólise enzimática.

## ANEXO B

Determinação da Atividade Enzimática da  $\beta$ -glicosidase

A atividade da  $\beta$ -glicosidase da Novozyme foi determinada com a metodologia descrita no item 3.5.2 com o fim de conhecer a concentração de enzima inicial da enzima. A figura B.1 apresenta a correlação dos dados obtidos na determinação da atividade da celulase.



**Figura B.2:** Gráfico da concentração da enzima em cada diluição em função da massa de glicose liberada por 1,0 mL da enzima diluída em condições reacionais pré-determinadas.

Pela Equação 3.9 mostrada na seção 3.5.2, observando-se a Figura B.2 e a equação da reta encontrada, calculou-se a atividade apresentada pela enzima celulase.

$$[\text{enzima}] = 0,0002 \times (\text{massa de glicose liberada}) + 0,0001$$

$$[\text{enzima}] = 0,0002 \times (1,0) + 0,0001$$

$$[\text{enzima}] = 0,0003$$

Com o valor da concentração da enzima, pode-se calcular a atividade enzimática da enzima  $\beta$ -glicosidase através da Equação 3.9.

$$\text{Atividade da } \beta\text{-glicosidase} = \frac{0,5}{0,1816 * 1,0 * 30 * 0,0003} = 308,92 \text{ CBU/L}$$

**ANEXO C**  
**DADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ART E GLICOSE DO PRIMEIRO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL**

**Tabela C.1.** Dados de concentração de glicose(g/L) da hidrólise enzimática do primeiro planejamento composto central

Tempo (h)	Glicose(g/L)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,084	0,084	0,098	0,084	0,084	0,178	0,178	0,124	0,084	0,071	0,084	0,084	0,084	0,071	0,102±0,008
3	0,204	0,204	0,191	0,204	0,231	0,231	0,191	0,191	0,164	0,244	0,191	0,178	0,178	0,151	0,186±0,020
6	0,257	0,297	0,310	0,297	0,297	0,297	0,350	0,297	0,244	0,257	0,297	0,284	0,257	0,231	0,301±0,020
12	0,404	0,483	0,510	0,576	0,483	0,510	0,590	0,497	0,483	0,443	0,443	0,497	0,470	0,457	0,509±0,000
24	0,550	0,656	0,696	0,736	0,723	0,736	0,789	0,876	0,536	0,696	0,590	0,762	0,616	0,656	0,691±0,015
36	0,643	0,776	0,842	0,935	0,842	0,802	0,975	1,042	0,683	0,909	0,802	0,988	0,829	0,882	0,815±0,093
48	0,643	0,776	0,816	1,068	0,776	0,842	1,055	1,055	0,709	0,909	0,802	0,988	0,855	0,855	0,873±0,050
60	0,669	0,776	0,776	1,065	0,816	0,829	1,042	1,055	0,643	0,975	0,749	1,042	0,816	0,829	0,873±0,061
72	0,629	0,749	0,789	1,045	0,816	0,882	1,002	1,055	0,656	0,988	0,749	1,042	0,842	0,842	0,864±0,047

**Tabela C.2.** Dados de concentração de ART(g/L) da hidrólise enzimática do primeiro planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	ART(g/L)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,162	0,192	0,276	0,227	0,206	0,184	0,203	0,139	0,090	0,085	0,158	0,095	0,115	0,103	0,212±0,032
3	0,560	0,703	0,746	0,690	0,700	0,675	0,732	0,633	0,435	0,433	0,651	0,571	0,538	0,454	0,697±0,107
6	0,644	0,817	0,920	0,972	0,864	0,904	0,994	0,824	0,616	0,709	0,867	0,861	0,684	0,672	0,912±0,022
12	0,876	0,986	1,049	1,234	1,015	1,007	1,319	1,437	0,806	1,177	1,003	1,274	1,020	1,139	1,280±0,014
24	0,978	1,136	1,290	1,394	1,166	1,217	1,517	1,538	0,875	1,373	1,051	1,587	1,265	1,057	1,173±0,046
36	1,115	1,232	1,583	1,584	1,306	1,373	1,703	1,775	1,042	1,517	1,230	1,919	1,506	1,404	1,436±0,070
48	1,275	1,378	1,836	1,672	1,466	1,491	1,796	1,997	1,197	1,703	1,306	2,152	1,626	1,605	1,642±0,126
60	1,255	1,428	1,794	1,784	1,517	1,658	1,888	1,961	1,208	1,841	1,407	2,165	1,618	1,648	1,865±0,053
72	1,281	1,454	1,784	1,721	1,543	1,621	1,836	1,988	1,213	1,757	1,391	2,069	1,608	1,616	1,745±0,093

**Tabela C.3.** Concentração de glicose(g/g biomassa seca) durante a hidrólise enzimática do primeiro planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	Glicose (g/g biomassa seca)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,018	0,018	0,020	0,017	0,018	0,037	0,035	0,024	0,016	0,014	0,019	0,016	0,018	0,015	0,019±0,004
3	0,045	0,045	0,040	0,041	0,050	0,048	0,038	0,037	0,032	0,049	0,042	0,035	0,038	0,031	0,038±0,007
6	0,056	0,065	0,064	0,059	0,064	0,062	0,070	0,058	0,047	0,052	0,066	0,055	0,055	0,047	0,059±0,011
12	0,088	0,105	0,106	0,114	0,105	0,107	0,118	0,096	0,093	0,089	0,098	0,097	0,101	0,094	0,098±0,018
24	0,120	0,143	0,145	0,146	0,156	0,154	0,157	0,170	0,103	0,140	0,130	0,148	0,132	0,135	0,131±0,024
36	0,140	0,169	0,175	0,186	0,182	0,168	0,194	0,202	0,131	0,183	0,177	0,192	0,177	0,181	0,152±0,041
48	0,140	0,169	0,169	0,212	0,168	0,176	0,210	0,205	0,136	0,183	0,177	0,192	0,183	0,176	0,162±0,034
60	0,146	0,169	0,161	0,212	0,177	0,174	0,208	0,205	0,123	0,197	0,165	0,203	0,175	0,171	0,162±0,036
72	0,137	0,163	0,164	0,208	0,177	0,185	0,200	0,205	0,126	0,199	0,165	0,203	0,180	0,173	0,163±0,035

**Tabela C.4.** Concentração de ART(g/g biomassa seca) durante a hidrólise enzimática do primeiro planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	ART(g/g biomassa seca)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,049	0,042	0,057	0,045	0,045	0,038	0,041	0,027	0,017	0,017	0,035	0,018	0,025	0,021	0,044±0,006
3	0,168	0,153	0,155	0,137	0,152	0,141	0,146	0,123	0,083	0,087	0,144	0,111	0,115	0,093	0,147±0,026
6	0,193	0,178	0,191	0,193	0,187	0,189	0,198	0,160	0,118	0,143	0,191	0,168	0,146	0,138	0,192±0,010
12	0,263	0,215	0,218	0,245	0,220	0,211	0,263	0,279	0,155	0,237	0,221	0,248	0,218	0,234	0,270±0,010
24	0,294	0,248	0,268	0,277	0,252	0,255	0,302	0,299	0,168	0,277	0,232	0,309	0,271	0,217	0,247±0,008
36	0,334	0,269	0,329	0,315	0,283	0,287	0,340	0,345	0,200	0,306	0,271	0,373	0,322	0,289	0,302±0,009
48	0,382	0,300	0,381	0,332	0,317	0,312	0,358	0,388	0,230	0,344	0,288	0,419	0,348	0,330	0,346±0,018
60	0,377	0,311	0,373	0,354	0,328	0,347	0,376	0,381	0,232	0,371	0,310	0,421	0,346	0,339	0,393±0,011
72	0,384	0,317	0,370	0,342	0,334	0,340	0,366	0,386	0,233	0,354	0,307	0,403	0,34	0,332	0,368±0,029

## ANEXO D

## DADOS DAS CONCENTRAÇÕES DE ART E GLICOSE DO SEGUNDO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL

Tabela D.1. Dados de concentração de glicose(g/L) da hidrólise enzimática do segundo planejamento composto central

Ensaio/ Tempo (h)	Glicose(g/L)														Pontos centrias
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,033	0,033	0,033	0,047	0,033	0,047	0,033	0,033	0,061	0,047	0,033	0,047	0,033	0,061	0,056±0,008
3	0,170	0,198	0,170	0,157	0,225	0,157	0,239	0,157	0,252	0,211	0,198	0,184	0,184	0,211	0,211±0,014
6	0,239	0,225	0,239	0,252	0,266	0,225	0,294	0,143	0,280	0,307	0,239	0,294	0,225	0,198	0,238±0,027
12	0,609	0,568	0,540	0,581	0,691	0,677	0,650	0,527	0,595	0,636	0,581	0,636	0,609	0,650	0,649±0,024
24	0,883	0,856	0,897	0,787	0,993	0,951	0,993	0,938	0,787	0,993	0,883	0,869	0,856	0,993	0,951±0,014
36	0,924	0,869	0,869	0,883	1,061	1,088	1,006	1,034	0,897	1,075	1,047	0,951	0,965	1,020	1,051±0,008
48	0,957	0,951	0,951	0,897	1,088	1,157	1,102	1,102	0,938	1,102	1,102	0,979	0,897	1,130	1,080±0,090
60	0,979	0,910	1,006	0,897	1,075	1,212	1,034	1,184	0,979	1,198	1,034	1,006	0,910	1,171	1,143±0,060
72	1,006	0,924	1,006	0,951	1,088	1,198	1,116	1,184	0,965	1,088	1,034	1,006	0,910	1,170	1,129±0,063

**Tabela D.2.** Dados de concentração de ART(g/L) da hidrólise enzimática do segundo planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	ART(g/L)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,103	0,155	0,082	0,113	0,143	0,104	0,149	0,087	0,162	0,124	0,132	0,108	0,079	0,106	0,124±0,024
3	0,402	0,451	0,359	0,391	0,491	0,375	0,482	0,285	0,507	0,427	0,343	0,417	0,372	0,368	0,431±0,007
6	0,800	0,766	0,704	0,783	0,977	0,820	0,943	0,649	0,840	0,934	0,746	0,837	0,775	0,812	0,897±0,036
12	1,177	1,187	1,139	1,139	1,414	1,282	1,400	1,087	1,097	1,367	1,206	1,196	1,125	1,248	1,325±0,032
24	1,391	1,395	1,353	1,320	1,718	1,585	1,561	1,514	1,320	1,628	1,509	1,405	1,301	1,571	1,572±0,022
36	1,652	1,694	1,727	1,647	1,979	2,002	1,912	1,941	1,628	2,088	1,941	1,737	1,756	1,993	1,907±0,066
48	1,723	1,708	1,765	1,685	2,026	2,031	1,931	1,969	1,609	2,097	1,988	1,689	1,742	2,012	1,864±0,017
60	1,765	1,775	1,822	1,777	2,031	2,149	2,002	2,145	1,585	1,941	2,078	1,689	1,836	2,045	1,981±0,081
72	1,751	1,794	1,784	1,794	1,983	2,064	2,059	2,135	1,666	2,040	2,107	1,699	1,846	2,036	1,885±0,108

**Tabela D.3.** Concentração de glicose (g/g biomassa seca) durante a hidrólise enzimática do segundo planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	Glicose(g/g biomassa seca)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,006	0,006	0,006	0,009	0,006	0,008	0,006	0,005	0,012	0,008	0,006	0,009	0,006	0,010	0,010±0,001
3	0,032	0,037	0,032	0,030	0,042	0,027	0,045	0,025	0,049	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,040±0,002
6	0,046	0,042	0,045	0,049	0,050	0,038	0,055	0,023	0,055	0,052	0,043	0,058	0,044	0,034	0,045±0,006
12	0,116	0,105	0,102	0,113	0,129	0,116	0,122	0,085	0,116	0,107	0,105	0,126	0,119	0,111	0,124±0,002
24	0,168	0,159	0,169	0,153	0,185	0,163	0,186	0,152	0,154	0,167	0,160	0,172	0,167	0,170	0,182±0,004
36	0,176	0,161	0,164	0,172	0,198	0,186	0,188	0,168	0,175	0,181	0,190	0,189	0,188	0,174	0,201±0,002
48	0,182	0,177	0,179	0,175	0,203	0,198	0,206	0,179	0,183	0,186	0,199	0,194	0,175	0,193	0,208±0,017
60	0,187	0,169	0,190	0,175	0,200	0,207	0,193	0,192	0,191	0,202	0,187	0,199	0,178	0,200	0,219±0,010
72	0,192	0,171	0,190	0,185	0,203	0,205	0,209	0,192	0,189	0,183	0,187	0,199	0,178	0,200	0,216±0,011

**Tabela D.4.** Concentração de ART(g/g biomassa seca) durante a hidrólise enzimática do segundo planejamento composto central

Ensaio/ Tempo(h)	ART(g/g biomassa seca)														Pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
1	0,020	0,029	0,015	0,022	0,027	0,018	0,028	0,014	0,032	0,021	0,024	0,021	0,015	0,018	0,023±0,005
3	0,077	0,084	0,068	0,076	0,091	0,064	0,090	0,046	0,099	0,072	0,062	0,083	0,073	0,063	0,079±0,003
6	0,153	0,142	0,133	0,153	0,182	0,140	0,176	0,105	0,164	0,157	0,135	0,166	0,151	0,139	0,166±0,013
12	0,224	0,220	0,215	0,222	0,264	0,219	0,262	0,176	0,214	0,230	0,218	0,237	0,220	0,213	0,245±0,012
24	0,265	0,259	0,255	0,257	0,320	0,271	0,292	0,246	0,258	0,274	0,273	0,278	0,254	0,269	0,290±0,013
36	0,315	0,314	0,326	0,321	0,369	0,342	0,358	0,315	0,318	0,352	0,351	0,344	0,343	0,341	0,352±0,001
48	0,328	0,317	0,333	0,328	0,378	0,347	0,361	0,320	0,314	0,354	0,360	0,335	0,340	0,344	0,344±0,009
60	0,336	0,329	0,344	0,346	0,379	0,367	0,375	0,348	0,310	0,327	0,376	0,335	0,358	0,350	0,366±0,001
72	0,334	0,333	0,337	0,349	0,370	0,353	0,385	0,346	0,326	0,344	0,381	0,337	0,360	0,348	0,348±0,009

**ANEXO E**  
**OBTENÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA DESLIGNIFICAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO COM  $\text{Ca}(\text{OH})_2$**

**Tabela E.1.** Dados de deslignificação do bagaço de cana a 60 °C

Temperatura 60°C, Composição (g/100 g biomassa pré-tratada)				
Tempo(h)	Lignina Klason	Lignina solúvel	Glicana	Xilana
0	24,47±0,48	1,72±0,03	37,35±0,51	23,33±0,88
24	22,16±0,57	1,46±0,03	36,98±0,69	22,58±0,18
48	21,04±0,85	1,45±0,04	36,92±0,58	22,57±0,52
60	19,26±0,02	1,42±0,03	35,96±0,89	21,08±0,81
72	17,94±0,82	1,34±0,03	35,87±0,22	20,09±0,11
84	17,60±0,50	1,30±0,02	35,50±0,73	19,89±0,65
96	16,53±0,82	1,26±0,03	34,96±0,22	18,72±0,42
108	16,52±0,29	1,27±0,02	34,65±0,25	18,50±0,88

**Tabela E.2.** Dados de deslignificação do bagaço de cana a 70 °C

Temperatura 70°C, Composição (g/100 g biomassa pré-tratada)				
Tempo(h)	Klason	Solúvel	Glicana	Xilana
0	24,47±0,48	1,72±0,04	37,35±0,51	23,65±0,88
24	21,22±0,20	1,34±0,02	36,79±0,62	21,89±0,36
48	19,10±0,77	1,30±0,12	36,40±0,12	19,40±0,26
60	18,19±0,46	1,27±0,00	36,04±0,38	18,24±0,56
72	17,01±0,49	1,21±0,08	35,98±0,38	16,26±0,031
84	16,01±0,39	1,17±0,04	35,50±0,27	14,09±0,16
96	15,69±0,78	1,07±0,03	35,06±0,14	13,73±0,30
108	15,07±0,51	1,07±0,03	34,54±1,78	12,25±0,49

**Tabela E.3.** Dados de deslignificação do bagaço de cana a 80 °C

Temperatura 80 °C, Composição (g/100 g biomassa pré-tratada)				
Tempo(h)	Klason	Solúvel	Glicana	Xilana
0	24,47±0,48	1,72±0,04	37,35±0,51	23,65±0,88
24	19,96±0,15	1,19±0,04	36,08±0,62	21,89±0,40
48	16,68±0,36	1,15±0,04	35,95±0,12	19,60±0,14
60	15,19±0,29	1,12±0,05	35,45±0,38	17,54±0,17
72	13,91±0,86	1,09±0,02	35,21±0,27	15,40±0,36
84	12,39±0,29	0,96±0,02	35,18±0,14	13,29±0,10
96	11,61±0,55	0,94±0,02	35,1162777	12,53±0,73
108	11,35±0,43	0,92±0,01	34,99±0,14	12,45±0,78

**Tabela E.4.** Dados de deslignificação do bagaço de cana a 90°C

Temperatura 90 °C, Composição (g/100 g biomassa pré-tratada)				
Tempo (h)	Klason	Solúvel	Glicana	Xilana
0	24,47±0,48	1,72±0,04	37,35±0,51	23,65±0,88
24	18,34±0,17	0,99±0,01	35,94±0,82	20,95±0,59
48	14,65±0,67	0,97±0,02	35,76±0,40	18,25±0,29
60	12,60±0,36	0,95±0,02	35,56±0,51	16,23±0,52
72	11,26±0,73	0,86±0,01	35,48±0,23	14,13±0,31
84	10,23±0,39	0,80±0,02	35,39±0,28	13,56±0,48
96	9,49±0,50	0,76±0,02	35,29±0,28	12,78±0,11
108	9,10±0,38	0,66±0,00	34,21±0,37	12,59±0,17

**Tabela E.5.** Massa perdida das holoceluloses durante a deslignificação

Tempo (h)	Perda de massa de Holoceluloses(xilana+glicana)			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
0	0,000	0,000	0,000	0,000
24	1,127	2,011	2,723	3,799
48	1,193	4,883	5,138	6,679
60	3,645	6,412	7,693	8,893
72	4,727	8,444	10,078	11,076
84	5,300	11,092	12,218	11,742
96	7,012	11,899	13,048	12,617
108	7,536	13,898	13,252	13,885

**Tabela E.6.** Massa perdida da Lignina Klason durante a deslignificação

Tempo(h)	Perda de massa da Lignina Klason			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
0	0,000	0,000	0,000	0,000
24	2,313	3,248	4,507	6,128
48	3,429	5,366	7,782	9,817
60	5,212	6,279	9,279	11,867
72	6,526	7,452	10,560	13,206
84	6,869	8,451	12,072	14,234
96	7,939	8,779	12,851	14,980
108	7,950	9,397	13,118	15,367

**Tabela E.7.** Conversão da lignina total durante a deslignificação do bagaço com hidróxido de cálcio

Tempo(h)	Conversão de Lignina Total			
	60 °C	70 °C	80 °C	90 °C
0	0,000	0,000	0,000	0,000
24	9,816	13,859	19,223	26,176
48	14,127	22,075	31,872	40,345
60	21,027	25,676	37,702	48,257
72	26,351	30,377	42,655	53,707
84	27,832	34,342	48,992	57,849
96	32,067	36,003	52,045	60,856
108	32,073	38,368	53,142	62,696

**Tabela E.8.** Conversão da lignina Klason durante a deslignificação do bagaço com hidróxido de cálcio

Tempo	Conversão de Lignina Klason			
	60°C	70°	80°C	90°C
0	0,000	0,000	0,000	0,000
24	9,454	13,275	18,416	25,043
48	14,011	21,931	31,800	40,118
60	21,299	25,660	37,919	48,496
72	26,671	30,455	43,154	53,970
84	28,071	34,535	49,333	58,171
96	32,446	35,877	52,515	61,217
108	32,489	38,400	53,608	62,800

**ANEXO F**  
**DETERMINAÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM VARIAÇÃO NA CARGA DE SÓLIDOS**

**Tabela F.1.** Concentração de celobiose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Conc. Sólidos/ Tempo(min)	Celobiose (g/L)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
10	0,136±0,029	0,194±0,004	0,185±0,048	0,142±0,034	0,186±0,049
20	0,258±0,025	0,228±0,019	0,297±0,025	0,289±0,052	0,310±0,053
30	0,320±0,022	0,377±0,018	0,548±0,049	0,462±0,056	0,392±0,060
40	0,351±0,033	0,374±0,006	0,624±0,022	0,659±0,091	0,469±0,041
50	0,339±0,027	0,409±0,019	0,656±0,032	0,725±0,095	0,497±0,041
60	0,305±0,148	0,475±0,000	0,763±0,016	0,806±0,042	0,599±0,023
180	0,437±0,006	0,590±0,023	0,987±0,006	1,240±0,023	1,315±0,071
360	0,501±0,027	0,825±0,029	1,382±0,061	1,694±0,235	2,320±0,028
720	0,445±0,071	0,763±0,009	1,418±0,033	1,753±0,207	2,440±0,046
1440	0,297±0,004	0,631±0,072	2,313±0,003	3,002±0,413	2,868±0,013
2160	0,250±0,029	0,569±0,011	1,902±0,000	3,053±0,254	4,252±0,012
2880	0,260±0,081	0,441±0,017	1,000±0,054	2,805±0,217	3,906±0,015
3600	0,285±0,130	0,400±0,012	0,868±0,016	1,526±0,212	3,630±0,069
4320	0,230±0,139	0,352±0,016	0,712±0,024	1,393±0,174	3,750±0,030

**Tabela F.2.** Concentração de glicose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Conc. Sólidos/ Tempo(min)	Glicose (g/L)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
10	0,644±0,028	0,839±0,063	0,631±0,076	0,604±0,030	0,731±0,195
20	1,107±0,082	1,201±0,094	1,025±0,049	0,989±0,128	1,049±0,207
30	1,574±0,130	1,781±0,056	1,710±0,053	1,597±0,151	1,397±0,261
40	1,998±0,219	2,060±0,029	2,323±0,043	2,291±0,360	1,815±0,392
50	2,133±0,157	2,425±0,082	2,551±0,139	2,763±0,341	2,060±0,502
60	2,355±0,082	2,930±0,025	3,162±0,067	3,275±0,293	2,444±0,348
180	3,956±0,062	5,385±0,137	6,558±0,137	7,765±0,249	6,437±0,131
360	5,765±0,051	8,894±0,330	11,119±0,579	13,259±0,626	9,797±0,070
720	6,332±0,275	9,414±0,329	13,105±0,466	15,414±0,933	16,085±0,518
1440	6,330±0,073	10,852±0,753	15,270±0,653	17,248±0,320	21,091±0,540
2160	6,622±0,043	11,495±0,292	16,449±0,685	20,748±0,165	25,227±0,077
2880	6,525±0,080	11,077±0,649	16,429±0,618	21,365±0,175	24,720±0,681
3600	6,556±0,816	12,017±0,218	16,338±0,039	21,900±0,736	25,233±0,213
4320	6,388±0,382	11,340±0,650	16,563±0,559	22,804±0,172	25,203±0,573

**Tabela F.3.** Concentração de xilose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Conc. Sólidos/ Tempo(min)	Xilose (g/L)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0000	0,000±0,000	0,000±0,000
10	0,472±0,049	1,005±0,029	0,322±0,134	0,287±0,064	0,436±0,351
20	1,106±0,025	1,198±0,164	0,723±0,141	0,608±0,163	0,637±0,238
30	1,340±0,048	1,447±0,041	1,114±0,078	0,961±0,167	0,697±0,215
40	1,370±0,075	1,488±0,058	1,190±0,069	1,125±0,242	0,728±0,247
50	1,381±0,136	1,618±0,306	1,127±0,125	1,142±0,193	0,921±0,249
60	1,421±0,044	1,694±0,058	1,242±0,026	1,235±0,131	0,974±0,232
180	1,487±0,021	1,667±0,008	1,796±0,022	1,973±0,045	1,579±0,361
360	1,960±0,043	2,375±0,106	2,618±0,153	2,936±0,094	3,069±0,023
720	2,030±0,028	2,318±0,099	2,802±0,111	3,150±0,164	3,170±0,196
1440	1,972±0,196	2,603±0,101	3,333±0,349	3,343±0,390	3,880±0,250
2160	2,046±0,118	2,768±0,033	3,480±0,166	4,184±0,156	4,690±0,103
2880	2,098±0,063	2,720±0,175	3,426±0,220	4,200±0,168	4,749±0,236
3600	2,164±0,177	2,836±0,098	3,565±0,304	4,628±0,394	4,821±0,414
4320	2,167±0,101	2,880±0,249	3,564±0,132	4,606±0,413	5,168±0,194

**Tabela F.4.** Concentração de arabinose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Conc. Sólidos/ Tempo(min)	Arabinose (g/L)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
10	0,132±0,000	0,159±0,007	0,132±0,000	0,132±0,000	0,132±0,000
20	0,163±0,002	0,166±0,000	0,153±0,018	0,150±0,016	0,152±0,018
30	0,176±0,003	0,189±0,003	0,191±0,003	0,167±0,031	0,170±0,012
40	0,190±0,010	0,193±0,002	0,210±0,002	0,209±0,017	0,184±0,018
50	0,182±0,006	0,200±0,003	0,218±0,005	0,223±0,016	0,191±0,025
60	0,186±0,031	0,211±0,004	0,236±0,001	0,239±0,010	0,215±0,024
180	0,225±0,001	0,277±0,004	0,339±0,001	0,387±0,004	0,397±0,057
360	0,285±0,002	0,375±0,008	0,470±0,027	0,548±0,014	0,623±0,000
720	0,306±0,009	0,384±0,012	0,501±0,012	0,576±0,032	0,650±0,039
1440	0,316±0,021	0,407±0,002	0,570±0,023	0,604±0,053	0,714±0,017
2160	0,329±0,014	0,463±0,004	0,626±0,023	0,745±0,025	0,874±0,033
2880	0,333±0,005	0,468±0,018	0,627±0,033	0,750±0,033	0,853±0,011
3600	0,369±0,027	0,492±0,005	0,650±0,061	0,799±0,083	0,913±0,069
4320	0,351±0,028	0,515±0,031	0,641±0,037	0,804±0,058	0,923±0,056

**Tabela F.5.** Rendimento de glicose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Con. Sólidos/ Tempo(min)	Rendimento de Glicose (%)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	9,61	6,27	3,14	2,26	2,19
20	16,53	8,97	5,11	3,70	3,13
30	23,50	13,30	8,51	5,96	4,17
40	29,82	15,38	11,57	8,56	5,42
50	31,83	18,11	12,70	10,32	6,16
60	35,16	21,88	15,74	12,23	7,30
180	59,04	40,21	32,64	29,00	19,23
360	86,04	66,41	55,35	49,51	29,26
720	94,49	70,30	65,23	57,56	48,05
1440	94,46	81,03	76,01	64,41	63,00
2160	98,81	85,83	81,88	77,48	75,36
2880	97,37	82,71	81,78	79,78	73,84
3600	97,84	89,73	81,32	81,78	75,37
4320	95,33	84,68	82,44	85,16	75,28

**Tabela F.6.** Rendimento de xilose durante a hidrólise enzimática a diferentes concentrações de sólidos

Conc. Sólidos/ Tempo(min)	Rendimento de Xilose (%)				
	1%	2%	3%	4%	5%
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	15,97	16,99	3,63	2,43	2,95
20	37,39	20,27	8,15	5,15	4,32
30	45,32	24,47	12,56	8,13	4,72
40	46,34	25,16	13,42	9,52	4,93
50	46,68	27,37	12,71	9,66	6,23
60	48,05	28,64	14,01	10,45	6,59
180	50,18	28,19	20,25	16,69	10,69
360	66,26	40,17	29,51	24,84	20,77
720	68,63	39,20	31,60	26,65	21,45
1440	66,68	44,01	37,58	28,28	26,25
2160	69,18	46,81	39,24	35,39	31,73
2880	70,92	46,00	38,63	35,53	32,14
3600	73,15	47,96	40,19	39,15	32,62
4320	73,24	48,71	40,18	38,97	34,97

**ANEXO G**  
**DETERMINAÇÃO DE DADOS CINÉTICOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA COM VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA**

**Tabela G.1.** Concentração de celobiose (g/L) durante a hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

Ensaio/ Tempo(h)	Celobiose (g/L)								pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
10	0,919	0,079	1,171	1,299	0,079	1,190	0,889	0,881	0,908±0,056
20	0,938	1,810	1,468	1,674	0,079	1,665	1,110	1,238	1,236±0,052
30	1,096	2,128	1,787	1,986	1,146	1,912	1,327	1,456	1,268±0,213
40	1,108	1,285	2,008	2,289	1,620	2,228	1,607	2,834	1,654±0,062
50	1,490	2,408	2,445	3,789	0,079	2,479	1,782	2,651	3,123±0,129
60	1,272	2,438	2,658	3,924	1,221	3,976	3,055	3,293	3,296±0,297
180	1,903	3,426	4,550	4,444	2,261	4,891	4,409	4,179	4,352±0,107
360	3,783	3,760	1,384	4,240	2,462	4,377	5,909	4,067	4,254±0,109
720	3,420	3,173	2,309	2,094	2,573	2,273	5,282	3,103	3,277±0,189
1440	2,338	2,672	1,568	1,249	2,598	1,293	5,693	1,568	1,627±0,061
2160	2,568	2,349	1,853	1,889	2,337	2,001	5,723	1,817	1,721±0,070
2880	2,032	1,709	1,234	1,257	2,034	2,455	5,355	1,484	1,297±0,084
3600	1,533	1,397	1,450	1,255	2,002	1,366	5,129	0,618	1,192±0,075
4320	1,010	1,108	1,457	1,093	2,003	1,301	4,824	0,607	1,105±0,024

**Tabela G.2.** Concentração de glicose (g/L) durante a hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

Ensaio/ Tempo(h)	Glicose (g/L)								pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
10	2,042	2,744	2,704	2,608	3,520	2,697	2,383	3,015	2,087±0,522
20	2,071	3,048	2,766	4,085	3,817	3,814	2,236	3,855	3,008±0,456
30	2,574	2,684	3,897	4,995	2,869	4,376	3,132	4,446	3,114±0,756
40	3,134	4,584	4,493	6,056	2,087	5,507	4,327	5,506	4,325±0,514
50	3,405	5,132	5,183	6,201	4,299	6,257	4,706	4,920	5,025±0,604
60	3,620	5,154	5,337	6,307	3,325	6,347	5,592	6,453	5,468±0,310
180	8,747	9,880	9,278	9,865	4,998	9,882	9,807	9,784	9,291±0,161
360	10,879	12,338	12,285	12,212	6,621	12,385	12,483	13,044	12,269±0,147
720	12,129	12,686	12,749	12,260	8,706	12,521	12,622	13,391	12,731±0,157
1440	13,146	13,635	12,868	12,362	10,383	12,892	13,382	14,131	13,650±0,336
2160	14,652	14,009	14,355	14,729	12,128	14,443	13,831	14,339	15,580±0,401
2880	14,019	14,020	15,501	14,294	12,385	14,170	14,070	14,778	15,848±0,508
3600	14,028	14,022	15,821	14,235	12,265	14,878	13,072	14,799	16,685±0,226
4320	14,064	13,189	15,356	13,663	12,190	14,706	13,032	14,395	15,375±0,804

**Tabela G.3.** Concentração de xilose (g/L) durante a hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

Ensaio/ Tempo(h)	Xilose (g/L)								pontos centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000±0,000
10	0,907	0,782	3,201	3,038	0,272	3,334	1,815	1,693	1,895±0,089
20	0,906	0,883	2,947	3,422	0,334	3,795	1,884	2,090	2,128±0,033
30	0,922	1,019	3,261	3,483	0,278	3,716	2,102	2,158	1,912±0,482
40	0,955	1,099	3,332	3,574	0,389	3,892	2,224	2,334	2,214±0,156
50	0,989	1,221	3,344	3,598	0,324	3,856	2,192	2,062	2,309±0,073
60	1,030	1,170	3,374	3,668	0,328	3,943	2,346	2,421	2,364±0,048
180	1,431	1,561	3,788	4,389	0,648	4,830	3,158	3,096	3,147±0,062
360	2,180	2,249	5,139	5,518	1,065	5,584	3,811	3,952	3,855±0,002
720	2,543	2,634	5,366	5,593	1,484	5,974	3,985	4,128	4,013±0,265
1440	2,262	2,650	5,356	5,707	1,200	5,176	4,207	3,621	4,256±0,029
2160	2,889	3,054	5,903	5,828	2,063	6,259	4,304	4,413	4,166±0,314
2880	2,623	2,565	5,419	5,911	1,578	4,983	3,972	4,341	3,938±0,028
3600	2,629	2,886	5,437	5,832	2,052	5,708	4,648	3,752	4,434±0,206
4320	2,578	2,697	4,851	5,261	1,847	4,725	3,706	3,594	4,053±0,280

**Tabela G.4.** Rendimento de glicose durante a hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

Ensaio/ Tempo(h)	Rendimento de Glicose(%)								Media Pontos Centrais
	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	10,347	13,906	13,705	13,218	17,836	13,665	12,078	15,280	10,578
20	10,495	15,447	14,016	20,703	19,341	19,326	11,331	19,536	15,247
30	13,042	13,601	19,750	25,311	14,540	22,174	15,871	22,532	15,781
40	15,884	23,228	22,768	30,689	10,575	27,908	21,926	27,900	21,919
50	17,254	26,007	26,265	31,424	21,788	31,705	23,848	24,934	25,466
60	18,344	26,120	27,047	31,959	16,847	32,162	28,340	32,700	27,713
180	44,328	50,065	47,016	49,990	25,327	50,079	49,696	49,583	47,084
360	55,129	62,526	62,257	61,885	33,551	62,763	63,257	66,099	62,176
720	61,464	64,287	64,604	62,127	44,118	63,449	63,963	67,858	64,515
1440	66,618	69,099	65,208	62,646	52,615	65,334	67,814	71,612	69,176
2160	74,250	70,991	72,747	74,641	61,462	73,190	70,092	72,664	78,957
2880	71,043	71,047	78,553	72,438	62,762	71,807	71,300	74,888	80,315
3600	71,091	71,057	80,173	72,136	62,151	75,395	66,244	74,993	84,556
4320	71,270	66,834	77,819	69,236	61,774	74,522	66,043	72,948	77,914