



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

**DETERMINAÇÃO DE DADOS CINÉTICOS DO PRÉ-TRATAMENTO DE
BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
ALCALINO E DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA POSTERIOR**

Autora: Daniella dos Reis Garcia
Orientadora: 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
abril 2009

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

G165d Garcia, Daniella dos Reis
Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento
de bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de
hidrogênio alcalino e da hidrólise enzimática posterior. /
Daniella dos Reis Garcia. --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. Água oxigenada. 2. Pré-tratamento. 3. Hidrolise.
4. Bagaço de cana. I. Costa, Aline Carvalho da. II.
Maciel Filho, Rubens. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV.
Título.

Título em Inglês: Determination of kinetics data of the pretreatment of
sugarcane bagasse with alkaline hydrogen peroxide and
subsequent enzymatic hydrolysis.

Palavras-chave em Inglês: Hydrogen peroxide, Pretreatment, Hydrolysis,
Sugarcane bagasse

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

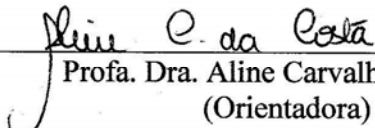
Titulação: Mestre em Engenharia Química

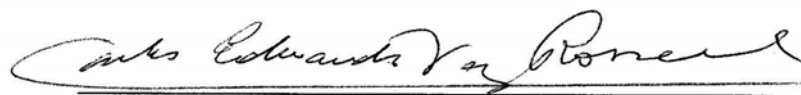
Banca examinadora: Carlos Eduardo Vaz Rossell , Silvia Azucena Nebra
de Pérez

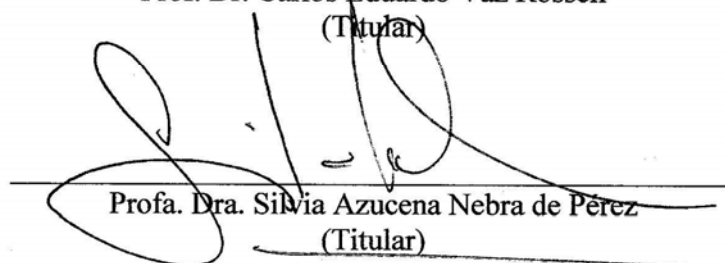
Data da defesa: 03/04/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

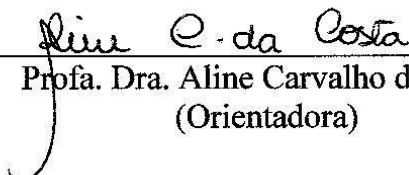
Dissertação de Mestrado defendida por Daniella dos Reis Garcia e aprovada em 3 de abril de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof. Dra. Aline Carvalho da Costa
(Orientadora)


Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell
(Titular)


Prof. Dra. Silvia Azucena Nebra de Pérez
(Titular)

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado
em Engenharia Química defendida por Daniella dos Reis Garcia.


Profª. Dra. Aline Carvalho da Costa
(Orientadora)

Dedico aos meus pais, Jocélia e João Carlos,
à minha irmã, Amanda e
ao meu noivo, André.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar tantos momentos bons em minha vida e por me impulsionar no trabalho e em tudo o que faço. Sem ele, nada seria possível e nunca encontraria forças para as diversas atividades e adversidades em minha vida.

Aos meus pais, João Carlos e Jocélia, minha irmã, Amanda e meu noivo, André pelas palavras de incentivo e amor dedicadas a mim, demonstrando sempre apoio incondicional. A todos meus familiares que estiveram perto de mim nestes anos, em especial Ademir, Mara, Aline e Anne por me receberem sempre com carinho e me proporcionarem momentos de alegria, e também aos que, mesmo longe, estão sempre presentes: tios, avó, avô, primos, primas.

Às amigas do LEPFE, Laura e Sarita, por sempre estarem dispostas a me ajudar e pela troca de informações sobre assuntos relacionados ao trabalho, mas também por momentos de descontração, alegria e carinho. Agradeço muito por terem sido minha segunda família enquanto permaneci em Campinas e espero, com toda sinceridade, que possamos manter vivas as boas lembranças e amizade.

Aos amigos de outros laboratório pelo auxílio com empréstimo de equipamentos que facilitaram o andamento do trabalho. À Lisa, pela sincera amizade e ótimos momentos desfrutados – tenho certeza que ganhei uma grande amiga. Às amigas Flavia, Helena, Iêda, Júlia e Sumaya, que estão sempre presentes em meu coração e que, de alguma forma, mesmo com palavras de carinho, me auxiliaram em diferentes aspectos deste trabalho.

À minha orientadora, Aline, e co-orientador, Rubens, pelas conversas e discussões formais e informais sobre o projeto, que trouxeram considerações valiosas para o trabalho, e também por me darem a assistência necessária e pela amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro caracterizado pela bolsa de mestrado.

À Usina da Pedra e Pesquisador Prof. Rossell, por nos ajudar com o fornecimento do material de estudo: bagaço de cana-de-açúcar.

Aos funcionários da Unicamp, mais precisamente da Faculdade de Engenharia Química, que, embora tenham colaborado algumas vezes de maneira singela, auxiliaram também no bom desenvolvimento do trabalho aqui apresentado.

“De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre começando,
a certeza de que é preciso continuar,
a certeza de que seremos interrompidos antes de continuar.

Portanto devemos fazer de interrupção um caminho novo,
da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro.”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi obter dados experimentais da cinética de pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e da cinética de hidrólise enzimática posterior do bagaço de cana-de-açúcar. O pré-tratamento foi realizado nas condições determinadas como ótimas para este processo com concentrações de 8% (m/m) de bagaço, 11% (v/v) de peróxido de hidrogênio e pH igual a 11,5. Os dados experimentais para o pré-tratamento foram obtidos nas temperaturas de 25, 45 e 65°C, analisando-se os teores de lignina, celulose e hemicelulose em função do tempo de pré-tratamento. À 25°C houve menor deslignificação em relação à 65°C, mas não houve degradação da celulose. A hidrólise enzimática foi realizada com bagaço pré-tratado usando celulase de *T. reesei* e β -glicosidase de *A. Niger* a 50°C. No primeiro ciclo de experimentos, a massa de bagaço foi variada entre 1 e 5 g com volume reacional fixo em 100 mL, correspondendo às concentrações de 1 e 5% de bagaço (m/m). As concentrações de celulase e β -glicosidase foram mantidas fixas em 500 FPU/L e 500 CBU/L, respectivamente. A carga enzimática fixa dificultou a transferência de massa e adsorção das enzimas, por isto, resultados menos satisfatórios foram observados para os ensaios com maior concentração de bagaço. Experimentos adicionais foram realizados fixando-se a massa de bagaço em 3% (m/m) e variando-se as concentrações de celulase e β -glicosidase de acordo com um planejamento 2^2 + configuração estrela. Os resultados reafirmaram que a ação das enzimas sobre o substrato ocorre de forma sinérgica. Nos experimentos para avaliação da hidrólise enzimática, as concentrações de celobiose, glicose, xilose e arabinose são mostradas em função do tempo.

Palavras-chave: Peróxido de hidrogênio, pré-tratamento, hidrólise, bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain experimental data of the kinetics of pretreatment with alkaline hydrogen peroxide and of the kinetics of the subsequent enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. The pretreatment was performed in the conditions determined as optimal for this process with concentrations of 8% (w/w) of bagasse, 11% (v/v) of hydrogen peroxide and pH of 11,5. The experimental data were obtained at temperatures of 25, 45 e 65°C, analyzing the concentrations of lignin, cellulose and hemicellulose were analyzed as functions of pretreatment time. At 25°C was observed lower delignification when compared to the 65°C, but not occurred degradation of cellulose. The enzymatic hydrolysis was performed with pretreated bagasse using celulase from *T. reesei* and β -glucosidase from *A. Niger* at 50 °C. In the first round of experiments, bagasse mass was varied from 1 to 5 g with fixed reactional volume of 100 mL, corresponding to concentrations of 1 to 5% of bagasse (w/w). The concentrations of celulase and β -glucosidade were fixed in 500 FPU/L and 500 CBU/L, respectively. The enzyme loading fixed difficult the transfer of mass and the adsorption of the enzymes, therefore, less satisfactory results were observed for tests with higher concentration of bagasse. Additional experiments were performed fixing bagasse mass at 3% (w/w) and varying celulase and β -glucosidade concentrations according to a 2^2 + star configuration factorial design. The results confirmed that the action of enzymes on the substrate occurs in a synergistic way. In the experiments for enzymatic hydrolysis, the concentrations of celobiose, glucose, xylose and arabinose are shown as functions of time.

Key-words: Hydrogen peroxide, pretreatment, hydrolysis, sugarcane bagasse.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	4
1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 Cana-de-açúcar	6
2.1.1 Produtos da cana-de-açúcar	8
2.2 Materiais lignocelulósicos e sua constituição.....	8
2.2.1 Celulose	9
2.2.2 Hemicelulose	10
2.2.3 Lignina.....	11
2.3 Bagaço de cana-de-açúcar	14
2.3.1 Características.....	16
2.4 Pré-tratamentos	17
2.4.1 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.....	21
2.4.1.1 Peróxido de hidrogênio.....	21
2.4.1.2 Síntese do peróxido de hidrogênio	22
2.4.1.3 Características do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino	25
2.5 Hidrólise	27
2.5.1.1 Enzimas	28
2.5.1.2 Hidrólise enzimática.....	30
2.6 Cinética enzimática.....	33
2.7 Cinética do pré-tratamento	35
CAPÍTULO 3 - METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	36
3.1 Material de estudo	36
3.1.1 Matéria-prima para o estudo.....	36

3.1.1.1	Preparação da matéria-prima para o estudo.....	36
3.2	Materiais	37
3.2.1	Reagentes.....	37
3.2.2	Equipamentos	37
3.3	Procedimentos experimentais desenvolvidos	38
3.3.1	Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.....	39
3.3.1.1	Efeito da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio alcalino	39
3.3.1.2	Estudo da influência da agitação no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino	40
3.3.1.3	Determinação da melhor concentração de peróxido de hidrogênio alcalino.....	40
3.3.2	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e métodos analíticos	40
3.3.3	Atividade enzimática.....	42
3.3.4	Hidrólise enzimática.....	43
3.3.5	Estudo para obtenção dos dados cinéticos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática e do bagaço de cana-de-açúcar.....	44
3.3.5.1	Avaliação do efeito da variação de temperatura no pré-tratamento	44
3.3.5.2	Estudo da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática.....	44
3.3.5.3	Efeito da concentração total de enzima na hidrólise enzimática	45
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....		46
4.1	Efeito da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio na etapa de pré-tratamento	46
4.2	Estudo da influência da agitação no pré-tratamento.....	47
4.3	Determinação da melhor concentração de peróxido de hidrogênio alcalino.....	49
4.4	Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar	50
4.5	Atividade enzimática	53
4.6	Estudo para obtenção dos dados cinéticos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar.....	56
4.6.1	Pré-tratamento	56
4.6.2	Hidrólise enzimática com variação da concentração de substrato	58

4.6.3 Hidrólise enzimática com variação das concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase	63
CAPÍTULO 5	70
CONCLUSÕES	70
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICE A	85
APÊNDICE B.....	86
APÊNDICE C.....	94

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 2.1:</i> Produtos gerados a partir de biomassa (Phillips e Van Lear, 1984).	9
<i>Figura 2.2:</i> Representação da cadeia linear de celulose formada por unidades consecutivas de celobiose (Tímar-Balázsy e Eastop, 1998).	10
<i>Figura 2.3:</i> Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (Fengel e Wegener, 1989).	11
<i>Figura 2.4:</i> Unidades básicas de lignina (Glaser, 1981).	12
<i>Figura 2.5:</i> Estrutura de lignina de <i>Fagus sp</i> (Fengel e Wegener, 1989).....	13
<i>Figura 2.6:</i> Esquema da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de Hsu <i>et al.</i> , 1980).....	18
<i>Figura 2.7:</i> Esquema simplificado da reação de síntese direta de H_2O_2 (Pashkova <i>et al.</i> , 2008).....	23
<i>Figura 2.8:</i> Reação catalítica de fixação de hidrogênio em quinona (Fabricação do peróxido, 2008).....	24
<i>Figura 2.9:</i> Reação entre solução orgânica de quinona e oxigênio, resultando em H_2O_2 dissolvido (Fabricação do peróxido, 2008).	24
<i>Figura 2.10:</i> Representação esquemática de uma celulase (Cavaco-Paulo, 1995).	29
<i>Figura 2.11:</i> Representação esquemática da hidrólise da celulose. C: regiões cristalinas, R: grupos terminais redutores, NR: grupos terminais não-redutores, CBH I e II: exoglunases, EG: endoglucanase (Teeri, 1997).	32
<i>Figura 3.1:</i> (a) Bagaço moído e não peneirado e (b) Bagaço moído e peneirado.....	36
<i>Figura 4.1:</i> Avaliação do efeito da variação das concentrações de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio alcalino quando duplicadas. Ensaio 1: 4% (m/m) de bagaço de cana e 7,355% de H_2O_2 ; Ensaio 2: 8% (m/m) de bagaço e 7,355% de H_2O_2 ; Ensaio 3: 8% (m/m) de bagaço e 14,710% de H_2O_2	46
<i>Figura 4.2:</i> Efeito da agitação na etapa de pré-tratamento para a análise da quantificação de glicose.	48
<i>Figura 4.3:</i> Efeito da agitação na etapa de pré-tratamento para a análise da quantificação de açúcares redutores totais.	48
<i>Figura 4.4:</i> g glicose/ g biomassa bruta seca em função de tempo após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio alcalino. ...	49

<i>Figura 4.5:</i> g ART/ g biomassa bruta seca em função do tempo após hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio alcalino. ...	49
<i>Figura 4.6:</i> Difractogramas obtidos para o bagaço de cana sem pré-tratamento e pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.	52
<i>Figura 4.7:</i> Comportamento da enzima celulase. Logaritmo da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída.....	54
<i>Figura 4.8:</i> Comportamento da enzima β -glicosidase. Concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de uma solução de 15 mmol/L de celobiose.....	55
<i>Figura 4.9:</i> Perfis comparativos de lignina restante no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.....	56
<i>Figura 4.10:</i> Perfis comparativos de celulose no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.....	57
<i>Figura 4.11:</i> Perfis comparativos de hemicelulose no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.....	57
<i>Figura 4.12:</i> Concentração de celobiose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	59
<i>Figura 4.13:</i> Concentração de glicose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	59
<i>Figura 4.14:</i> Concentração de xilose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	60
<i>Figura 4.15:</i> Concentração de arabinose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	60
<i>Figura 4.16:</i> Concentração de glicose em g/g para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	61
<i>Figura 4.17:</i> Concentração de xilose em g/g para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	62
<i>Figura 4.18:</i> Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose.	65
<i>Figura 4.19:</i> Concentrações de celobiose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.	66
<i>Figura 4.20:</i> Concentrações de glicose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.	67

<i>Figura 4.21:</i> Concentrações de xilose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.	68
<i>Figura 4.22:</i> Concentrações de arabinose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.	69

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 2.1:</i> Composição média do bagaço de cana-de-açúcar (Peres, 1999; Mello, 2007).	15
<i>Tabela 4.1:</i> Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento (cálculos em base 100).	51
<i>Tabela 4.2:</i> Índices de cristalinidade (CrI_B) para o bagaço que não sofre pré-tratamento e para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.....	53
<i>Tabela 4.3:</i> Rendimentos em glicose para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.	63
<i>Tabela 4.4:</i> Matriz de planejamento para os ensaios destinados à variação das concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase.	64
<i>Tabela 4.5:</i> Tabela ANOVA para o rendimento em glicose (%).	66

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Como se sabe, o petróleo é um bem escasso, de produção limitada, com alta demanda, cujas reservas mundiais diminuem a cada dia, provocando, por consequência, constantes altas em seus preços.

Assim, há uma natural tendência mundial na busca de substitutos capazes de suprir as demandas e, em paralelo, de possuir características que possam amenizar efeitos danosos ao ambiente. Como alternativa, o etanol, produto de origem lignocelulósica, tem apresentado grande potencial nessa missão.

A produção de etanol se destaca, principalmente, em países como o Brasil e Estados Unidos. Pode ser produzido por uma variedade de biomassas, é considerado um combustível limpo e pode ser utilizado de duas formas, como álcool anidro, que é misturado à gasolina, ou álcool hidratado, para ser usado em veículos *flexfuel*.

No Brasil, o etanol vem sendo estudado desde a década de 1970, motivado pelos problemas econômicos trazidos pela alta de preços do petróleo, em decorrência principalmente de sua dependência histórica de importação do produto, que só recentemente foi controlada.

Pelas condições climáticas e abundância de terras, o Brasil, que adota o modelo de produção do etanol a partir da cana-de-açúcar, possui grande disponibilidade de matéria-prima para produção a baixos custos, o que torna viável o desenvolvimento de tecnologias para aprimorar os processos produtivos. No país, além da sacarose de cana-de-açúcar, principal matéria-prima utilizada na produção de etanol, também pode ser empregado o bagaço de cana, tendo em vista a disponibilidade do material e a infra-estrutura existente nas destilarias e usinas de açúcar.

Com a utilização do bagaço, há a vantagem de aumentar significativamente a produção de etanol, sem aumentar a área plantada, além também da possibilidade de diminuir custos de produção, por se tratar de resíduo proveniente das próprias indústrias.

Vale ressaltar ainda que o bagaço de cana reforça a matriz energética brasileira via cogeração, juntamente com outros resíduos de destilarias e usinas de açúcar e álcool como a palha, que é uma sobra proveniente da colheita. Há grande potencial de geração de energia elétrica a partir destes resíduos, que já vem sendo disponibilizada para o sistema interligado. A quantidade de bagaço gerado, principalmente no estado de São Paulo e em menor escala em outros estados, é muito alta, o que torna as indústrias do setor sucroalcooleiro auto-suficientes, facilitando a utilização deste resíduo para diferentes fins, como matéria-prima para produção de celulose, ração animal, geração de energia, além da possibilidade de ser utilizado para produção de etanol (Aneel, 1998; Unica, 2008).

Um fator atraente quando se trata de etanol é seu apelo ambiental face à capacidade que sua planta de origem, a cana-de-açúcar, tem em absorver grande parte do dióxido de carbono que é gerado quando este combustível é produzido e utilizado. Desta maneira, o etanol passou a ser considerado um combustível limpo e de grande interesse mundial.

Contudo, há pouco tempo, começaram a ser discutidos pontos nada favoráveis ao etanol, pois passou-se a interpretá-lo como interferente na produção de alimentos, por haver a possibilidade do cultivo da cana-de-açúcar ocupar terras destinadas à produção de trigo e soja. Sabe-se, entretanto, que as plantações, no Brasil, não ocupam terras destinadas à alimentação, e sim, áreas degradadas de pastagem. Já nos Estados Unidos, que produz etanol a partir do milho, com resultados bastante inferiores aos alcançados pelo etanol brasileiro, o que exige grandes áreas para produção, o etanol poderia sim inibir a produção de alimentos em seu território.

Neste contexto, com tantas discussões a respeito deste combustível, reforça-se a viabilidade de estudos nessa área do conhecimento, principalmente nas etapas de sua produção, a fim de melhorar o processo e desenvolver outras metodologias.

Para se produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos, alguns processos devem ser considerados: hidrólise da hemicelulose, hidrólise da celulose, fermentação

posterior dos açúcares, separação do resíduo de lignina gerado, recuperação e concentração do etanol (Sheehan, 2001).

Para hidrólise da celulose, existem duas possibilidades: hidrólise ácida e hidrólise enzimática. A primeira delas, ácida, é bastante difundida, mas geradora de alguns resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior, além de haver a possibilidade de degradação da glicose formada. A enzimática ainda é economicamente inviável e a engenharia deste processo necessita aperfeiçoamento, o que reforça a necessidade de se fazer pesquisas sobre o assunto.

Outro processo não menos importante que a hidrólise é o pré-tratamento do material. Para que seja considerado eficiente, o pré-tratamento deve conferir à celulose elevada digestibilidade, reduzir o requerimento de enzimas na etapa subsequente, degradar a parede de lignina que confere rigidez à parede celular da biomassa, além de limitar a geração de compostos inibidores aos microorganismos usados na fermentação posterior e perturbar a estrutura cristalina do material. O termo biomassa empregado refere-se a diversos tipos de materiais orgânicos provenientes de atividades agrícolas que podem ser direta ou indiretamente empregados em atividades destinadas à geração de combustíveis como etanol, biogás dentre outros, como também para produção de energia elétrica.

A otimização da bioconversão lignocelulósica pela enzima celulase requer bom conhecimento de cinética da reação. A complexidade da hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos reside no fato de se tratar de substratos heterogêneos insolúveis, conseqüentemente, sua hidrólise enzimática ocorre sempre de forma limitada. Este tipo de hidrólise tem sido geralmente estudada por meio da equação de Michaelis-Menten, a partir da velocidade cinética inicial, porém sabe-se que, em geral, os modelos que tentam prever a produção de açúcares em reações em batelada longas não dão bons resultados (Gan *et al.*, 2003).

Existem na literatura alguns modelos que tentam descrever a hidrólise enzimática de material lignocelulósico, citados por Holtzaple *et al.*, 1984; Gan *et al.*, 2003, dentre outros. Entretanto, a maioria trata de outros materiais lignocelulósicos que não o bagaço de cana-de-açúcar e não se chega a um consenso sobre os mecanismos de reação, envolvendo aspectos relacionados aos produtos que ocasionam a inibição das enzimas empregadas,

além de o tipo de inibição ocasionado no processo e ainda como se dá a adsorção das enzimas ao substrato.

1.1 OBJETIVO

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de dados experimentais para estudo cinético tanto do pré-tratamento, empregando peróxido de hidrogênio alcalino, quanto da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado.

Para que o objetivo principal fosse atingido, objetivos específicos foram cumpridos:

1. Análise das melhores condições a serem consideradas na determinação dos dados cinéticos do pré-tratamento e hidrólise enzimática, como massa de bagaço de cana-de-açúcar e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino a ser empregada no pré-tratamento;
2. Determinação de dados cinéticos do pré-tratamento com variação de dois parâmetros, temperatura e tempo.
3. Determinação de dados cinéticos da hidrólise enzimática com variação de carga enzimática e de concentração de biomassa.

1.2 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Com o intuito de facilitar o entendimento dos conceitos relacionados nesta dissertação e para facilitar a compreensão e interpretação dos resultados atingidos, o trabalho foi dividido em 5 capítulos. A introdução trata de forma breve considerações relevantes ao trabalho e aos objetivos. Os demais capítulos esmiúçam os pontos discutidos na introdução e mostram os resultados e conclusões obtidos com os experimentos.

- Capítulo 2: faz uma revisão da literatura sobre conceitos relacionados à pesquisa como definições dos materiais utilizados no estudo, tais como cana-de-açúcar, materiais lignocelulósicos em geral e sua constituição e bagaço. Trata também dos

tipos de pré-tratamentos mais importantes empregados atualmente, com ênfase para o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino. A síntese do peróxido de hidrogênio, o processo de hidrólise e algumas características das enzimas constam neste capítulo. Por fim, aborda a cinética de hidrólise da celulose e pré-tratamento de diferentes materiais.

- Capítulo 3: detalha a metodologia experimental adotada. Expõe desde características e preparação da matéria-prima para o estudo, até os procedimentos experimentais desenvolvidos para a determinação dos dados cinéticos do pré-tratamento do bagaço, e da hidrólise enzimática, com o emprego de cromatografia líquida de alta eficiência.
- Capítulo 4: trata da apresentação dos resultados e suas discussões.
- Capítulo 5: refere-se às conclusões e sugestões para trabalhos futuros

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp*) é uma gramínea que se desenvolve bem em regiões de clima tropical e subtropical. É composta por pontas e folhas (juntas constituem a palha da cana), colmos (onde a sacarose é acumulada) e pelas raízes. A sacarose é o produto que determina a qualidade e variedade da cana, já que é a matéria-prima para a produção de açúcar e de álcool. A cana também apresenta uma parte fibrosa (bagaço) que tem importância econômica, já que é utilizado para fins energéticos e também para produção de etanol (Rein, 2007).

Existem diferenças significativas entre as variedades de cana-de-açúcar, que são determinadas pela maneira como a planta é cultivada, englobando fatores como tipo de solo, duração do período vegetativo, tipo de sistema de colheita e condições climáticas. A dureza da cana, sua densidade e a composição da fibra variam de espécie para espécie, o que pode afetar o comportamento no processo de extração. A cana-de-açúcar apresenta também grande variedade por modificações genéticas, empregadas no processo de melhoria da qualidade desta planta, e obtidas pelo cruzamento entre diferentes tipos.

Dependendo das condições climáticas, o rendimento, a composição e o crescimento da cana podem ser afetados. O comprimento do entrenó presente na estrutura da cana indica a taxa de crescimento da planta. Em períodos de seca, o comprimento do entrenó se reduz, resultando em teores de fibra maiores (Paes, 2005).

Quando uma estação se inicia em um período em que a cana se encontra imatura, espera-se que o teor de sacarose e demais açúcares, bem como o teor de pureza do caldo

sejam baixos. No decorrer do tempo, a cana torna-se madura e o teor de sacarose e pureza do caldo aumentam (Rein, 2007).

Há pouco mais de 20 anos, 40% das áreas cultivadas com cana no Brasil eram ocupadas somente por uma variedade. Já no ano de 2005, constatou-se uma mudança drástica nesse quadro, com a incorporação no mercado de mais de 550 variedades. Dentre estas, 20 das principais variedades ocupando 70% da área plantada, sendo que a variedade mais cultivada não ultrapassando 13% da área total (Paes, 2005).

O ciclo da cana tem como umas de suas principais etapas a colheita. Dependendo de como for feita, pode ocorrer alteração de sua qualidade. A eficiência da colheita manual ou mecanizada é aumentada quando há uma queima prévia do canavial para eliminação de folhas e palha e para que uma pré-limpeza seja realizada. Na colheita manual, a queima da cana inibe a presença de animais que possam prejudicar o desenvolvimento da planta, já para a mecanizada, eliminando-se a palha, há menos esforço mecânico por parte das máquinas (Furlani *et al.*, 1996).

O processo destinado à colheita de cana nos últimos anos, sem queima prévia, acarreta inconvenientes, pois a cana é cortada em sua base, o que aumenta a quantidade de impurezas na planta, reduzindo a qualidade da matéria-prima que se destina à moagem. Desta forma, o ideal, segundo Neves *et al.* (2001), é que a cana seja queimada para não causar alteração na matéria-prima. Por outro lado, segundo Ripoli *et al.* (1990), a queima acarreta desperdício energético, pois através da palha grande quantidade de energia pode ser produzida e aproveitada para o funcionamento de caldeiras.

Cabe ainda destacar que o processo de queima é contestado por ambientalistas que argumentam que este processo causa problemas desastrosos para a natureza. Com esta prática, sabe-se que há grande liberação de gás carbônico, óxidos de nitrogênio e enxofre, além de grande quantidade de fuligem proveniente da palha queimada. No estado de São Paulo vigora uma lei, motivada pela legislação ambiental, que trata da eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar. A Lei nº 11241/02 visa reduzir progressivamente a queima dos canaviais até este processo seja extinto em meados de 2031 (Alesp, 2009).

2.1.1 Produtos da cana-de-açúcar

Açúcar e álcool são os principais produtos da agroindústria canavieira, sendo que o açúcar atende o mercado alimentício e o álcool pode ser utilizado como anidro, quando adicionado à gasolina, e hidratado, quando é usado em carros bicombustíveis, que podem ser movidos à gasolina ou a álcool. Nos últimos anos, cerca de 50% da cana-de-açúcar produzida no Brasil destinou-se à produção de açúcar e os outros 50% à produção de álcool (Carvalho, 2007). As estimativas mostram que nos próximos anos, a produção de açúcar alcançará 28,6 milhões de toneladas, 9% a mais que à safra 2007/2008, que foi de 26,2 milhões. Para o álcool anidro, a produção na safra anterior foi de 7,24 bilhões de litros, 6% a menos que o previsto para os próximos anos, que será de 7,65 bilhões de litros. A produção de álcool hidratado será 27% maior, atingindo 16,6 bilhões de litros contra um volume anterior de 13,1 bilhões de litros (Unica, 2008).

A cana é a principal matéria-prima para produção de açúcar e álcool combustível, mas não é a única maneira de se obter etanol. Existem outros meios de fabricação deste combustível, que pode ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos da cana-de-açúcar, gerados por usinas sucroalcooleiras, como o bagaço de cana (Rein, 2007).

2.2 Materiais lignocelulósicos e sua constituição

Os materiais lignocelulósicos ou biomassas são insolúveis e estruturados e apresentam-se em grandes quantidades na natureza. Demonstram grande potencial para serem utilizados como substratos na obtenção de enzimas celulolíticas, produção de energia e de combustíveis.

São constituídos por componentes que proporcionam resistência ao ataque enzimático como celulose, hemicelulose, que são polissacarídeos, e lignina. Estes componentes são os principais constituintes da matriz lignocelulósica e apresentam-se nas proporções 4:3:3, respectivamente, dependendo da origem do material lignocelulósico, mas também apresentam componentes que não fazem parte da parede celular (Tsao, 1978). Como exemplo podem ser citados os extrativos, que provocam diferenças morfológicas no material e consistem em resinas, terpenos, óleos essenciais, graxas, dentre outros. A Figura

2.1 mostra os diversos produtos que podem ser obtidos a partir da biomassa com aplicação de processos químicos ou biológicos.

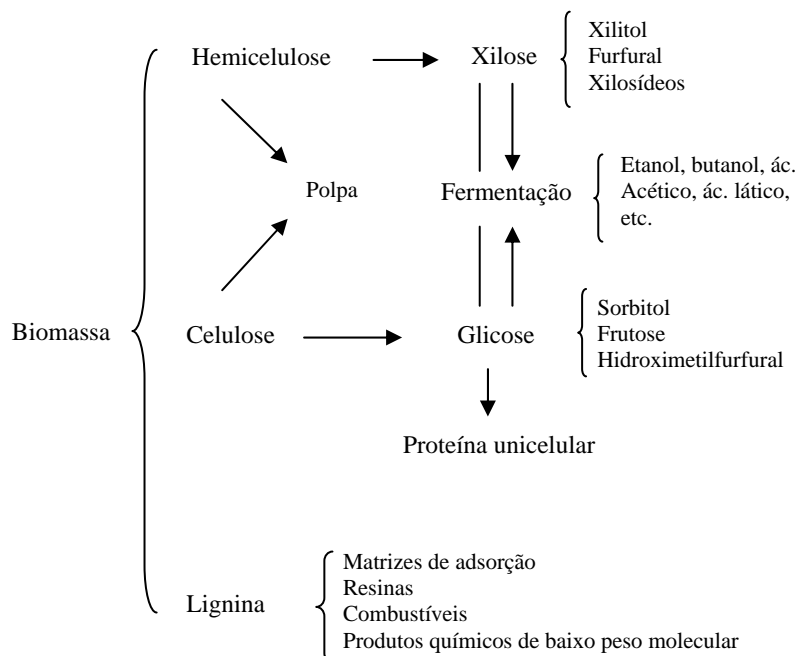


Figura 2.1: Produtos gerados a partir de biomassa (Phillips e Van Lear, 1984).

Constituintes não-estruturais como extrativos, não-extrativos e proteínas também são importantes quando se considera a constituição do material lignocelulósico. Estão presentes em menores proporções e consistem de graxas, óleos essenciais, gorduras, gomas, amidos, alcalóides, resinas e demais constituintes citoplasmáticos. Os extrativos podem ser extraídos com solventes orgânicos ou aquosos e determinam algumas características da planta como cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, sabor e propriedades abrasivas (Fengel e Wegener, 1989). Os não-extrativos consistem em compostos inorgânicos como sílica, carbonatos e oxalatos. Estes componentes geram problemas com a bioconversão devido à presença de inibidores durante o pré-tratamento (McMillan, 1996).

2.2.1 Celulose

A celulose é o material orgânico em maior abundância na natureza. É um monopolímero linear de alto peso molecular e de cadeia longa, constituindo aproximadamente 50% da biomassa. Apresenta em sua estrutura duas unidades de glicose adjacentes ligadas pela eliminação de uma molécula de H₂O entre seus grupos hidroxílicos. Esse polímero tem tendência em formar ligações de hidrogênio, de maneira que as cadeias

unem-se formando feixes que apresentam regiões nitidamente cristalinas, mas também é constituída por regiões amorfas. Estas duas porções, cristalina e amorfa, apresentam diferenças quando se trata da digestibilidade da biomassa mediante ataque enzimático (Fengel e Wegener, 1989).

A degradação da celulose cristalina é muito lenta quando comparada à porção amorfa, por isto, a degradação é iniciada nas partes amorfas, já que são mais susceptíveis de serem hidrolisadas. A representação da cadeia de celulose pode ser observada através da Figura 2.2, que é formada por unidades consecutivas de celobiose.

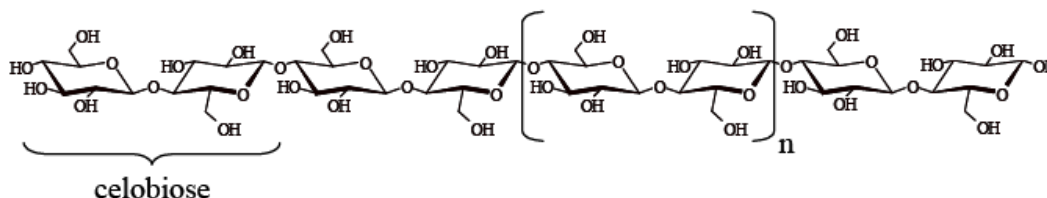


Figura 2.2: Representação da cadeia linear de celulose formada por unidades consecutivas de celobiose (Tímar-Balázszy e Eastop, 1998).

2.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polissacarídeo estrutural ramificado, heteropolímero, complexo, com peso molecular mais baixo que o da celulose e com várias ramificações. É também o segundo polissacarídeo natural mais abundante depois da celulose. Em seu estado natural é amorfa e consiste em açúcares de cinco carbonos (unidades de pentoses), como arabinose e xilose e seis carbonos (unidades de hexoses) como glicose, manose, galactose, que são polímeros complexos que, juntos, conferem resistência aos materiais lignocelulósicos (Saka, 1991).

A complexa estrutura da hemicelulose confere propriedades biofísicas e biomecânicas sobre os tecidos vegetais, como também sobre os produtos provenientes destes tecidos. Esta estrutura compreende cerca de um quarto a um terço dos materiais vegetais, variando esta proporção conforme as espécies (Sun e Sun, 2002). As hemiceluloses são frações não-homogêneas e definidas como um material solúvel alcalino. É formada por vários monossacarídeos que estão representados na Figura 2.3.

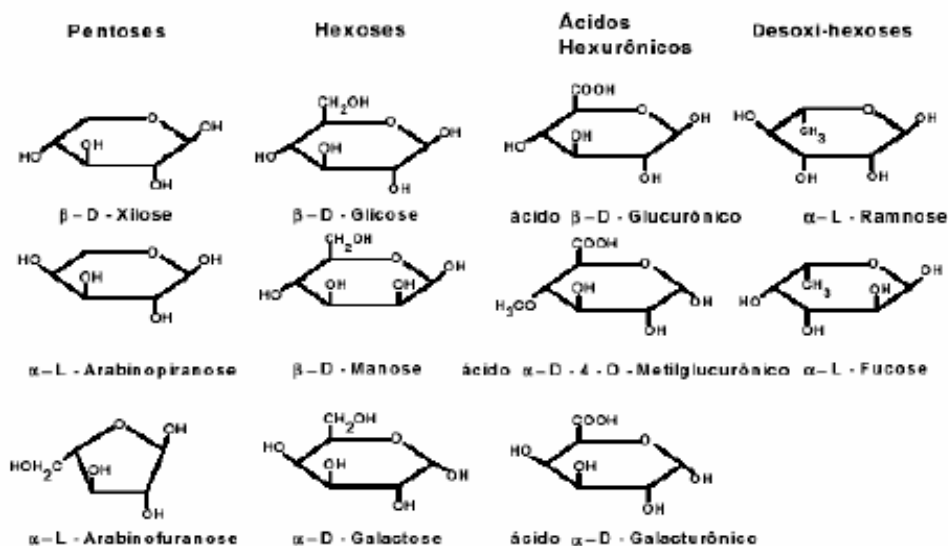


Figura 2.3: Estruturas dos monossacarídeos que formam as hemiceluloses (Fengel e Wegener, 1989).

As hemiceluloses de tecidos lenhosos apresentam diferenças quando espécies distintas são comparadas: as madeiras moles são ricas em hexosanos, como a manose, e as madeiras duras ricas em pentosanos, como as xiloses.

A celulose e hemicelulose apresentam algumas diferenças e, como já citado, a celulose é formada por unidades de glicose. Já as hemiceluloses têm várias unidades de diferentes açúcares como pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses. Estes açúcares formam polímeros mais curtos e ramificados. Outra diferença importante é que a hemicelulose é mais facilmente hidrolisada, uma vez que sua estrutura ramificada diminui as energias de ligações e a cristalinidade do material.

2.2.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula complexa, constituída por polímeros de fenilpropano que, distribuídos ao acaso, conferem a esta fração uma estrutura tridimensional que não é convertida em açúcares fermentescíveis (Ladisch, 1983).

Diferentemente da celulose e hemicelulose, sua estrutura não pode ser representada por uma combinação de unidades monoméricas ligadas pelo mesmo tipo de ligação química. É formada por moléculas de massa molar elevada que atuam como suporte

para as fibras de celulose e também são constituídas por unidades básicas guaiacil e sinapil que podem ser observadas na Figura 2.4.

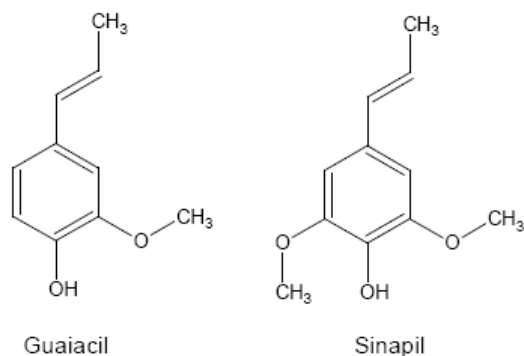


Figura 2.4: Unidades básicas de lignina (Glaser, 1981).

A presença da lignina nos materiais lignocelulósicos representa o principal interferente para o processo de conversão da biomassa, já que é uma substância que atua como uma barreira. Esta estrutura, juntamente com a celulose, apresenta-se como uma molécula capaz de fornecer rigidez às plantas, sendo que a lignina apresenta grande resistência ao ataque de microorganismos comuns (Vásquez *et al.*, 2007).

Pesquisas evidenciam que quanto maior a remoção da lignina maior será a digestibilidade da biomassa, entretanto, a extensão da deslignificação é diferenciada dependendo da origem do substrato (Koullas *et al.*, 1992).

A degradação da lignina envolve múltiplas reações bioquímicas que ocorrem simultaneamente. Rupturas das ligações, hidroxilações e demetilações, dentre outras reações, devem acontecer para que esta estrutura seja perturbada (Tien e Kirk, 1983; Kirk e Farrel, 1987; Leisola *et al.*, 1987). A seguir, tem-se a Figura 2.5, demonstrando a complexidade desta estrutura.

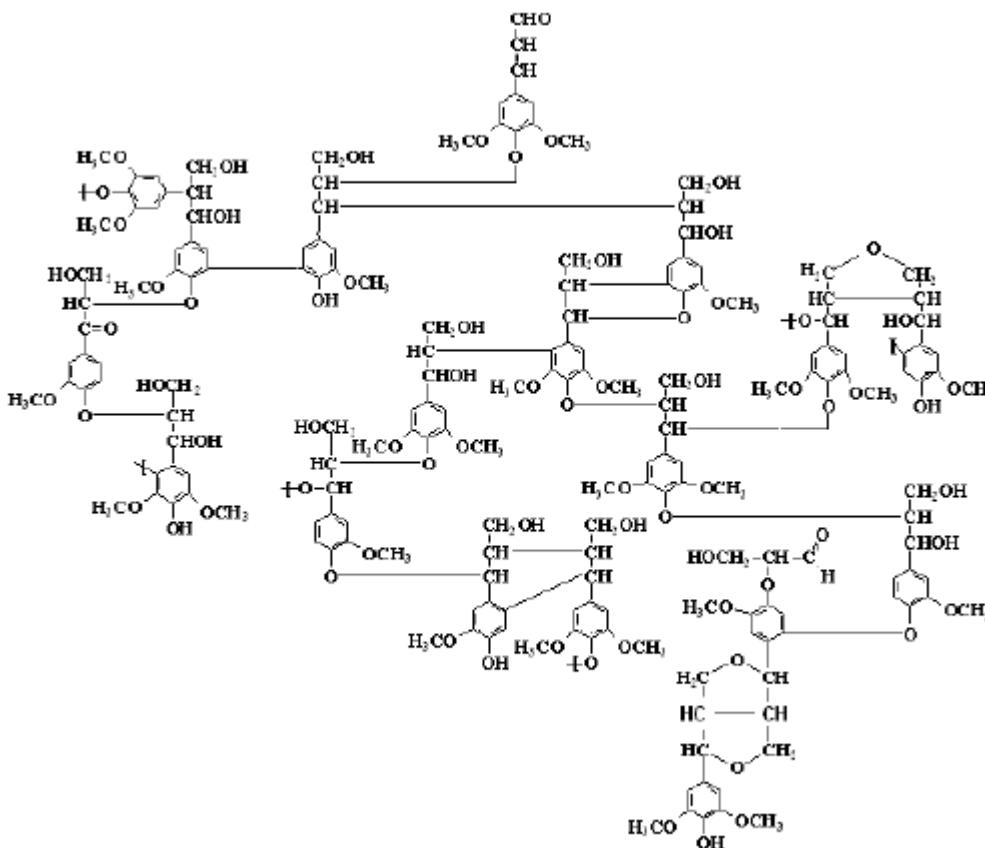


Figura 2.5: Estrutura de lignina de *Fagus sp* (Fengel e Wegener, 1989).

A lignina é insolúvel em água, tem características de um termoplástico fundido e é empregada como fonte de energia (Benar *et al.*, 1999). Eletricidade e calor podem ser produzidos pela queima da lignina para auxiliar o setor sucroalcooleiro na produção de etanol, o que pode aumentar a eficiência energética de todo o sistema. Tem sido empregada na produção de resinas fenólicas (Benar *et al.*, 1999; Rohella *et al.*, 1996), suprimento animal (El-Gammal *et al.*, 1998), adesivos (Rohella *et al.*, 1996) e estabilizante para plásticos e borrachas (Alexy *et al.*, 2000), dentre outras aplicações.

O conteúdo de lignina e sua distribuição na madeira podem ser analisados através de microscopia ultravioleta. Sua máxima absorção é em 212 e 280 nm e nenhum outro componente de grande ocorrência presente na madeira absorve no UV com as mesmas propriedades (Argyropoulos e Menachem, 1997).

2.3 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar representa a principal biomassa utilizada em países tropicais, principalmente por ser um material de grande disponibilidade em destilarias sem custo adicional, além de apresentar alto teor de carboidrato e baixo de lignina. Devido ao seu alto conteúdo de carboidratos, o bagaço tem grande potencial para gerar etanol combustível e outros produtos.

É um material não homogêneo, contém a maior parte do material fibroso presente na cana e é obtido durante processo de moagem da cana-de-açúcar como resíduo após a extração do caldo nas moendas. Sua composição química depende da variedade da cana-de-açúcar, tipo de solo, técnicas de colheita e manuseio (Rein, 2007).

Por se tratar de um material lignocelulósico, é constituído por lignina, celulose e hemicelulose, sendo que a lignina impede a hidrólise das camadas mais internas. Quimicamente, o bagaço apresenta aproximadamente 50% de α -celulose, 30% de pentoses e 2,4% de cinzas. Comparando-se o seu teor de cinzas com o de outros resíduos de colheita como casca de arroz e palha de trigo, que apresentam teor de cinzas de 17,5 e 11%, respectivamente, o bagaço de cana apresenta vantagens para sua bioconversão. (Wheals *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000).

Apresenta baixa densidade e, por ser muito fibroso, é difícil tratá-lo como um sólido. Não é um material corrosivo, mas contém areia, decorrente da colheita da cana e, por este motivo, pode ser abrasivo. O bagaço úmido tem teor de umidade em torno de 50 g água/100 g bagaço, mas, dependendo das condições de manuseio, pode variar na faixa de 47 a 55 g/100 g bagaço (Rein, 2007).

Sua composição e estrutura morfológica variam de acordo com procedimentos empregados no campo de cultivo da cana-de-açúcar como tipo de solo, variedade da cana, técnica de colheita e manuseio com maior ou menor arraste de terra, areia e resíduo vegetal e emprego ou não da queima da cana. Seu armazenamento também é um fator determinante no aspecto do bagaço (Peres, 1999).

Segundo Liu *et al.* (2007), aproximadamente 54 milhões de toneladas são produzidas anualmente no mundo. O processamento do bagaço é vantajoso, pois o custo da colheita e da lavagem deste material já estão incluídos no processo de extração do açúcar.

Sua estocagem gera uma ação microbiológica de fermentação exotérmica, dada à presença de açúcar residual e umidade, além de haver possibilidade de ocorrer combustão espontânea (Peres, 1999). A Tabela 2.1 demonstra a composição média do bagaço de cana-de-açúcar, englobando aspectos químicos e físicos.

Tabela 2.1: Composição média do bagaço de cana-de-açúcar (Peres, 1999; Mello, 2007).

Composição Química Média	%
Carbono	39,7 - 49,0
Oxigênio	40,0 - 46,0
Hidrogênio	5,5 - 7,4
Nitrogênio e cinzas	0,0 - 0,3
Propriedades físico-químicas	
Umidade	50,0
Fibra	46,0
Brix	2,0
Impurezas minerais	2,0
Composição média da fibra do bagaço	
Celulose	26,6 - 54,3
Hemicelulose	14,3 - 24,4
Lignina	22,7 - 29,7

A utilização do bagaço, como as demais biomassas, pode ocorrer de diferentes formas. Pode ser queimado para produzir calor ou eletricidade ou ainda, pode ser convertido em combustíveis através de fermentação. Para se produzir etanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar, uma transformação deve ser feita: conversão de celulose e hemicelulose em seus monômeros constituintes (glicose e xilose) e posterior conversão destes monômeros através da ação de microorganismos.

As características estruturais do bagaço e demais substratos têm sido divididas em dois grupos e classificadas como físicas ou químicas. As químicas englobam a porcentagem da celulose, hemicelulose e lignina. As físicas consistem na acessibilidade da área superficial, cristalinidade, dureza, abrasividade, distribuição física da lignina na biomassa, grau de polimerização, volume dos poros e tamanho da partícula da biomassa (fibras, agulhas e medula).

2.3.1 Características

Uma das características quando se trata de bagaço, dentre outras biomassas, é a sua cristalinidade. O grau de cristalinidade da biomassa lignocelulósica é considerado um fator importante para influenciar o andamento da hidrólise. O índice de cristalinidade, para materiais lignocelulósicos, tem como função medir a quantidade de celulose cristalina relativa em todo o substrato. Segundo Chang e Holtzaple (2000), após pré-tratamento, o índice de cristalinidade pode sofrer aumento.

Sabe-se que, primeiramente, a região amorfa da celulose é hidrolisada, resultando em acumulação de celulose cristalina, fazendo com que seja mais difícil hidrolisar o material. Em grande parte dos estudos que estabeleceram uma correlação entre cristalinidade e hidrólise foram utilizados substratos de celulose pura, que muito provavelmente não representam de maneira real um material lignocelulósico, já que trata-se de um substrato heterogêneo, ao contrário da celulose pura, que é um material homogêneo (Pu *et al.*, 2006).

Sabe-se também que o tamanho das partículas da biomassa, com exceção de partículas exageradamente grandes, não tem efeito sobre as conversões enzimáticas do bagaço (Sinitsyn *et al.*, 1991). Entretanto, o ideal é utilizar partículas uniformes para que o processo de conversão seja bem conduzido.

Alguns autores relatam diminuições na área superficial acessível de produtos da hidrólise sem afetar significativamente a cristalinidade, ao passo que outros dizem que diminuições na cristalinidade ocorrem quando há também aumento na área superficial acessível durante a hidrólise. A discrepância nos conceitos na alteração ou não da cristalinidade do substrato pode ser atribuída às variações em sua constituição e às técnicas utilizadas para a sua caracterização (Gardner *et al.*, 1999; Meunier-Goddik *et al.*, 1999).

Outro fator importante quando se fala em biomassa como o bagaço é a sua digestibilidade. Estudos mostraram que pode ser afetada diretamente por conta de área superficial acessível da biomassa. Gharpuray *et al.* (1983) e Sinitsyn *et al.* (1991) determinaram que a área superficial específica é um dos fatores limitantes da hidrólise enzimática.

Mesmo se um alto teor de enzima for utilizado, a digestibilidade enzimática da celulose em biomassa nativa é baixa (< 20%). Isto se deve às características estruturais

da biomassa lignocelulósica, que é um complexo de polímeros de carboidratos e lignina (Wright et al., 1988). Em contrapartida, outros estudos mostram resultados conflitantes quando se trata do efeito da área superficial acessível na digestibilidade da biomassa (Fan *et al.*, 1981). As divergências referentes à digestibilidade da biomassa são ocasionadas por existir diferentes métodos utilizados para determinar a área superficial do material que se deseja estudar (Zhu et al., 2008).

Sabe-se que a digestibilidade do bagaço, dentre outros substratos, é alterada quando este material passa por um processo denominado pré-tratamento. Na seção a seguir serão destacados alguns tipos de pré-tratamentos utilizados, os quais facilitam processos posteriores destinados à produção de etanol.

2.4 Pré-tratamentos

Para converter carboidratos em etanol, estes polímeros devem ser quebrados em açúcares de menor peso molecular, basicamente monômeros, antes que microorganismos empregados na fermentação entrem em contato com o material. Entretanto, a biomassa lignocelulósica, em geral, é resistente à ação da enzima celulase devido a sua cristalinidade, presença de lignina e hemicelulose, área superficial inacessível e caráter heterogêneo das partículas da biomassa. Por este motivo, pré-tratamentos são utilizados com o objetivo de alterar a matriz lignocelulósica da biomassa, com aumento da porosidade do material, redução da cristalinidade e, conseqüentemente, aumento da digestibilidade da celulose, tornando-a mais acessível para o ataque enzimático.

O pré-tratamento é uma das etapas mais caras do processo de conversão de biomassa a açúcares fermentescíveis (Wheals *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1980). A Figura 2.6 mostra como o pré-tratamento atua sobre os materiais lignocelulósicos.

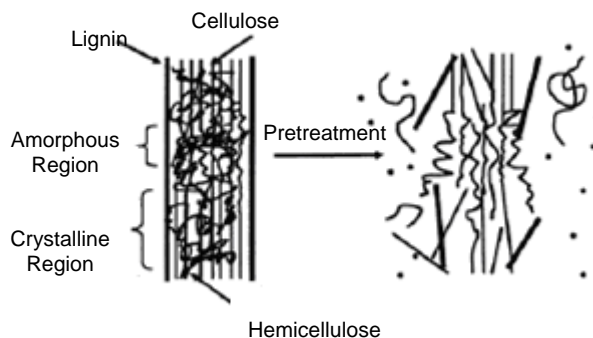


Figura 2.6: Esquema da atuação do pré-tratamento em materiais lignocelulósicos (adaptado de Hsu *et al.*, 1980).

O pré-tratamento, para ser considerado adequado e eficiente, deve estar de acordo com os seguintes itens (Sun e Cheng, 2002):

- resultar em alta recuperação de todos os carboidratos;
- gerar alta digestibilidade da celulose, que pode ser notada após a hidrólise enzimática;
- ocasionar pouca ou nenhuma formação de produtos de degradação de açúcares e lignina;
- demandar pouca energia ou permitir que a energia empregada possa ser reutilizada em outras etapas na forma de calor;
- resultar em elevada concentração de sólidos, bem como em altas concentrações de açúcares liberados na fração líquida;
- ser realizado a baixos custos operacionais.

Existem pré-tratamentos físicos, físico-químicos, biológicos e químicos. Todos estes processos aumentam a digestibilidade e a bioconversão da biomassa, mas a deslignificação varia conforme o pré-tratamento escolhido. A seguir, têm-se alguns tipos, suas operações e o efeito que geram sobre o material que se deseja trabalhar.

O pré-tratamento físico engloba moagem e trituração (cominuição mecânica).. Na cominuição mecânica, o material apresenta tamanho na faixa de 0,2 – 2 milímetros após

moagem e trituração. A eficácia deste tipo de pré-tratamento depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa.

No tipo físico-químico, os que merecem destaque são o de explosão a vapor e o AFEX (explosão das fibras com emprego de amônia). O pré-tratamento com explosão a vapor requer pouco ou nenhum produto químico e, justamente por este motivo, não gera grandes problemas ao ambiente, quando comparado com a tecnologia ácida (Kaar, *et al.*, 1997). Sabe-se que este tipo de pré-tratamento é mais eficaz se a etapa seguinte for a hidrólise ácida, pois o ácido aplicado à biomassa neste processo potencializa a degradação da hemicelulose (Knappert *et al.*, 1980).

A explosão de vapor inicia-se, geralmente, com temperaturas na faixa de 160 – 260°C. Em razão da alta temperatura empregada, há degradação da hemicelulose e transformação da lignina, beneficiando a etapa de hidrólise (Sun e Cheng, 2002). Um aspecto negativo deste tipo de pré-tratamento é a utilização de alta temperatura, que pode causar também degradação da celulose, o que não é interessante para o processo de conversão do material em etanol.

Já o pré-tratamento AFEX emprega amônia a alta temperatura e pressão e, em seguida, a pressão é reduzida. Temperatura de 90°C e tempo de 10 - 60 minutos são empregados, utilizando-se de 1 a 2 kg de amônia/kg de biomassa seca, sendo, por isto, considerado um processo poluente. Além disto, não é considerado muito eficiente quanto à solubilização da hemicelulose quando comparado à pré-tratamentos ácidos e, caso o material apresente alto teor de lignina, seu desempenho também é reduzido. Segundo Sun e Cheng (2002), este processo não gera inibidores que possam afetar processos biológicos.

Microorganismos, como o bolor branco, são utilizados para degradar a estrutura do material que se deseja processar quando são considerados pré-tratamentos biológicos, os quais geram deslignificação e reduzem o grau de polimerização da celulose e hemicelulose. Sua vantagem reside na necessidade de pouca energia para o processo, além de não afetar de maneira significativa o ambiente e não precisar de aplicação de produtos químicos. No entanto, é um processo que costuma ser demorado (Sun e Cheng, 2002).

Pré-tratamentos químicos ocasionam deslignificação, diminuição da cristalinidade da celulose e inchaço da amostras, redução do grau de polimerização e aumento da

porosidade. Como exemplos, têm-se os métodos organosolv, pirólise, ácido diluído, alcalino e oxidativo.

Organosolv emprega solventes orgânicos que devem ser removidos ao final do processo para que não ocorra inibição na hidrólise enzimática e fermentação. A tecnologia ácida utiliza ácidos concentrados como H_2SO_4 e HCl que devem ser recuperados ao final para que esta técnica seja considerada economicamente viável e ambientalmente sustentável.

Na pirólise, os materiais são tratados com temperaturas maiores que $300^\circ C$ e a celulose decompõe-se rapidamente, gerando produtos gasosos. O processo pode ser incrementado com a presença de oxigênio no meio reacional, mas é considerado de baixa eficiência, já que ocorre perdas dos açúcares e a formação de inibidores de fermentação.

O pré-tratamento com ácido diluído é realizado introduzindo o material que se deseja deslignificar em uma solução ácida e em seguida, este material deve ser seco à temperatura entre 140 a $200^\circ C$ durante aproximadamente 1 h. É utilizado ácido sulfúrico com concentração de 0,05 a 0,07%. Ao final do processo, este material deve ser recuperado, para evitar contaminações posteriores e não dificultar o processo de hidrólise e fermentação (Palmqvist e Hahn-Häerdal, 2000).

O processo alcalino é um método vantajoso comparado ao ácido, pois há menor degradação dos açúcares. A formação de furano nesse processo pode ser evitada, além permitir a recuperação de muitos sais cáusticos. Este tipo de pré-tratamento diminui a cristalinidade da biomassa e da lignina de maneira mais eficiente do que em outros pré-tratamentos (Sun e Cheng, 2002).

Kong *et al.* (1992) demonstraram que a tecnologia alcalina remove grupos acetila e, principalmente, xilana, da hemicelulose e, assim, há redução do impedimento estérico das enzimas hidrolíticas e a digestibilidade dos carboidratos é reforçada.

Já o oxidativo considera o peróxido de hidrogênio como seu agente. Segundo Azzam (1989), cerca de 50% da lignina e da hemicelulose do bagaço de cana podem ser solubilizados com 2% de peróxido de hidrogênio a $30^\circ C$ no decorrer de 8 h. Na etapa seguinte, quando empregada sacarificação pela ação da celulase a $45^\circ C$ durante 24 h, obtem-se 95% de eficiência na produção de glicose a partir da celulose. Isto demonstra que

o pré-tratamento oxidativo pode ser um meio eficiente quando se deseja quebrar as cadeias lignocelulósicas, visando etapas posteriores de hidrólise e fermentação.

Outros trabalhos também tratam da aplicação do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio. Segundo Gould (1984), cerca de metade da lignina e grande quantidade de hemicelulose de materiais lignocelulósicos, como palha e outros resíduos de agricultura, foram solubilizados quando aplicado pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino com concentração de 1% (v/v) e pH ajustado em 11,5, a uma temperatura ajustada de 25°C por um período de 18 a 24h, obtendo-se rendimento em glicose de 100%. Krishna *et al.* (1998) obtiveram resultados satisfatórios quando folhas de cana-de-açúcar foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio alcalino. Este estudo resultou em rendimento de 92% na hidrólise de substrato pré-tratado a 50 °C e pH 4,5, utilizando-se celulase de *Trichoderma reesei* à 40 FPU/g substrato em 48h. No trabalho de Rabelo (2007), o bagaço de cana-de-açúcar foi pré-tratado com peróxido de hidrogênio com concentração de 7,355% (v/v) e pH ajustado em 11,5, temperatura de 25°C e tempo de reação de 1h, sendo possível obter resultados com rendimento de 84,07%.

2.4.1 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

2.4.1.1 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante mais forte que o cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio, e atua tanto em soluções ácidas como básicas. Pode também atuar como agente redutor na presença de agentes oxidantes mais poderosos. O H₂O₂ oxida efluentes desagradáveis sem que ocorra formação de subprodutos nocivos e, por isto, é cada vez mais usado como agente oxidante para controle da poluição (Atkins e Jones, 2001).

Apresenta grande aplicação química em agroquímica, epoxidação, peróxidos orgânicos e síntese química. Atua como agente microbicida no processo de produção de amido e gelatina, é empregado em indústrias de papel e celulose, açúcar e álcool e têxtil. Sem dúvida, o maior mercado onde o peróxido pode ser aplicado são as indústrias de papel e celulose, sendo utilizado como agente para branqueamento da polpa celulósica nas fases de extração e alvejamento final e na deslignificação. É muito eficiente nesta função e um

agente menos danoso à fibra celulósica, permitindo a aplicação para estes fins (Peróxido de hidrogênio, 2008).

Este oxidante também é muito utilizado no tratamento de efluentes industriais, pois remove substâncias indesejáveis como hipoclorito, sulfeto de hidrogênio, cianeto e substâncias orgânicas e também, por ter propriedades bactericidas, pode ser usado para desinfecção de água e comida (Thompson, 1995).

O peróxido, quando decomposto, libera calor e oxigênio molecular. Em soluções diluídas, o calor liberado é absorvido pela água presente no meio. Por outro lado, em soluções concentradas, a temperatura é aumentada, acelerando a taxa de decomposição do reagente. Na presença de contaminantes, a decomposição do H_2O_2 pode gerar aumento de alcalinidade e temperatura. A cada $10^\circ C$ de aumento de temperatura, a taxa de decomposição eleva-se, aproximadamente, 2,5 vezes (Mattos et al., 2003).

2.4.1.2 Síntese do peróxido de hidrogênio

O processo de síntese do peróxido de hidrogênio pode ocorrer de diferentes maneiras com distintas características.

A síntese direta de peróxido de hidrogênio a partir de oxigênio e hidrogênio é uma alternativa atraente, que tem sido investigada há muitos anos. Contudo, devido a problemas relacionados à segurança física de pessoas e instalações e, também, à seletividade de catalisadores, este processo não é ainda muito utilizado em escala comercial. Os problemas deste método estão diretamente relacionados ao fato de a mistura de H_2/O_2 ser altamente explosiva quando se utilizam altas concentrações de hidrogênio. Outro fator que gera influência no método, ocasionando possíveis explosões, consiste na baixa seletividade dos catalisadores empregados na formação do peróxido de hidrogênio que é formado pela decomposição destes catalisadores e pela formação paralela de água. Porém, este quadro pode ser modificado em alguns anos, com melhorias no controle do processo produtivo e emprego de catalisadores mais eficazes. A Figura 2.7 representa a reação que descreve a síntese direta do peróxido de hidrogênio.

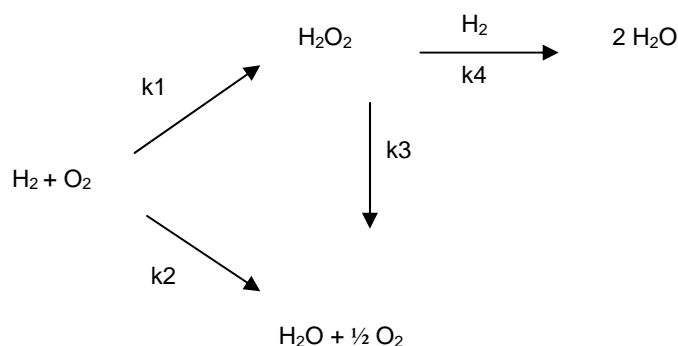


Figura 2.7: Esquema simplificado da reação de síntese direta de H_2O_2 (Pashkova *et al.*, 2008).

No processo de síntese do peróxido de hidrogênio são adicionados estabilizadores especiais, pois inibem a decomposição catalítica causada pelo efeito de metais, luz UV e outras impurezas presentes no reagente que podem contaminá-lo durante a estocagem ou manuseio.

Outra maneira de produção do peróxido de hidrogênio se dá pelo “método da solução orgânica de quinona”, mas apresenta limitações. Emprega solventes complexos que apresentam alto custo e, por isto, se torna economicamente viável somente para produção em larga escala.

Várias etapas de auto-oxidação são utilizadas para produzir H_2O_2 em escala industrial. Segundo a metodologia de fabricação utilizada por um grupo internacional denominado Solvay, as etapas podem ser divididas em hidrogenação, oxidação, extração, destilação e regeneração.

Na hidrogenação, representada pela Figura 2.8, as reações são realizadas em reator, onde a solução de quinona é introduzida em um reator vertical sob pressão de hidrogênio na presença de catalisador. Após sua hidrogenação, a solução orgânica é separada do catalisador através de filtração e o catalisador reenviado ao hidrogenador. A solução filtrada passa para a etapa seguinte, a oxidação.

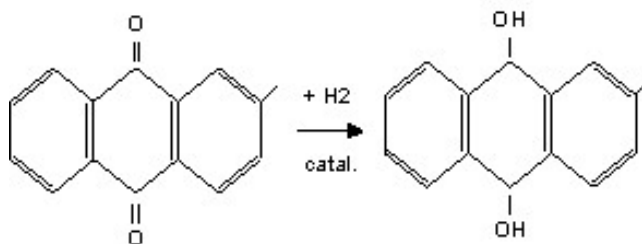


Figura 2.8: Reação catalítica de fixação de hidrogênio em quinona (Fabricação do peróxido, 2008).

A solução orgânica hidrogenada passa por um processo de oxidação com ar em coluna vertical, em condições de pressão e temperatura que proporcionem bom desempenho do processo. Oxigênio é fornecido para a solução, permanecendo o peróxido de hidrogênio dissolvido na solução orgânica.

A etapa de oxidação apresenta uma unidade de recuperação de solventes por processo de adsorção sobre carvão ativo. Isto evita a emissão e perda de compostos orgânicos. Esta etapa pode ser observada pela reação representada na Figura 2.9.

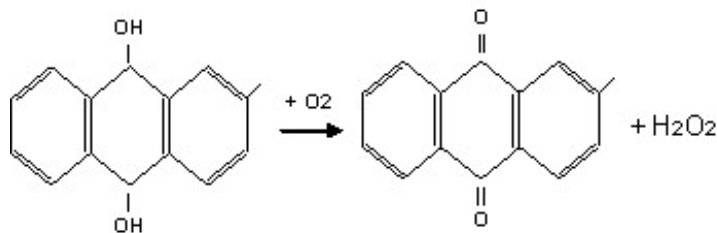


Figura 2.9: Reação entre solução orgânica de quinona e oxigênio, resultando em H_2O_2 dissolvido (Fabricação do peróxido, 2008).

Em seguida, o H_2O_2 oxidado é extraído da solução orgânica com água desmineralizada. Esta etapa ocorre em contracorrente e coluna de pratos perfurados. Após extração, a solução de quinona retorna para o processo de hidrogenação. Assim, inicia-se um ciclo desta solução, que circula sempre no sentido hidrogenação-oxidação-extração.

Por fim, o peróxido que foi sintetizado é destilado em colunas de pratos perfurados a vácuo e o aquecimento ocorre em “boiler” a vapor. Pela destilação é possível obter soluções de peróxido em quantidades e concentrações diferenciadas.

A etapa de regeneração não faz parte de forma direta do processo de síntese do peróxido de hidrogênio. Esta etapa tem por finalidade regenerar compostos quinônicos que

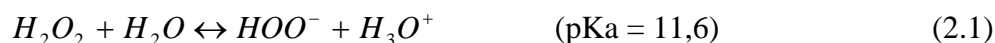
foram degradados pelos processos de hidrogenação e oxidação sucessivos, os quais não participam ou contribuem para a formação de H_2O_2 . Isto ocorre quando uma parte da solução orgânica é enviada para a etapa de regeneração de maneira contínua e, nesta etapa, os compostos degradados são constantemente regenerados por um tratamento químico da solução (Fabricação do peróxido, 2008).

2.4.1.3 Características do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

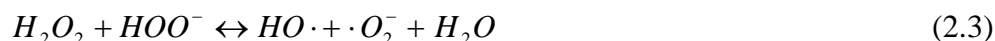
O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino é um pré-tratamento químico. Como tal, tem como finalidade remover a lignina presente nos materiais lignocelulósicos, mas sem afetar a cadeia celulósica. Sabe-se que pré-tratamentos oxidativos degradam ou removem mais lignina que um pré-tratamento alcalino. Quando se fala em pré-tratamento com peróxido, tem-se um tratamento que engloba tanto aspecto alcalino quanto oxidativo e apresenta a capacidade de remover aproximadamente metade da lignina presente no material em que é aplicado.

Para melhor compreensão dos mecanismos de degradação da lignina e subsequente solubilização da hemicelulose, é imprescindível conhecer as reações envolvidas na decomposição do peróxido de hidrogênio (Gould, 1985).

Quando H_2O_2 reage com água, tem-se a seguinte reação:



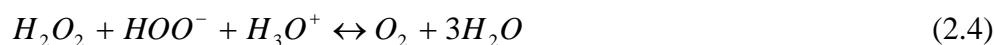
A deslignificação de resíduos provenientes de atividades aplicadas à agricultura com peróxido de hidrogênio é fortemente dependente do pH do meio. Seu melhor desempenho ocorre em meio alcalino, mas especificamente em pH na faixa de 11,5-11,6. Nesta faixa de pH, o mecanismo para a oxidação da lignina gera a formação de espécies químicas (radicais) altamente reativas. As reações químicas, que ocasionam a formação de espécies reativas, estão dispostas a seguir:



Sob condições alcalinas, observa-se a formação do íon peroxidrila HOO^- . Quando o peróxido sofre decomposição, que pode ser acelerada em presença de luz, alto pH, aquecimento ou presença de metais de transição, há formação de oxigênio e água.

Se houver aumento de pH ou aquecimento, principalmente na faixa de 110 a 120°C, o peróxido de hidrogênio é decomposto instantaneamente. Esta reação torna-se mais rápida se o pH atingir o pKa, que é de 11,6 a 25°C (Legrini e Braun, 1993; Thompson, 1995).

A reação de decomposição pode ser observada a seguir:



Com a adição de uma base ao peróxido de hidrogênio, sendo que a mais comumente utilizada é hidróxido de sódio, há formação de uma solução com alto poder deslignificador. Os radicais hidroxil ($HO\cdot$) e superóxido ($\cdot O_2^-$), decorrentes da decomposição do peróxido de hidrogênio, são responsáveis pela oxidação da lignina e dissolução da hemicelulose (Fang *et al.*, 1999).

Gould (1984) relatou que soluções alcalinas diluídas a partir de uma solução mais concentrada de peróxido de hidrogênio removem cerca de metade da lignina presente em materiais como palha de trigo, aumentando no meio reacional a quantidade de resíduos insolúveis ricos em celulose que podem ser convertidos em glicose.

O pré-tratamento com peróxido também atua sobre a hemicelulose. A degradação ou oxidação da hemicelulose é significativa quando se trata de pré-tratamentos que empregam ácidos monocarboxílicos como o fórmico, acético e láctico. Entretanto, quando se trata do emprego de peróxido de hidrogênio alcalino, a hemicelulose é somente solubilizada ou parcialmente degradada.

A utilização de H_2O_2 influencia também a etapa seguinte ao pré-tratamento, a hidrólise. Nesta etapa, há liberação de carboidratos ocasionada por processos de oxidação decorrentes da utilização do peróxido na etapa anterior.

2.5 Hidrólise

A biomassa pode ser convertida em etanol através de processos ácidos ou enzimáticos. O material, primeiramente, deve ser processado de forma que ocorra redução de suas partículas, a fim de facilitar seu manuseio. Em seguida, ácidos ou as enzimas são utilizadas como catalisadores para separar ou hidrolisar as cadeias de hemicelulose e celulose para formar seus respectivos açúcares.

Segundo Zhu (2008), é importante investigar a influência de alguns aspectos sobre a taxa de hidrólise para compreender a relação entre as características estruturais e a digestibilidade. Contudo, ainda existem algumas discrepâncias que têm sido notificadas sobre a maneira como a deslignificação e o processo de diminuição da cristalinidade atuam sobre a digestibilidade da biomassa e, como consequência, afetam também o desenvolvimento da hidrólise.

As hidrólises ácidas e enzimáticas têm sido estudadas há anos. A hidrólise ácida é um método antigo (1819) e foi operado primeiramente na Alemanha, Japão, Estados Unidos e Brasil (Galbe e Zacchi, 2002). É relativamente eficiente, mas gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior, havendo também a possibilidade de degradação da glicose formada (Klinke et al., 2003). Durante este tipo de hidrólise, a hemicelulose é solubilizada mais rapidamente que a celulose e, desta forma, toda a xilose produzida é totalmente decomposta em furfural, o que acaba causando problemas de inibição microbiana.

A sacarificação ácida pode empregar ácido sulfúrico diluído ou outro ácido a altas temperaturas (em torno de 240°C) com o intuito de hidrolisar tanto a celulose quanto a hemicelulose. Mas, por se tratar de um método severo, degrada os açúcares e rendimentos acima de 60% não são atingidos. Há também o emprego de ácidos concentrados como catalisadores na hidrólise, mas com temperatura inferior àquela utilizada com ácidos diluídos. O processo com ácido concentrado alcança elevados rendimentos, o que o torna economicamente viável, mas o ácido deve ser recuperado por motivos ambientais e econômicos. A concentração de ácido, por se tratar de um catalisador rápido, precisa ser bem controlada, assim como o tempo de reação e temperatura, para que não ocorram reações indesejáveis (Wright, 1983; Wright, 1988).

Já o catalisador enzimático, tem a particularidade de ser muito específico, pois só pode ser utilizado em meios compatíveis à sua atividade, além da sua atuação ser mais lenta. Pode também sofrer inibições e, desta maneira, os procedimentos necessários na sua utilização são mais complexos.

O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperatura, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente (Szczo drak e Fiedurek, 1996; Wyman, 1999; Riley, 2002; Leathers, 2003). Assim, é interessante o desenvolvimento de pesquisas nesta área, já que é uma tecnologia mais complexa e que precisa de estudos a fim de simplificá-la e viabilizá-la. Mais informações sobre este tipo de hidrólise serão elucidadas na seção 2.5.1.2.

2.5.1.1 Enzimas

As enzimas são utilizadas como catalisadores em muitas reações. Sua estrutura é composta, em grande parte, por proteínas, podendo estar ligadas a carboidratos e lipídeos. Sua forma de utilização mais difundida é do tipo extracelular de origem microbiana. Um tipo de enzima bastante difundido quando se trata de conversão de materiais lignocelulósicos em glicose é a celulase. Esta enzima, na verdade, é um complexo enzimático produzido por ação de fungos ou bactérias do tipo *Trichoderma reesei*, *Humicola insolens*, *Penicillium pinophilum* (fungos) e *Cellulomonas fimi*, *Clostridium thermocellum* (bactérias) (Wood e Bhat, 1988; Ward, 1989). O complexo enzimático de celulase atua mais eficientemente sobre celulose nativa ou cristalina (Wood e McCrae, 1979).

A celulase ocasiona a hidrólise da celulose, gerando celobiose, que por sua vez é transformada em glicose, que, pelo processo de fermentação, pode ser convertida em etanol. Este complexo enzimático é formado por três enzimas principais: endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase e β -glicosidade ou celobiase.

As enzimas atuam de modo sinérgico para que ocorra degradação da celulose. As endoglucanases agem sobre a biomassa de maneira que ocorra quebra da sua estrutura, criando extremos, facilitando a atuação das exoglucanases. A ação sinérgica termina quando a cadeia de celulose é finalmente degradada à celobiose. Os produtos finais da

sacarificação exercem efeito inibitório sobre as enzimas de maneira que a exoglucanase é inibida pela celobiose (inibidor competitivo) e as β -glicosidades e algumas celulases são inibidas pela glicose (Dekker, 1989). A Figura 2.10 é uma representação de uma celulase.

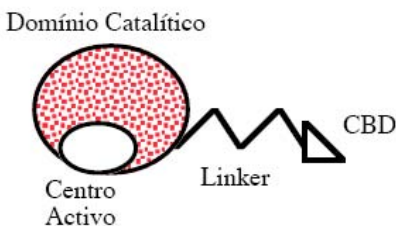
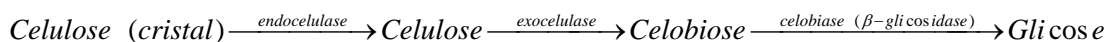


Figura 2.10: Representação esquemática de uma celulase (Cavaco-Paulo, 1995).

As cadeias de celulose sofrem cisão hidrolítica no centro ativo do domínio tridimensional catalítico. As celulases apresentam dois domínios funcionais. A maior parte da proteína é formada pelo domínio catalítico e o outro é o domínio de ligação à celulose ou Core Binding Domain (CBD), que é responsável pela ligação da enzima ao substrato. O linker é uma seqüência glicosídica que faz a ligação dos dois domínios (Cavaco-Paulo, 1995).

As endoglucanases são capazes de hidrolisar as bandas β (1-4) randômicas por toda a cadeia de celulose e são responsáveis pelo rompimento das ligações poliméricas que conferem estrutura cristalina à celulose. Têm como principal objetivo hidrolisar o meio da cadeia de celulose, em regiões amorfas ou nas superfícies das microfibras, formando cadeias terminais de menor peso molecular, celodextrinas e celobiose.

As exoglucanases são enzimas que clivam os segmentos expostos pela ação das endoglucanases, agindo sobre as extremidades da cadeia, mais precisamente nas regiões cristalinas da celulose, sem a interferência das endoglucanases. Desta forma, há a formação de celobiose que é transformada em glicose pelas β -glicosidades, completando, assim, o processo (Wood e Bhat, 1988; Bhat and Bhat, 1997; Mani et al., 2002).



Conforme a hidrólise se processa, há a formação de celobiose e glicose no meio reacional, e, desta maneira, a atividade das exoglucanases e β -glicosidades é inibida por estes dois produtos, principalmente pela celobiose, diminuindo o rendimento do processo de sacarificação.

Para aumentar a eficácia na utilização da celulase e, conseqüentemente, o desenvolvimento da hidrólise, é importante desenvolver microorganismos recombinantes que forneçam algumas das enzimas necessárias para a solubilização da celulose ou adicionar mais β -glicosidade ao complexo de celulase, fora a já presente neste complexo. Assim, há minimização de acúmulo de produtos solúveis inibitórios e redução da necessidade de grandes quantidades de celulase (Ingram e Doran, 1995).

O principal problema no emprego das enzimas para a hidrólise de materiais lignocelulósicos é o seu custo, que costuma ser bastante elevado, de modo que a busca por novas enzimas com a mesma eficiência que as já utilizadas é a chave para superar os gastos destinados a este processo ou, outra possível forma de reduzir custos, é a reutilização as enzimas, mas sabe-se que , quando reutilizadas, perdem a sua eficiência inicial.

2.5.1.2 Hidrólise enzimática

É uma das etapas do processo de conversão de celulose a etanol, sendo considerada a mais seletiva quando se trata de conversão de biomassas. Visa a quebra da celulose em seus monômeros constituintes, requer condições brandas de temperatura e pH, além de não gerar produtos que inibem a fermentação posterior dos açúcares (Carrillo *et al.*, 2005). Alguns fatores como porosidade (área superficial acessível), cristalinidade das fibras de celulose e conteúdo de lignina e hemicelulose do material de estudo devem ser levados em consideração, pois influenciam a cinética do processo.

Este tipo de hidrólise é catalisada pelas enzimas celulasas. As enzimas utilizadas na hidrólise apresentam custo elevado, o que torna a hidrólise enzimática ainda economicamente inviável. Pesquisas têm sido realizadas com o intuito de minimizar estes custos através de estudos focados na produção de enzimas, principalmente nos Estados Unidos. Uma vez conseguido o objetivo de produzir enzimas a custos mais acessíveis, será difícil desenvolver outro processo mais competitivo.

A tecnologia enzimática é uma forma interessante para produzir açúcares a partir de resíduos de celulose, uma vez que utiliza condições de operação brandas em relação à temperatura, pressão, agressividade química, além de ser um processo menos poluente comparado a outros tipos existentes. É considerado um processo lento e pouco econômico, já que é afetado pela cristalinidade da celulose, proteção da lignina e pelas configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina (Tsao, 1978). Por isso, a eficácia na etapa de pré-tratamento é fundamental para melhorar o desempenho deste processo.

A hidrólise requer ações sinérgicas de vários componentes da celulase em sistemas de reações heterogêneas. Isto determina que os mecanismos da reação hidrolítica sejam altamente complexos, o que dificulta a modelagem matemática (Gan *et al.*, 2003). A presença de lignina e hemicelulose afetam a ação do complexo enzimático na estrutura da celulose e, como conseqüência, há diminuição da eficiência da hidrólise. O aumento da porosidade na etapa de pré-tratamento, a remoção de lignina e hemicelulose, além da diminuição da cristalinidade da celulose, auxiliam de maneira positiva o andamento da hidrólise (McMillan, 1994).

Os fatores limitantes que afetam a hidrólise da biomassa têm sido tradicionalmente divididos em dois grupos: as características estruturais da biomassa e o mecanismo enzimático. Entretanto, a natureza heterogênea da biomassa e a multiplicidade de enzimas tornam dificultosa a compreensão das interações das enzimas e substratos. Quando a dificuldade de difusão da enzima e o produto de inibição são eliminados com baixa concentração de substrato, a hidrólise enzimática da biomassa depende da acessibilidade e eficiência da enzima (Lee e Fan, 1983).

Quando a hidrólise enzimática se processa, observa-se, por meio de gráficos de conversão de açúcares *versus* tempo de reação, que há não-linearidade no decorrer da reação. Isto indica que a uma dada concentração de enzima, a velocidade de reação diminui antes mesmo de todo o substrato ser consumido. Alguns fatores colaboram para este comportamento como, por exemplo, a inibição por produto final obtido; baixa reatividade do substrato, principalmente devido à sua alta cristalinidade, alto teor de lignina e baixa acessibilidade; perda de enzima gerada por adsorção irreversível e inativação das enzimas ocasionada por condições que não são devidamente controladas no decorrer da hidrólise enzimática. A Figura 2.11 representa como a hidrólise enzimática da celulose se processa.

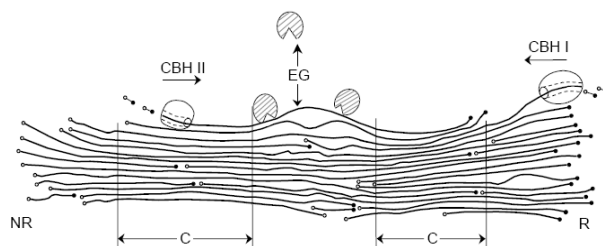


Figura 2.11: Representação esquemática da hidrólise da celulose. C: regiões cristalinas, R: grupos terminais reductores, NR: grupos terminais não-reductores, CBH I e II: exoglucanases, EG: endoglucanase (Teeri, 1997).

As celobiohidrolases 1,4- β -D-glucana-celobiohidrolase I (CBH I) e 1,4- β -glucana-celobiohidrolase II (CBH II) ou também chamadas de exoglucanases de *Trichoderma reesei* apresentam estrutura tridimensional. A maneira como estas enzimas atuam são diferentes. A CBH I é utilizada para iniciar a redução dos grupos terminais reductores (R) da cadeia de celulose, enquanto que a CBH II atua em direção oposta, sobre os grupos terminais não-reductores (Rouvien *et al.*, 1990; Divne *et al.*, 1994). Com base nas estruturas dos seus sítios ativos, CBH I e CBH II têm sido empregadas na hidrólise de cadeias de celulose, mas CBH I é utilizada em maior proporção. A celulase é formada por cerca de 60% e 20% de CBH I e CBH II, respectivamente, e 15% de endoglucanase (EG) (Divne *et al.*, 1994).

É importante salientar, quando se trata de hidrólise enzimática, que, sendo o substrato insolúvel, há adsorção da enzima na superfície do substrato. A adsorção divide-se em três tipos: reversível, irreversível ou semi-reversível. A adsorção irreversível da celulase e a formação do complexo enzima-substrato são considerados pontos críticos no processo de sacarificação da celulose. Segundo Converse (1993), este tipo de adsorção das celulases à lignina resulta em queda na taxa de reação da hidrólise enzimática.

Muitos autores acreditam que a taxa de hidrólise é proporcional à quantidade de enzima adsorvida na superfície do substrato (Lee e Fan, 1983; Sattler *et al.*, 1989). Neste contexto, sabe-se que as enzimas adsorvidas podem retornar para a solução durante a hidrólise (Converse *et al.*, 1988; Nidetzky e Steiner, 1993). A inativação das enzimas adsorvidas (Converse *et al.*, 1988), a instabilidade térmica das celulases (Carminal *et al.*, 1985), a forte inibição por produto decorrente da formação de celobiose e glicose (Lee e

Fan, 1983) e a heterogeneidade do substrato (Sattler *et al.*, 1989) podem ser considerados como fatores que diminuem a taxa de reação.

Segundo Lee e Fan (1983), a taxa da hidrólise enzimática depende da adsorção da enzima e de sua eficiência quando adsorvida, em vez da transferência de massa difusiva causada pela enzima. Quanto maior a remoção da lignina, melhor a eficiência da enzima, já que há maior facilidade da atuação da enzima sobre a holocelulose (hemicelulose + celulose).

Estudos já sugeriram que a celulase que é adsorvida na superfície da celulose passa a realizar uma série de reações catalíticas enquanto se movimenta ao longo da superfície. Outros sugerem uma abordagem mais dinâmica em que a enzima, após efetuar sua ação catalítica, pode ser desorvida do substrato e deslocada para outra parte do material, sendo neste local adsorvida novamente. 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 reutilizadas (Gan *et al.*, 2003).

2.6 Cinética enzimática

Muitos estudos da cinética da hidrólise da celulose têm sido realizados, mas a compreensão das interações dinâmicas da interface e a influência destas interações sobre a reação de cinética ainda permanecem inconclusivas e limitadas. Existem algumas semelhanças entre os estudos, mas ainda há grande divergência nos conceitos relacionados com a ação sinérgica dos diferentes componentes da enzima celulase, com o efeito da mudança estrutural da celulose durante uma reação contínua e com os mecanismos de inibição da enzima por produtos intermediários das reações, como a celobiose, e produtos finais, como a glicose. Fatores como estes determinam a instabilidade e a natureza dinâmica das reações cinéticas da hidrólise da celulose.

Vários modelos cinéticos têm sido satisfatórios quando se trata de prever taxas iniciais das reações de hidrólise da celulose. Dentre os modelos propostos, o mais difundido e mais simples é o de Michaelis-Menten, que foi originalmente desenvolvido para um sistema de reações homogêneas. Entretanto, ao se considerar a hidrólise enzimática de celulose, este modelo não representa o sistema de maneira real, uma vez que considera que

a hidrólise de bagaço é heterogênea e não considera as múltiplas reações que podem ocorrer no meio reacional. Se o objetivo é prever a produção de açúcares redutores durante tempos de duração longos, há discrepâncias, principalmente devido à evolução da reação causada pelas mudanças de estrutura do substrato e a perda da atividade enzimática (Gan *et al.*, 2003).

É importante que uma representação matemática de uma reação cinética leve em consideração informações a respeito do sistema catalítico da enzima a fim de abranger todos os aspectos da reação, mas também é essencial que não seja demasiadamente complexa (Gan *et al.*, 2003). Fatores como inibição por produto, transferência de massa, adsorção da enzima pelo material, desativação da enzima e características da biomassa podem ser considerados.

Muitos trabalhos considerando estudos cinéticos já foram realizados. Foram comparadas as atividades de diferentes complexos enzimáticos (Saddler *et al.*, 1986), foi avaliado o desenvolvimento dos mecanismos das celulasas (Beldman *et al.*, 1985), assim como foram propostos modelos cinéticos que podem ser empregados para prever a taxa de sacarificação aplicada a um determinado composto (Matsumo *et al.*, 1984).

Os estudos em geral resultam em modelos distintos, cuja diferenciação é feita em relação à composição das enzimas e como atuam sobre o substrato, à estrutura do substrato e à inibição que pode ocorrer no meio. Mesmo com muitos estudos direcionados à esta temática, existem divergências entre eles e, desta maneira, o mecanismo completo da celulase ainda não é conhecido (Ortega *et al.*, 2001). Ainda, a maioria dos estudos existentes na literatura considera outras matérias-primas que não o bagaço de cana.

Entre os modelos encontrados na literatura para descrever a cinética de hidrólise enzimática podem ser citados o de Ghose e Das (1971), que consideraram uma expressão cinética de primeira ordem para descrever a hidrólise da casca de arroz. Além deste, Dwivedi e Ghose (1979) estudaram a hidrólise do bagaço de cana com pré-tratamento alcalino e concluíram que os dados seguiram um modelo cinético de Michaelis-Menten com inibição competitiva. Outro modelo é o HCH-1, um dos mais complexos desenvolvidos para hidrólise de material lignocelulósico, proposto por Holtzapple *et al.* (1984), não aplicado ao bagaço de cana, mas à palha de milho. Este modelo considera o mecanismo de Michaelis-Menten e inibição não-competitiva por celobiose e glicose.

2.7 Cinética do pré-tratamento

Estudos cinéticos aplicados ao pré-tratamento ainda não são muito difundidos, o que torna interessante pesquisa neste sentido. É importante estudar detalhadamente o pré-tratamento a fim de tirar todos os dados cinéticos possíveis para uma posterior modelagem. Encontram-se na literatura alguns estudos de cinética de deslignificação durante o pré-tratamento como o de Violette (2003), que testou o efeito de aditivos para potencializar a reação de deslignificação de polpa celulósica, e o estudo de Kim e Holtzaple (2006), que aborda deslignificação da palha de milho ocasionada pelo emprego de hidróxido de cálcio.

Entretanto, não se encontram estudos que quantifiquem a composição do bagaço de cana-de-açúcar com variação do tempo na etapa de pré-tratamento. Desta maneira, o presente trabalho tem como um dos objetivos o estudo cinético do pré-tratamento, através da quantificação de celulose, hemicelulose e lignina ao longo do tempo sob variação de temperatura. Na seção 4.6.1, os perfis de cada componente serão avaliados e discutidos.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Material de estudo

3.1.1 Matéria-prima para o estudo

A matéria-prima para as análises foi bagaço de cana-de-açúcar resultante da última moenda, não-queimado, fornecido por meio de colheita mecanizada, da safra de outubro de 2007, proveniente da Usina da Pedra, localizada em Serrana, interior do estado de São Paulo.

3.1.1.1 Preparação da matéria-prima para o estudo

Antes que se utilizasse o bagaço para qualquer análise, este material foi seco ao tempo (por um período de quatro dias), moído em moinhos de facas Wiley Mill modelo n° 3 e de martelo General Eletronic durante 10 minutos em cada moinho, para que apresentasse maior uniformidade. Posteriormente, foi peneirado usando peneira Tyler 35 (em torno de 0,5 mm) para todas as análises, exceto para a determinação de extrativos, e armazenado em freezer em sacos plásticos hermeticamente fechados e identificados. A Figura 3.1 mostra o bagaço empregado nas análises.



Figura 3.1: (a) Bagaço moído e não peneirado e (b) Bagaço moído e peneirado.

3.2 Materiais

3.2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados para os experimentos estão dispostos a seguir:

- Água destilada;
- Água deionizada (utilizada como fase móvel nas análises em HPLC);
- Peróxido de hidrogênio da marca Ecibra com 95% de pureza;
- Hidróxido de sódio da marca Nuclear com 95-100% de pureza;
- Kit Glicose God-Pap da marca Laborlab;
- Fenol da marca Vetec com 99% de pureza;
- Tartarato de sódio e potássio tetra hidratado de marca Synth com 99% de pureza;
- Ácido dinitro-3,5-salicílico da marca Vetec com 99% de pureza;
- Ácido cítrico monohidratado da marca Dinâmica com 99,5% de pureza;
- Ácido clorídrico da marca Merck com 37% de pureza;
- Ácido sulfúrico da marca Merck com 95 - 98% de pureza;
- Padrões: D-(+)-glicose da marca Merck com pureza $\geq 99\%$, D-(+)-celobiose de marca Fluka, DL-xilose de marca Fluka, D-manose de marca Chem Service, DL-arabinose de marca Sigma;
- Filtros de papel n° 1 da marca Whatman;
- Filtros CA para seringa com poros de 0,45 μm da marca Whatman;
- Seringa Hamilton 25 μL .

3.2.2 Equipamentos

Os equipamentos que foram utilizados para os experimentos encontram-se a seguir:

- Agitador eletromagnético Bertel;
- Peneiras Bertel arredondadas de diferentes malhas;
- Balança Marte com precisão de $\pm 0,01$ g;
- Balança analítica Bel Engineering com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Estufa de secagem modelo MA-035/2 Marconi;
- Incubadora com controle de temperatura (shaker) e com agitação orbital modelo MA-832 Marconi;
- Banho ultratermostatizado modelo MA-184 Marconi;
- Agitador mecânico modelo MA-259 Marconi;
- Agitador magnético com aquecimento modelo MA-085 Marconi;
- Espectrofotômetro 600S Femton com precisão na terceira casa decimal;
- Espectrofotômetro UV-vis Mini-1240 Shimadzu com precisão na quarta casa decimal;
- Mufla modelo Q-318D24 Quimis;
- Bateria de extração (aparelho soxhlet) modelo MA-188 Marconi;
- Medidor de pH Marconi com precisão de 0,01;
- Coluna Sugar Pack KS801, fluxo 0,5 mL/min;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) com injetor manual, detector de índice de refração modelo 2410, bomba de injeção modelo 515 e software Millennium 32.
- Difratorômetro DMAX220 Rigaku Co., gerador de voltagem de 40 kV, corrente de 20 mA, faixa de varredura de 10 a 60 (2θ), com passo mínimo de 0,02°, com radiação Cu-K α de 1,54 Å e filtro de Ni.

3.3 Procedimentos experimentais desenvolvidos

3.3.1 Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

3.3.1.1 Efeito da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio alcalino

O trabalho de Rabelo (2007) determinou as condições ótimas para pré-tratamento de bagaço de cana com peróxido de hidrogênio alcalino: 1 h de reação, 25°C, 4 g de bagaço de cana-de-açúcar não-peneirado em 100 mL de solução de peróxido de hidrogênio com concentração de 7,355% e pH de 11,5. Este estudo, no entanto, foi feito para bagaço de cana proveniente de usina e safra diferentes do usado no presente trabalho, além do bagaço usado no trabalho de Rabelo (2007) não ser moído, não apresentar granulometria específica, bem como ser obtido através de cana queimada e colheita manual. Trabalhando com bagaço moído, peneirado, de colheita mecanizada e de outra procedência, foi necessário um estudo para determinar se as condições ótimas de Rabelo (2007) continuavam sendo válidas.

Foram feitos, então, diferentes experimentos: um reproduzindo as condições de Rabelo (2007) e outros dois aumentando a concentração de bagaço e concentração de peróxido de hidrogênio alcalino no pré-tratamento. A concentração foi aumentada até o máximo que se conseguiu trabalhar, correspondendo à 8% (m/m), com o objetivo de se obter maior massa de bagaço pré-tratado para os estudos de hidrólise.

Ao aumentar a concentração de bagaço, foi necessário avaliar se o fator que influencia o pré-tratamento é a concentração de peróxido em solução ou o volume de peróxido/g bagaço. No caso de ser a concentração, mesmo dobrando a massa de bagaço, poderia ser mantida a mesma concentração de 7,355% de H₂O₂ (v/v). Se o volume de peróxido/g de bagaço é o fator com influência, dobrando a massa de bagaço seria necessário dobrar a concentração de peróxido. As condições dos três experimentos realizados foram as seguintes:

- (a) 4,0 g de bagaço e 7,355% de H₂O₂ (v/v) em 100 mL de solução, pH = 11,5;
- (b) 8,0 g de bagaço e 7,355% de H₂O₂ (v/v) em 100 mL de solução, pH = 11,5;
- (c) 8,0 g de bagaço e 14,710% de H₂O₂ (v/v) em 100 mL de solução, pH = 11,5.

Para esta análise e para as subseqüentes, após o pré-tratamento, a biomassa foi

lavada, inserida em estufa à 45°C e armazenada em potes plásticos para a etapa seguinte de hidrólise enzimática, realizada de acordo com o descrito na seção 3.3.4.

3.3.1.2 Estudo da influência da agitação no pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino

Considerou-se 8,0 g de bagaço de cana-de-açúcar com concentração de 5% (v/v) de peróxido de hidrogênio em 100 mL de solução e pH 11,5, somente com a finalidade de verificar a influência da agitação nesta etapa. O pré-tratamento foi realizado em incubadora com controle de temperatura (shaker), agitador mecânico, agitador magnético com auxílio de barra magnética e sem agitação. Os dados avaliados foram obtidos pela hidrólise enzimática, realizada de acordo com o descrito na seção 3.3.4.

3.3.1.3 Determinação da melhor concentração de peróxido de hidrogênio alcalino

Foi realizado um estudo mantendo-se a concentração de bagaço em 8% (m/m) e variando-se a concentração de peróxido de hidrogênio. Foram consideradas as concentrações de peróxido de 5, 8, 9, 10, 11 e 14% (v/v) em 100 mL de solução e pH 11,5. O objetivo foi determinar a mínima concentração de peróxido capaz de levar ao melhor rendimento possível na hidrólise. A hidrólise enzimática foi realizada de acordo com o descrito na seção 3.3.4.

3.3.2 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar e métodos analíticos

O bagaço já moído e peneirado passou por um processo de secagem em estufa a 105°C durante 24 h, a fim de se obter o teor de umidade. Para que o teor de umidade fosse obtido, foi utilizada a Equação 3.1. O termo a.s. indica o material em seu estado absolutamente seco.

$$\text{teor de umidade (a.s.) \%} = \frac{\text{massa do bagaço úmido} - \text{massa do bagaço a.s.}}{\text{massa do bagaço úmido}} \times 100 \quad (3.1)$$

Outras análises realizadas, destinadas à caracterização do bagaço de cana-de-açúcar, foram: determinação do teor de cinzas, determinação de extrativos, quantificação de lignina solúvel e insolúvel e quantificação de carboidratos.

Para a determinação do teor de cinzas, amostras em triplicata de 4 g de bagaço de cana-de-açúcar moído e peneirado foram lavadas, para que qualquer traço de areia fosse eliminado, e inseridas em mufla à temperatura ajustada de 550°C para que fossem incineradas por, aproximadamente, 6 h. A diferença entre as amostras iniciais e finais forneceu o teor de cinzas.

Na determinação de extrativos, a metodologia foi baseada nas normas NREL n°. 010 (2005) e na tese de Silva (1995). Foram consideradas amostras de 4 g do bagaço moído e não-peneirado. A extração foi realizada em aparelho soxhlet com 190 mL de álcool etílico 99,5% por 6 h. A análise foi feita em triplicata. Amostras finais e iniciais foram pesadas, subtraídas e, assim, o teor de extrativos foi determinado.

Com as amostras livres de extrativos, fez-se a quantificação de lignina solúvel e insolúvel. O conteúdo de lignina foi medido segundo as metodologias NREL n°. 003 (1995) e n°. 004 (1996). Pesou-se 0,3 g destas amostras em tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado 3 mL de solução de H₂SO₄ 72% (v/v) e foram colocados em banho ultratermostatizado com temperatura ajustada de 30°C por 1 h. A porção de lignina insolúvel foi obtida pela diferença entre o peso inicial e o resíduo ao término do processo. Com o filtrado gerado pelo processo, a porção solúvel foi quantificada em espectrofotômetro UV com leituras realizadas em 205 nm. Através da soma do teor de lignina solúvel e insolúvel obteve-se o conteúdo total de lignina.

A determinação de carboidratos também foi realizada com o filtrado proveniente da análise de lignina, seguindo-se a metodologia NREL n°. 002, 003, 017 e 019 (2006). Os carboidratos incluem amidos, celulose e açúcares como glicose (C₆H₁₂O₆), que contém um grupo aldeído, e frutose, um isômero estrutural da glicose, que possui um grupo cetona e, por isto, é considerada uma cetose. As leituras foram realizadas em HPLC com índice de refração.

O índice de cristalinidade para materiais lignocelulósicos fornece a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total. A cristalinidade da biomassa foi determinada através de um difratômetro de raios-X antes e após o pré-tratamento. Segundo Segal *et al.*

(1959), a porcentagem do material cristalino pode ser obtida pela equação:

$$CrI_B = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100\% \quad (3.2)$$

Esta fórmula relaciona a intensidade dos picos correspondentes às zonas cristalina (I_{002}) e amorfa (I_{am}) da celulose. Assim, a intensidade da zona cristalina (plano 002) corresponde à intensidade de $2\theta = 22,6^\circ$ e a intensidade da zona amorfa (plano am) corresponde à intensidade de $2\theta = 18,4^\circ$.

3.3.3 Atividade enzimática

Antes de iniciar o estudo aplicando as enzimas celulase e β -glicosidase, foram realizados ensaios destinados às atividades enzimáticas. Para isto, foi necessário preparar soluções com diferentes concentrações das enzimas em tampão citrato 0,5 mol/L. A atividade da celulase foi determinada como atividade de filtro de papel (Filter Paper Activity - FPA) pelo método de Ghose (1987), sendo medida em unidades de papel por mililitro da solução original da enzima não diluída.

Segundo Ghose (1987), uma unidade de atividade de enzima celulase (FPU) é baseada na liberação de 2 mg de açúcar reduzido como glicose equivalente, ou seja, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de filtro de papel por 0,5 mL de enzima diluída em uma reação com duração de 60 minutos. A Equação 3.3 foi utilizada para o cálculo da atividade da celulase (Ghose, 1987):

$$FPU / mL = \frac{2,0}{(0,18016 \times 0,5 \times 60 [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (3.3)$$

$$FPU / mL = \frac{0,037}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

A atividade da β -glicosidase é medida utilizando-se de uma solução de celobiose

15 mmol/L e é expressa em unidades de celobiose (CBU). A unidade de atividade de β -glicosidase representa a liberação de, exatamente, 1 mg de glicose, ou seja, 0,5/0,1816 μ mol de celobiose convertida por 1 mL de enzima diluída em uma reação com duração de 30 minutos. Assim, tem-se a Equação 3.4 para calcular a atividade da β -glicosidase (Wood e Bhat, 1988).

$$CBU / mL = \frac{0,5}{(0,1816 \times 1,0 \times 30 \times [\text{fator de diluição da enzima}])} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad (3.4)$$

$$CBU / mL = \frac{0,0926}{[\text{fator de diluição da enzima}]}$$

3.3.4 Hidrólise enzimática

Nos primeiros ensaios destinados ao estudo de variações no pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, a hidrólise enzimática se deu com amostras de 1 g de bagaço imersas em 300 mL de água destilada, com ajuste de pH em 4,8. Em seguida, estas amostras foram inseridas em incubadora, com rotação de 100 rpm e temperatura controlada de 50°C. A carga enzimática usada foi de 5 FPU de celulase e 1 CBU de β -glicosidase, mesmas condições usadas no trabalho de Rabelo (2007).

No decorrer da hidrólise, foram coletadas alíquotas do líquido reacional em intervalos de tempos de 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h e 72 h, sendo então fervidas por 10 minutos para inativação das enzimas, com o intuito de que a reação fosse finalizada. As enzimas utilizadas para esta etapa foram celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich ATCC 26921) incrementada com β -glicosidase de *Aspergillus niger* (Novozym 188).

Às amostras foi adicionado o mono-reagente presente no Kit Glicose GOD-PAP para quantificação de glicose. Para a quantificação de açúcares redutores totais (ART), foi utilizado o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Nos dois métodos utilizou-se banho ultratermostatizado para que a temperatura de 36°C se mantivesse constante no decorrer das reações para quantificação de glicose e 99°C para ART. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-vis com comprimento de onda de 540 nm.

3.3.5 Estudo para obtenção dos dados cinéticos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática e do bagaço de cana-de-açúcar

3.3.5.1 Avaliação do efeito da variação de temperatura no pré-tratamento

Para este estudo, o pré-tratamento foi realizado com 8 g de bagaço, concentração de peróxido de hidrogênio de 11% em 100 mL de solução com pH 11,5 e temperaturas de 25, 45 e 65°C. Os ensaios foram feitos em incubadora e em erlenmeyers de 1000 mL. Vários erlenmeyers com as mesmas condições iniciais foram preparados, os quais foram retirados da incubadora em intervalos de tempo de 30 min, 1 h, 1 h e 30 min, 2 h, 2 h e 30 min e 3 h de reação, sendo o procedimento repetido para cada uma das temperaturas avaliadas. O material, ao final da reação, foi lavado, seco e, posteriormente submetido à hidrólise ácida para quantificação de celulose, hemicelulose e lignina, como descrito na seção 3.3.1, com base nas metodologias NREL n°. 003 (1995), n°. 004 (1996) e n°. 002, 003, 017, 019 (2006). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.3.5.2 Estudo da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar na hidrólise enzimática

Para avaliar a influência da variação de massa de bagaço na cinética de hidrólise, foram consideradas diferentes massas deste substrato: 1, 2, 3, 4 e 5 g, em 100 mL de solução (água destilada e azida de sódio). A azida foi adicionada para evitar a proliferação de microorganismos que pudessem interferir neste processo. O pH foi 4,8, a temperatura de 50°C e a rotação foi mantida em 150 rpm em incubadora. A máxima concentração de bagaço possível de se trabalhar nas condições experimentais deste trabalho foi de 5%. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 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 e as leituras foram feitas em HPLC com detector de índice de refração. Foi possível quantificar celobiose, glicose, xilose e arabinose. Nesta etapa foi empregada carga enzimática de 500 FPU/L de celulase e 500 CBU/L de β -glicosidade, fixas para todas as porcentagens de sólidos. Estas concentrações de enzima correspondem a concentrações na faixa de 50 FPU/g biomassa e 50 CBU/g biomassa (para a concentração de 1% de bagaço) a 10 FPU/g de biomassa e 10 CBU/g biomassa (para a concentração de 5% de bagaço). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.3.5.3 Efeito da concentração total de enzima na hidrólise enzimática

Também foi avaliado o efeito da concentração total de enzima. Foram empregadas celulase de *Trichoderma reesei* (Sigma-Aldrich ATCC 26921) e β -glicosidade de *Aspergillus niger* (Novozym 188). Os valores de concentração das enzimas sofreram variação simultânea com base em um planejamento 2^2 + configuração estrela (Barros Neto *et al.*, 2003) e a concentração de bagaço foi 3%. O pH foi 4,8, a temperatura de 50°C e a rotação foi mantida em 150 rpm em incubadora. Os experimentos foram realizados com triplicata no ponto central.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Efeito da variação de concentração de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio na etapa de pré-tratamento

Neste estudo, concentrações de 4 e 8% (m/m) de bagaço foram utilizadas, além de concentrações de peróxido de hidrogênio alcalino de 7,355% e 14,710%. O ensaio 1 reproduziu as condições de temperatura, tempo de reação, concentração de peróxido de hidrogênio e concentração de bagaço do trabalho de Rabelo (2007). Os ensaios 2 e 3 foram realizados somente nas mesmas condições de temperatura e tempo de reação, variando-se as concentrações de bagaço e de peróxido de hidrogênio alcalino. Na Figura 4.1, tem-se os perfis de hidrólise obtidos para esta análise.

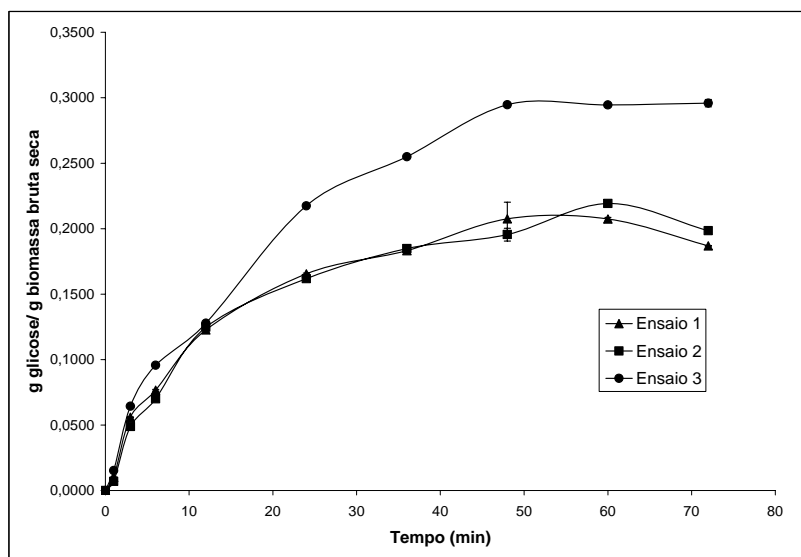


Figura 4.1: Avaliação do efeito da variação das concentrações de bagaço de cana-de-açúcar e de peróxido de hidrogênio alcalino quando duplicadas. Ensaio 1: 4% (m/m) de bagaço de cana e 7,355% de H_2O_2 ; Ensaio 2: 8% (m/m) de bagaço e 7,355% de H_2O_2 ; Ensaio 3: 8% (m/m) de bagaço e 14,710% de H_2O_2 .

Ao analisarmos a Figura 4.1, pode-se verificar que ao duplicar somente a concentração de bagaço de cana para 8% (m/m) e mantendo-se a concentração de peróxido fixa, não foi possível observar diferença significativa quando comparado com o ensaio utilizando-se de 4% (m/m) (ensaios 1 e 2). Assim, é possível duplicar a concentração de bagaço com a mesma concentração de peróxido, a fim de se obter a mesmo teor de glicose. Entretanto, ao duplicar tanto a concentração de bagaço como a concentração de peróxido, nota-se um aumento em relação aos outros ensaios em termos de g glicose/g biomassa bruta seca (ensaio 3).

O melhor resultado para o bagaço deste trabalho foi 0,2946 g de glicose/g biomassa bruta seca, encontrado nas condições de 8% (m/m) de bagaço e 14,710% de peróxido de hidrogênio alcalino. Para o bagaço do trabalho de Rabelo (2007), proveniente de cana queimada, o melhor resultado foi 0,3740 g glicose/g biomassa. Este comportamento mostra que as condições ótimas obtidas por Rabelo (2007) não são as condições ideais para o bagaço aplicado à este trabalho (colheita mecanizada, moído e com granulometria menor que 0,5 mm). Desta forma, observa-se que a procedência do bagaço, além de algumas características apresentadas pelas duas biomassas, influenciam as condições do pré-tratamento, levando a um resultado diferenciado, como já era esperado.

4.2 Estudo da influência da agitação no pré-tratamento

Para o estudo do efeito da agitação na etapa de pré-tratamento foram considerados quatro meios de condução do processo, como já citado: incubadora com controle de temperatura, agitador mecânico, agitador magnético e sem agitação. Este efeito é evidenciado nas Figuras 4.2 e 4.3.

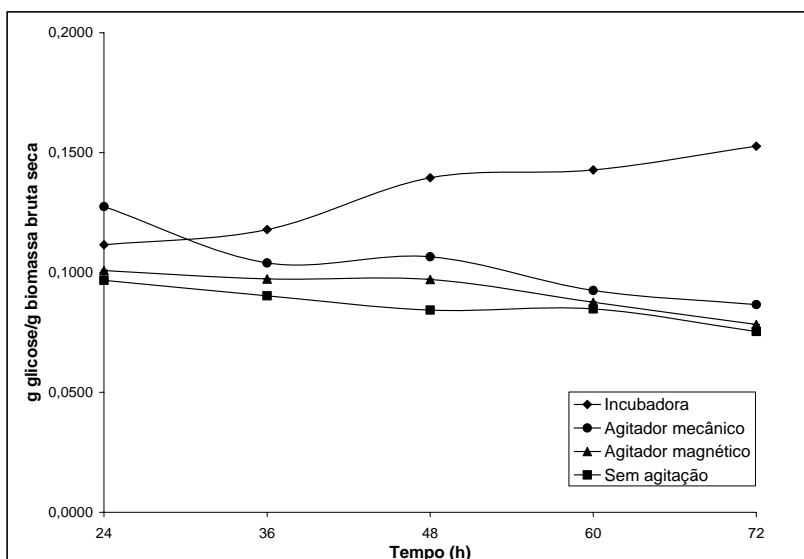


Figura 4.2: Efeito da agitação na etapa de pré-tratamento para a análise da quantificação de glicose.

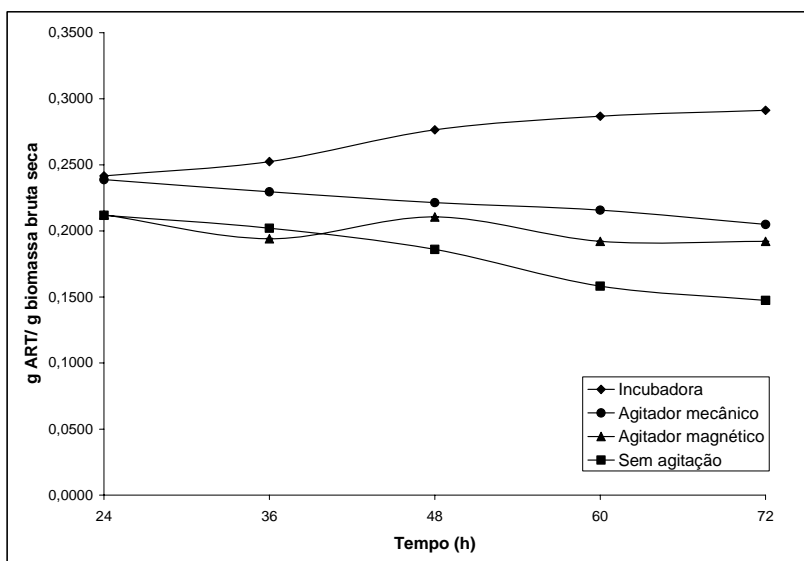


Figura 4.3: Efeito da agitação na etapa de pré-tratamento para a análise da quantificação de açúcares redutores totais.

De uma forma geral, fica evidente a importância da agitação na etapa de pré-tratamento, já que os melhores resultados foram obtidos com a utilização da incubadora, que emprega agitação do tipo orbital. O material sofreu agitação também com o agitador mecânico e com o magnético, mas, analisando-se os gráficos, estes métodos não foram tão eficientes. No caso da agitação mecânica, a forma da pá de agitação não foi a mais apropriada, desfavorecendo o desempenho deste equipamento. Provavelmente seria

possível conseguir bons resultados com um sistema de agitação que fosse projetado de maneira mais adequada.

4.3 Determinação da melhor concentração de peróxido de hidrogênio alcalino

Os perfis de liberação de glicose e ART após hidrólise do bagaço pré-tratado com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5.

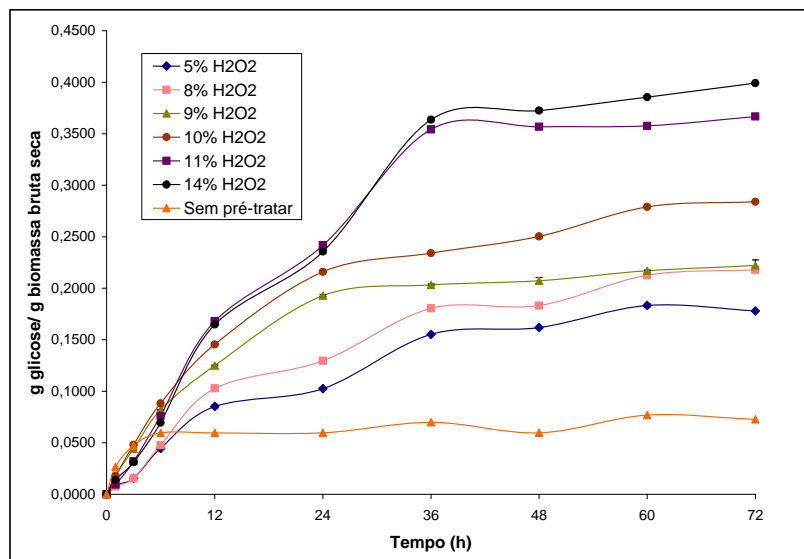


Figura 4.4: g glicose/ g biomassa bruta seca em função de tempo após hidrólise enzimática do bagaço pré-tratado em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio alcalino.

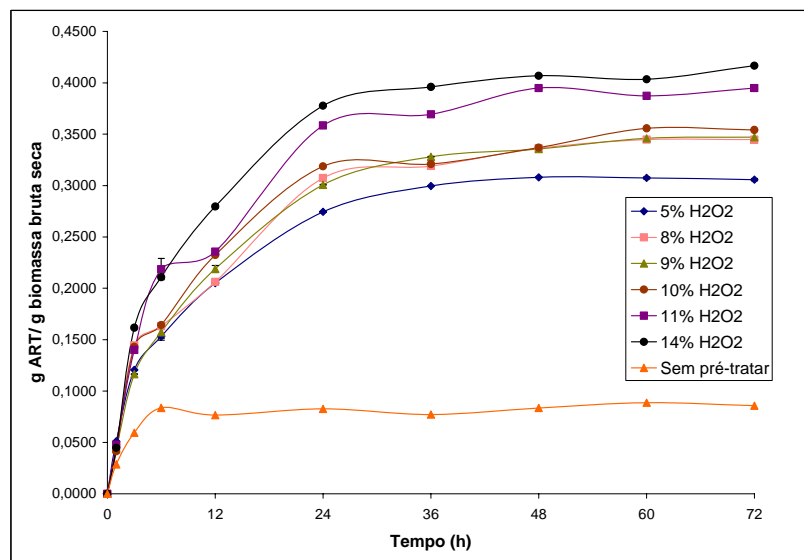


Figura 4.5: g ART/ g biomassa bruta seca em função do tempo após hidrólise enzimática de bagaço pré-tratado em diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio alcalino.

Analisando-se o comportamento das amostras em relação ao tempo, verificou-se que até 12 h a variação em termos de glicose e ART não foi muito significativa, exceto para a amostra sem pré-tratamento. Nota-se grande diferença entre o bagaço que não foi pré-tratado e os que foram submetidos a este processo. De 12 h de hidrólise em diante, é possível observar que a variação da concentração de peróxido alcalino durante o pré-tratamento influencia a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar de maneira que, quanto maior a concentração, mais eficaz é a produção de glicose e ART. Concentrações maiores de 11% de peróxido no pré-tratamento levam somente a ligeiro aumento na liberação de glicose e ART. Com base nestes resultados, foi escolhida a concentração de peróxido de 11% para os ensaios subseqüentes.

Com base no tempo de hidrólise, para a concentração de 11% de peróxido de hidrogênio alcalino, pode-se concluir que a partir de 36 h não há aumento considerável na liberação de glicose e de ART.

4.4 Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar

No início dos experimentos, fez-se a análise do teor de umidade e o valor encontrado foi de $5,12\% \pm 0,6$. Conforme os experimentos se processavam, este teste foi realizado algumas vezes a fim de verificar se havia alteração deste valor. Como resultado identificou-se que o teor de umidade se manteve praticamente estável. O máximo valor encontrado foi de $5,58\% \pm 0,2$. O teor de umidade sempre foi utilizado nos cálculos para que os resultados fossem mais precisos.

A composição química do bagaço foi determinada antes e após o pré-tratamento, já nas condições ótimas (1 h de reação, 25°C, 11% de peróxido, 8 g de bagaço em 100 mL de solução, pH de 11,5), cuja determinação será mostrada nas próximas seções. A Tabela 4.1 indica a composição química do bagaço nos dois casos.

Tabela 4.1: Composição química do bagaço de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento (cálculos em base 100).

Componentes	Antes do pré-tratamento (%)	Após pré-tratamento (%)
Cinzas	1,79 ± 0,02	-
Extrativos	3,25 ± 0,2	-
Lignina Total	25,10 ± 0,5	9,87 ± 0,4
Glucana	37,35 ± 0,5	60,09 ± 0,9
Xilana	23,66 ± 0,9	16,58 ± 0,6

As cinzas são compostas por silicatos, carbonatos, oxalatos e sulfatos. O teor de cinzas encontrado no bagaço de cana é geralmente baixo, como pôde ser observado na Tabela 4.1.

Já extrativos como amidos, alcalóides, óleos essenciais, resinas, graxas e gomas podem atingir porcentagem de até 5% da massa total (Pandey *et al.*, 2000; Fengel e Wegener, 1989). No caso do material de estudo deste trabalho, o teor encontrado foi de aproximadamente 3%.

A lignina total engloba as frações solúveis e insolúveis. A insolúvel é definida como um resíduo que não se solubiliza em ácido e que permanece retida em filtro de papel após sofrer hidrólise ácida com aplicação de ácido sulfúrico 72% (v/v). A solúvel representa a porção que sofre degradação durante a hidrólise ácida e, desta forma, permanece no filtrado obtido no procedimento para determinação da lignina total. Comparando-se os resultados obtidos para o bagaço antes e após o pré-tratamento, nota-se que o teor de lignina total foi reduzido em, aproximadamente, 61%, quando o bagaço sofreu pré-tratamento com H₂O₂. O peróxido de hidrogênio é responsável pela degradação da lignina e, assim, reduz o teor deste componente no material de estudo.

Durante a hidrólise ácida, os carboidratos poliméricos são convertidos em carboidratos monoméricos, que são solúveis e, por isto, permanecem no filtrado, juntamente com a lignina solúvel. Os carboidratos encontrados na análise foram glucana e xilana, sendo suas porcentagens indicadas na Tabela 4.1. Pode-se notar que o teor de glucana aumenta após o pré-tratamento e de xilana, diminui. Isto decorre do pré-tratamento com peróxido, onde a lignina é degradada e parte da hemicelulose transformada em

açúcares solúveis, principalmente xilose, resultando em mais glucana e menos xilana.

Os teores de extrativos e cinzas não foram observados para o material pré-tratado com peróxido de hidrogênio, pois estes dois componentes são degradados durante o processo.

A cristalinidade do material antes e após o pré-tratamento foi analisada para fins de comparação. A Figura 4.1 mostra os difratogramas de intensidade dos picos (U.A. indica unidades arbitrárias) versus 2θ (ângulo de Bragg) apresentados pelos dois tipos de bagaço.

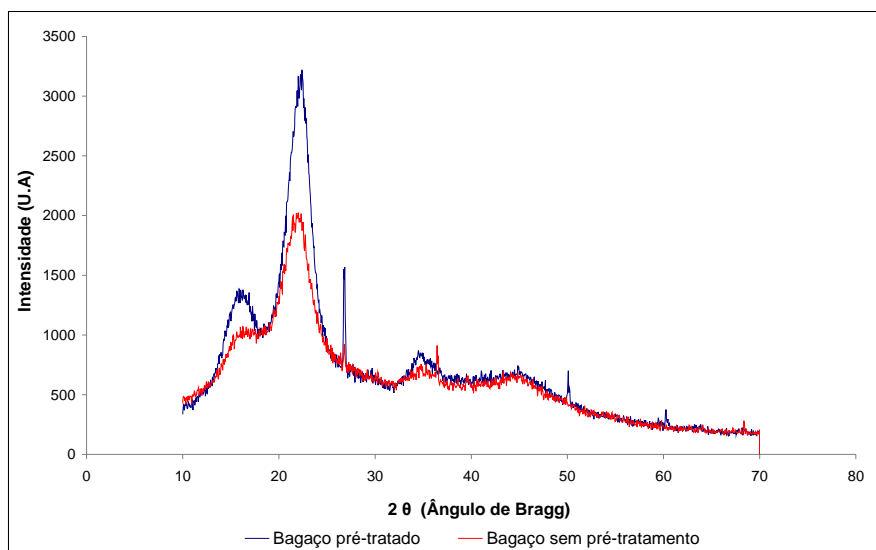


Figura 4.6: Difratogramas obtidos para o bagaço de cana sem pré-tratamento e pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Analisando os difratogramas, observou-se que a intensidade dos picos (U.A. indica unidades arbitrárias) para o bagaço pré-tratado aumentou quando comparado ao bagaço que não sofreu pré-tratamento. Esse aumento da intensidade também pode ser confirmado pelos valores dos índices de cristalinidade de cada amostra, mostrando que para o bagaço pré-tratado o resultado apresentou-se maior que para o bagaço sem pré-tratamento. Os índices de cristalinidade para as duas amostras estão dispostos na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Índices de cristalinidade (CrI_B) para o bagaço que não sofre pré-tratamento e para o bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino.

Amostras	Índice de cristalinidade (%)
Bagaço sem pré-tratamento	39,67
Bagaço pré-tratado	65,21

A justificativa para tal comportamento é que, com o pré-tratamento, há remoção, principalmente, de dois componentes que são amorfos e fazem parte da constituição do bagaço, xilana e lignina. O aumento no índice de cristalinidade, quando o bagaço pré-tratado é considerado, indica que estes componentes são removidos, não significando que há mudanças na estrutura cristalina básica do material lignocelulósico. Este aumento após pré-tratamento é também observado em vários estudos como os de Chang and Holtzaple (2000), Kasahara *et al.* (2001) e Tanahashi *et al.* (1983).

4.5 Atividade enzimática

As atividades de cada enzima utilizada nos experimentos foram determinadas com o intuito de se obter o volume de enzima necessário para que a hidrólise enzimática fosse desenvolvida. O comportamento tanto para celulase quanto para β -glicosidase pode ser observado pelas Figuras 4.7 e 4.8.

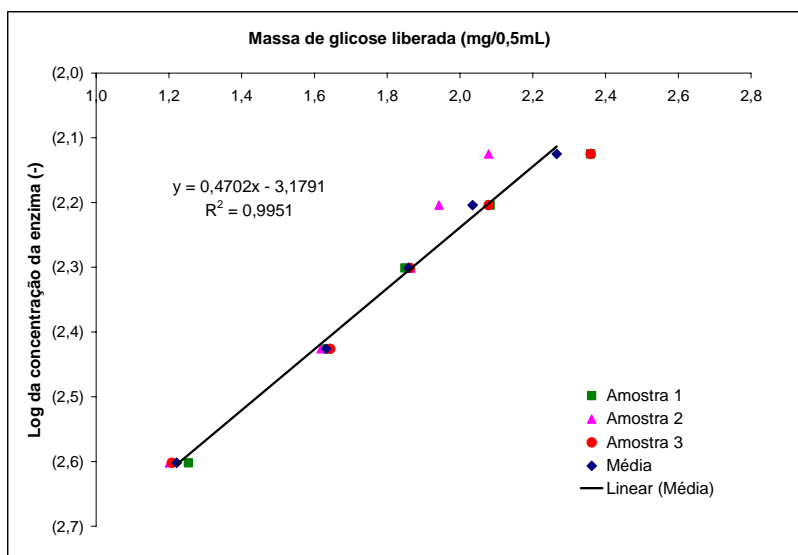


Figura 4.7: Comportamento da enzima celulase. Logaritmo da concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de 0,5 mL de enzima diluída.

Pela Equação 3.3 mostrada na seção 3.3.3, observando-se a Figura 4.7 e a equação da reta encontrada, calculou-se a atividade apresentada pela enzima celulase.

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

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

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

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.

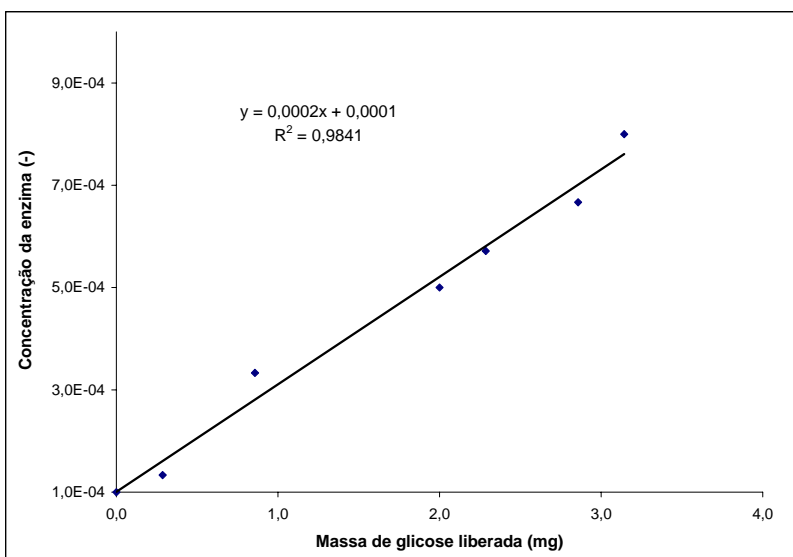


Figura 4.8: Comportamento da enzima β -glicosidase. Concentração da enzima em função da massa de glicose liberada a partir de uma solução de 15 mmol/L de celobiose.

Com a Equação 3.4 mostrada na seção 3.3.3 e através da equação da reta obtida na Figura 4.8, foi possível efetuar o seguinte cálculo:

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

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

$$CBU / mL = \frac{0,0926}{[enzima\ diluída]} = \frac{0,0926}{0,0003} = \underline{\underline{308,667\ CBU / mL}}$$

O valor encontrado para a atividade da β -glicosidase foi de 308,667 CBU/mL. Este valor de atividade também passou a ser adotado para a obtenção do volume a ser empregado na hidrólise enzimática.

4.6 Estudo para obtenção dos dados cinéticos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Dados cinéticos do pré-tratamento e da hidrólise enzimática foram determinados através da variação de parâmetros como temperatura do pré-tratamento, concentração de biomassa empregada na etapa de hidrólise e variação da concentração das enzimas celulase e β -glicosidase utilizadas na hidrólise enzimática.

4.6.1 Pré-tratamento

Os ensaios destinados à determinação de dados cinéticos do pré-tratamento resultaram em diferentes perfis para lignina, celulose e hemicelulose nas três temperaturas avaliadas. Os perfis podem ser observados nas Figuras 4.9, 4.10 e 4.11. Os valores dos dados cinéticos para este processo estão dispostos em tabela que se encontra no Apêndice A. Os valores apresentados nos gráficos correspondem à média de ensaios feitos em triplicata.

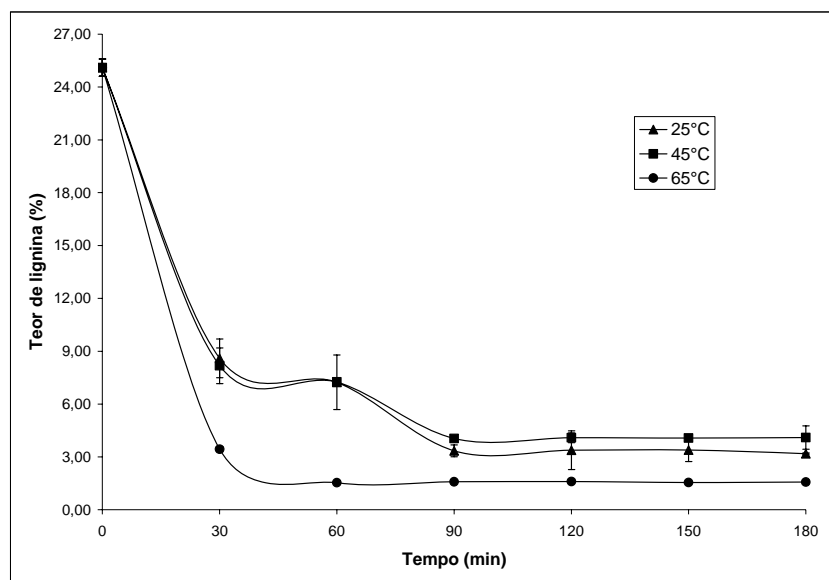


Figura 4.9: Perfis comparativos de lignina restante no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.

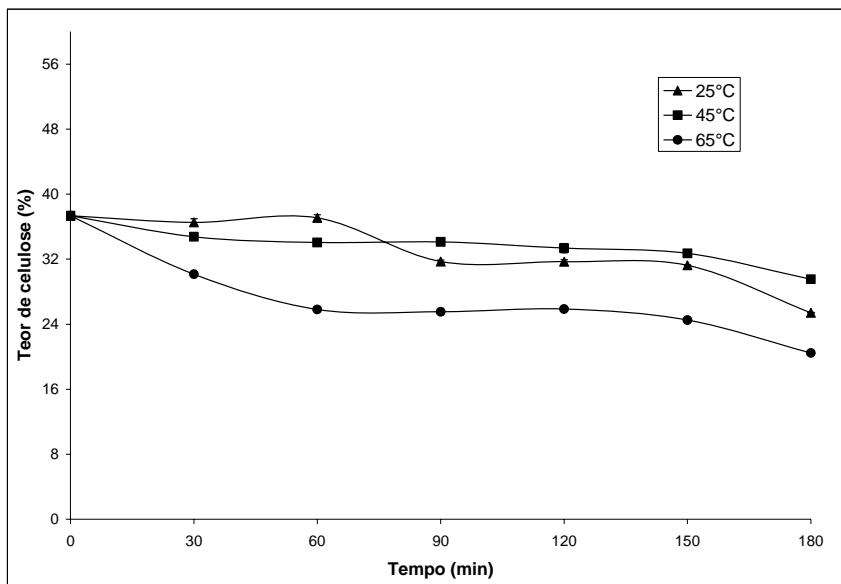


Figura 4.10: Perfis comparativos de celulose no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.

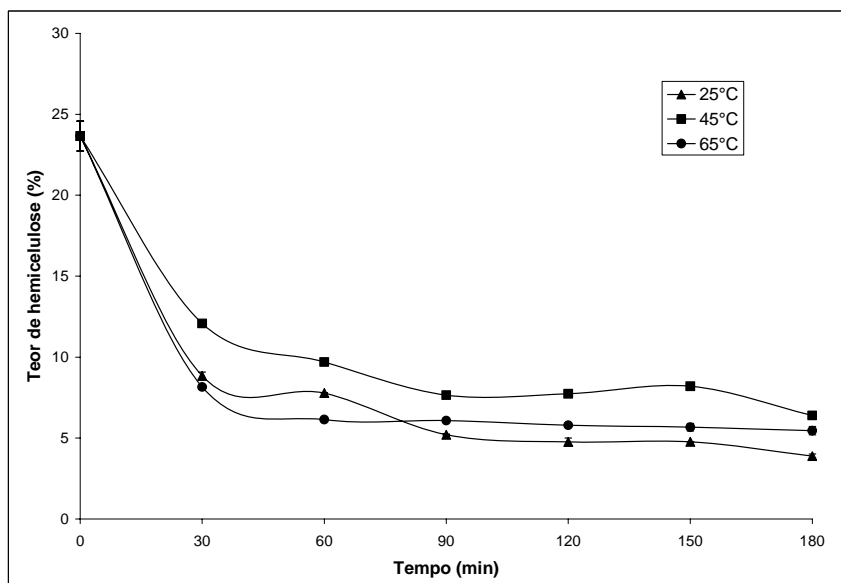


Figura 4.11: Perfis comparativos de hemicelulose no bagaço após o pré-tratamento para as temperaturas de 25, 45 e 65°C.

Com a análise da Figura 4.9 é possível notar que a deslignificação da amostra correspondente à temperatura de 65°C foi mais eficiente quando comparada às das outras temperaturas. Por outro lado, o teor de celulose foi menor, como pode ser visto na Figura 4.10, o que significa que parte da celulose foi degradada, o que não é um bom resultado, considerando que o ideal ocorre quando a celulose não é degradada para que,

conseqüentemente, o teor de glicose após a hidrólise seja mais elevado, o que pode gerar, na fermentação subsequente, maior rendimento em etanol.

A deslignificação para as temperaturas de 25 e 45°C é semelhante e o teor de celulose também, como pode ser visto nas Figuras 4.9 e 4.10. O teor de hemicelulose, no entanto, é menor para a temperatura de 25°C, como mostra a Figura 4.11, o que significa que o pré-tratamento na temperatura de 25°C remove mais hemicelulose e torna o material pré-tratado mais susceptível ao ataque enzimático posterior, resultando em melhores rendimentos em glicose após a hidrólise, como mostrou o trabalho de Rabelo (2007).

Nota-se, da Figura 4.10, que para a temperatura de 25°C não há perda de celulose durante a primeira hora de pré-tratamento. Em todas as outras temperaturas há diminuição do teor de celulose desde meia hora de pré-tratamento, embora para a temperatura de 45°C esta diminuição seja pequena. Mesmo para a temperatura de 25°C, há perda de celulose após 1 h.

Ao fazer a otimização do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino, Rabelo (2007) encontrou que o melhor rendimento em glicose após a hidrólise foi para bagaço pré-tratado a 25°C por 1 h. Os resultados das Figuras 4.9 a 4.11 estão em concordância com este resultado, pois mostram que para estas condições não há nenhuma degradação da celulose no material pré-tratado. Embora a deslignificação a 65°C seja bem mais efetiva, a perda de celulose faz com que o rendimento em glicose após a hidrólise seja menor quando o bagaço é pré-tratado nesta temperatura. Além disso, mesmo que na temperatura de 25°C ainda haja remoção de lignina e de hemicelulose até 90 minutos (Figuras 4.9 e 4.11), a perda de celulose correspondente faz com que tempos maiores de pré-tratamento não sejam interessantes.

4.6.2 Hidrólise enzimática com variação da concentração de substrato

Os dados cinéticos da hidrólise enzimática na qual a concentração de bagaço sofreu variação podem ser avaliados através das Figuras 4.12 a 4.15 que mostram os perfis de celobiose, glicose, xilose e arabinose, cujas concentrações são dadas em g/L. Os valores dos dados cinéticos estão dispostos em tabela que se encontra no Apêndice B. Os valores apresentados nas figuras correspondem à média de ensaios realizados em triplicata.

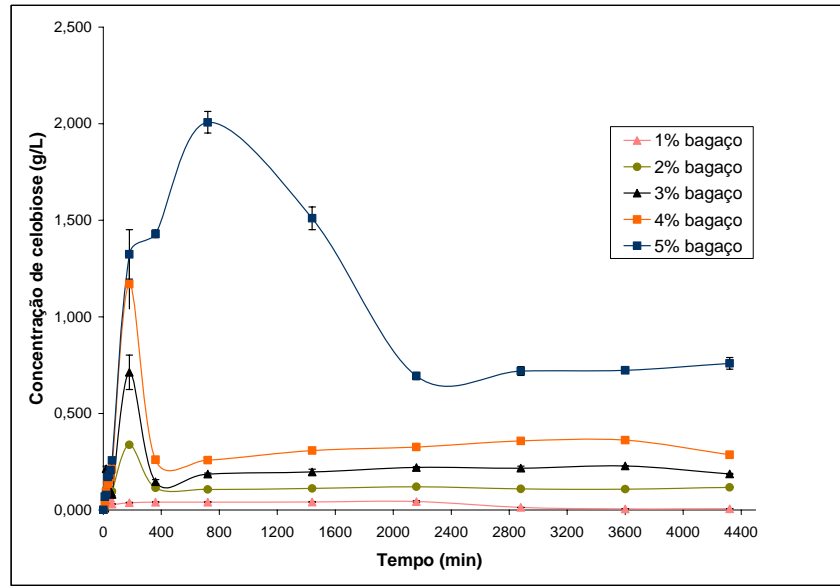


Figura 4.12: Concentração de celobiose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

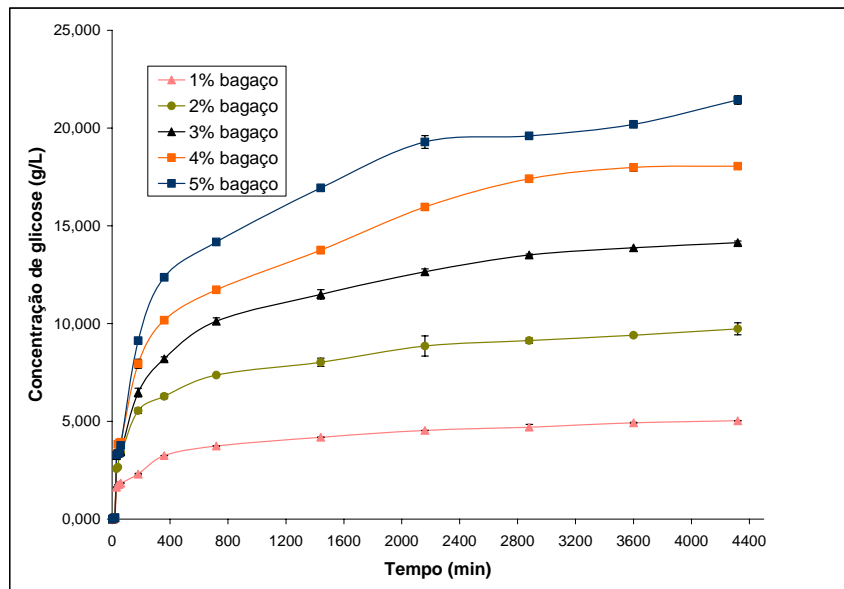


Figura 4.13: Concentração de glicose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

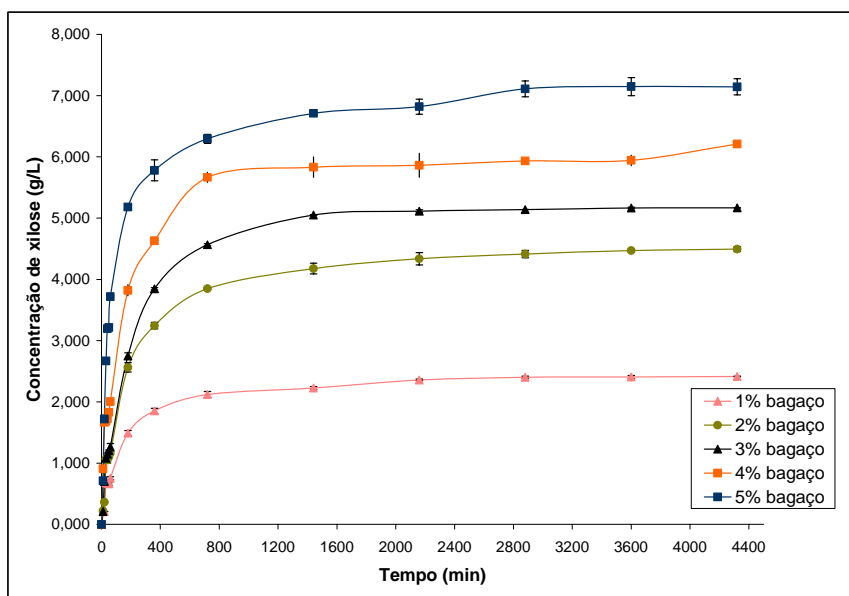


Figura 4.14: Concentração de xilose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

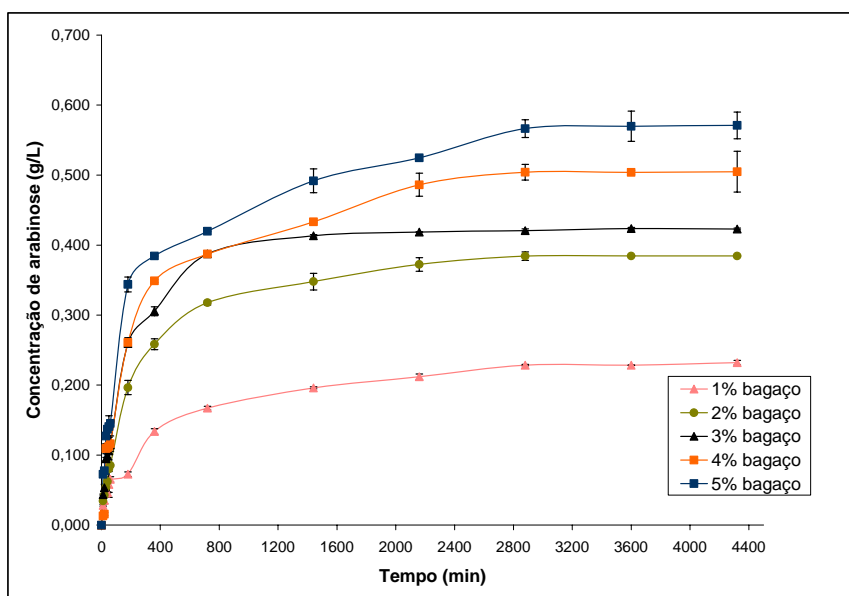


Figura 4.15: Concentração de arabinose em g/L para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

Com base nas Figuras 4.12 a 4.15, pode-se notar que com o aumento da concentração de bagaço, os teores de celobiose, glicose, xilose e arabinose em g/L foram aumentados, como era de se esperar. Chegou-se a uma concentração de 21,434 g/L de glicose para bagaço a 5%, enquanto para bagaço a 1% a concentração de glicose obtida foi de 5,030 g/L. Para xilose, a concentração obtida quando o bagaço estava na concentração

de 5% foi 7,144 g/L e quando o bagaço estava a 1%, 2,415 g/L.

O aumento da concentração de celobiose na Figura 4.12 sugere que para trabalhar com bagaço mais concentrado, seria necessário usar maior quantidade de β -glicosidase para que o excesso de celobiose pudesse ser convertido em glicose, aumentando o rendimento neste açúcar. A concentração de β -glicosidase usada nestes experimentos, conforme descrito na seção 3.3.5.2, foi 500 CBU/L, que corresponde a 10 CBU/g bagaço na concentração de 5%.

As Figuras 4.16 e 4.17 mostram os perfis de glicose e xilose, que são os dois açúcares principais, em g açúcar/g biomassa pré-tratada a.s. (a.s. indica que a massa de biomassa foi considerada descontando-se a umidade). Os valores dos dados cinéticos em g/g também se encontram em tabela apresentada no Apêndice B. Estes gráficos são apresentados além dos gráficos onde a concentração dos açúcares estão expressas em g/L, porque não só a concentração de açúcar em solução é importante, mas também o aproveitamento da celulose e hemicelulose disponíveis no bagaço. Quanto maior a concentração de açúcar por grama de bagaço pré-tratado, maior é o aproveitamento da celulose. A concentração de glicose em g/g biomassa pré-tratada no final da hidrólise, por exemplo, dá uma medida da conversão da celulose disponível em glicose (Vásquez *et al.*, 2007).

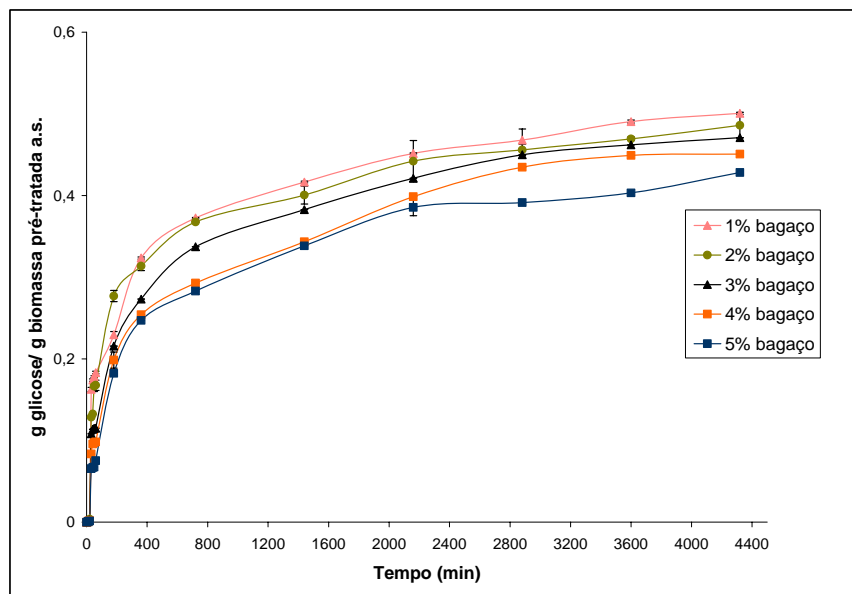


Figura 4.16: Concentração de glicose em g/g para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

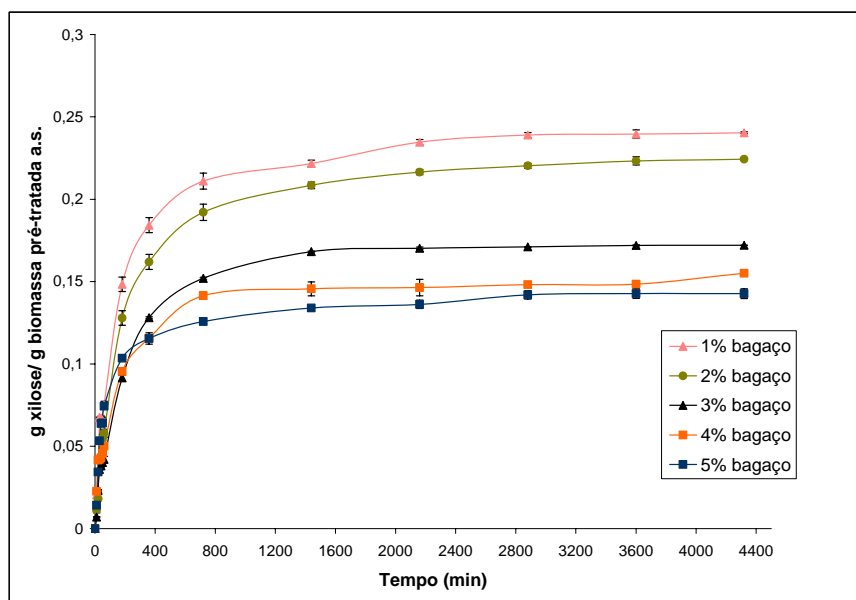


Figura 4.17: Concentração de xilose em g/g para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

Como se pode notar nas Figuras 4.16 e 4.17, o aumento da concentração de bagaço, embora aumente a concentração dos açúcares em solução (Figuras 4.13 e 4.14), diminui a conversão, de forma que sobram celulose e hemicelulose não hidrolisadas ao final do processo. Isso se traduz em um comportamento inverso ao apresentado nas Figuras 4.13 e 4.14 com o aumento da concentração de bagaço, resultando em uma diminuição da quantidade de açúcares em g/g bagaço pré-tratado. Obteve-se 0,501 g glicose/g bagaço pré-tratado quando 1% de bagaço foi utilizado e 0,428 g glicose/g bagaço pré-tratado quando trabalhou-se com 5%. Os valores para xilose são 0,240 g xilose/g bagaço pré-tratado para 1% de bagaço e 0,143 g xilose/g bagaço pré-tratado para 5%.

O aumento da concentração de bagaço resulta em maior dificuldade na transferência de massa, o que também, provavelmente, dificulta a adsorção das enzimas presentes sobre o substrato. Além disso, como foi empregada a mesma carga enzimática para todos os ensaios, a amostra de 1%, por exemplo, continha a mesma quantidade de enzima que as demais amostras com maiores massas de bagaço, e isso provavelmente levou a uma maior conversão.

Os rendimentos em glicose na hidrólise, para todas as concentrações consideradas, foram calculados pela Equação 4.1 e são mostrados na Tabela 4.3.

$$\frac{\text{g glucana hidrolisada}}{\text{g glucana no bagaço pré-tratado}} = \frac{\text{g glicose} \cdot \frac{162,2}{180,2}}{\text{g glucana no bagaço pré-tratado}} \cdot 100\% \quad (4.1)$$

Tabela 4.3: Rendimentos em glicose para as amostras de 1, 2, 3, 4, 5% (m/m) de bagaço de cana-de-açúcar.

Concentração de bagaço (%)	Rendimentos ao final da hidrólise (%)
1	75,45
2	73,01
3	70,72
4	67,67
5	64,30

4.6.3 Hidrólise enzimática com variação das concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase

Nesta etapa escolheu-se trabalhar com concentração de sólidos de 3%, que apresenta um valor intermediário de conversão em glicose sem levar a uma concentração de glicose em g/L muito baixa. As concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase dadas em FPU/L e CBU/L, respectivamente, foram variadas conforme matriz de planejamento exposta na Tabela 4.4. Nesta tabela também estão mostradas as concentrações de glicose em g/g biomassa pré-tratada a.s. e em g/L, além do rendimento, calculado pela Equação 4.1. Quando a concentração de bagaço é fixa, estas três respostas têm correlação direta (coeficiente de correlação igual a 1), de forma que apenas a concentração de glicose em g/g será analisada no planejamento. As conclusões tiradas para esta resposta são válidas para as outras duas.

Tabela 4.4: Matriz de planejamento para os ensaios destinados à variação das concentrações das enzimas celulase e β -glicosidase.

Ensaio	Celulase (FPU/L)	Beta-glicosidase (CBU/L)	Glicose (g/g biomassa pré-tratada a.s.)	Glicose (g/L)	Rendimento (%)
1	174,0	220,0	0,55	16,59	82,81
2	174,0	1280,0	0,52	15,73	78,52
3	775,0	220,0	0,54	16,26	81,19
4	775,0	1280,0	0,57	17,10	85,42
5	50,0	750,0	0,29	8,57	42,76
6	900,0	750,0	0,66	19,66	98,15
7	475,0	0,0	0,42	12,72	63,51
8	475,0	1500,0	0,62	18,65	93,08
9 (C)	475,0	750,0	0,66	19,67	98,21
10 (C)	475,0	750,0	0,66	19,66	99,39
11 (C)	475,0	750,0	0,66	19,91	99,43

Pode-se notar, avaliando a Tabela 4.4 que os melhores resultados são no ponto central, onde as concentrações de celulase e β -glicosidase são 475 FPU/L e 750 CBU/L, respectivamente. Estes valores correspondem a concentrações de 15,8 FPU/g biomassa de celulase e 25 CBU/g biomassa de β -glicosidase. O ensaio 6 (900 FPU/L de celulase e 750 CBU/L de β -glicosidase) também levou a altas concentrações de glicose, mas sendo a concentração de celulase no ponto central mais baixa, seria mais interessante trabalhar nestas condições. Este resultado mostra que a partir de certo ponto não é viável aumentar a concentração de celulase e, em alguns casos, o aumento pode vir a prejudicar o rendimento.

O menor valor de rendimento foi no ensaio 5, que foi realizado com a menor concentração de celulase. O ensaio 7, realizado sem adição de β -glicosidase, também apresentou baixo rendimento, mas não tão baixo quanto quando a concentração de celulase foi muito baixa.

Os dados da matriz de planejamento foram analisados utilizando-se o programa *Statistica* versão 7.0. A Figura 4.18 mostra o gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose. Nota-se que todos os efeitos (lineares, quadráticos e de interação) foram significativos, considerando-se erro

puro e nível de confiança de 95% (p valor <0.05). Pode-se ver, ainda, que o maior efeito no rendimento é o da concentração de celulase, que apresenta efeito linear positivo e efeito quadrático negativo, sendo o efeito positivo maior. A β -glicosidase também apresenta efeito linear positivo e efeito quadrático negativo, mas neste caso o efeito negativo é maior.

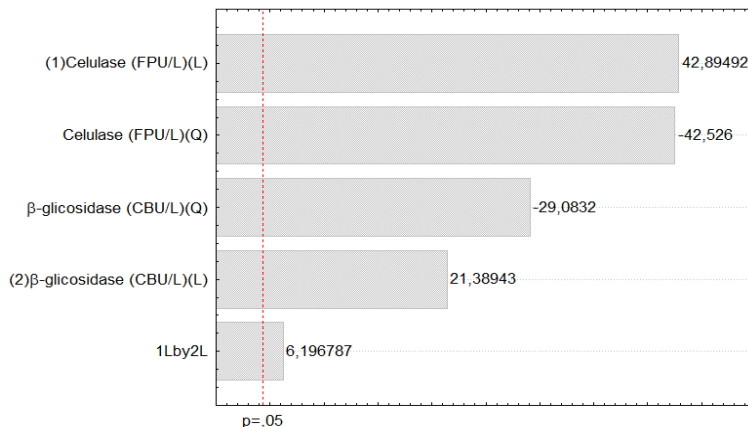


Figura 4.18: Gráfico Pareto dos efeitos padronizados das concentrações de celulase e β -glicosidase para o rendimento em glicose.

A Tabela 4.5 mostra a Análise de Variância (ANOVA) para o rendimento. Pode-se notar que o modelo estatístico para este planejamento não é significativo, pois não passa em nenhum dos testes F. O valor de F calculado é menor do que o tabelado na verificação da significância estatística da regressão e maior do que o tabelado no teste de falta de ajuste do modelo, quando para um modelo bem ajustado se espera que aconteça o oposto nos dois casos. Além disso, o valor de R^2 é baixo.

O fato do modelo não ser significativo pode ser explicado pela não linearidade do processo. Como se trabalhou em uma faixa ampla de concentrações de enzimas e sendo a hidrólise enzimática um processo altamente não linear, um modelo quadrático não foi capaz de descrever o rendimento na faixa considerada. Provavelmente seria possível usar um modelo quadrático para uma faixa mais estreita. No caso de se trabalhar com esta faixa, para obter um modelo significativo, o mais adequado seria fazer mais experimentos e propor um modelo estatístico mais complexo. Neste trabalho, no entanto, o objetivo do planejamento foi apenas variar a concentração de enzimas para obter perfis de concentração de açúcares para uma posterior modelagem fenomenológica da cinética de hidrólise enzimática e a obtenção de um modelo estatístico significativo não é imprescindível.

Tabela 4.5: Tabela ANOVA para o rendimento em glicose (%).

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão (R)	2115,53	5	423,11	2,10 ¹
Resíduos (r)	1005,64	5	201,13	702,78 ²
Falta de ajuste (faj)	1004,69	3	334,90	
Erro puro (ep)	0,95	2	0,48	
Total (T)	3121,17	10		
% variação explicada (R ²)	67,78			
% máxima variação explicada	99,97			

1: Teste F calculado para verificar a significância estatística da regressão

2: Teste F calculado para verificar a falta de ajuste do modelo

*F(tab.)_{5,5} = 5,05 no nível de 95% para a regressão

*F(tab.)_{3,2} = 19,16 no nível de 95% para a falta de ajuste

*Valores retirados da Tabela A.4, BARROS NETO *et al* (2003).

Os dados cinéticos também foram avaliados através dos perfis de celobiose, glicose, xilose e arabinose em função do tempo, que podem ser vistos nas Figuras 4.19 a 4.22. Escolheu-se apresentar os perfis com as concentrações de açúcares dadas em g/L, já que foi observado o mesmo comportamento em g/g. Os valores dos dados cinéticos em g/L e em g/g se encontram em tabela apresentada no Apêndice C.

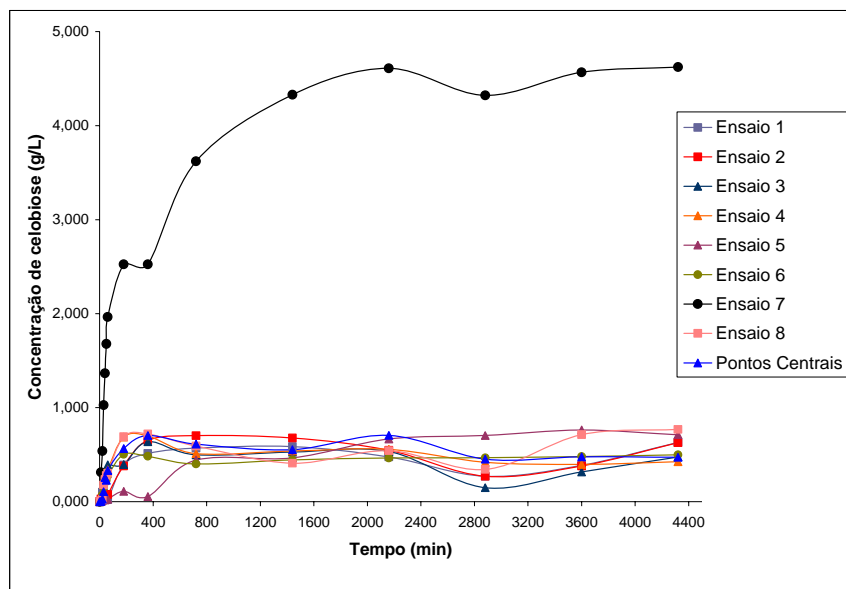


Figura 4.19: Concentrações de celobiose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

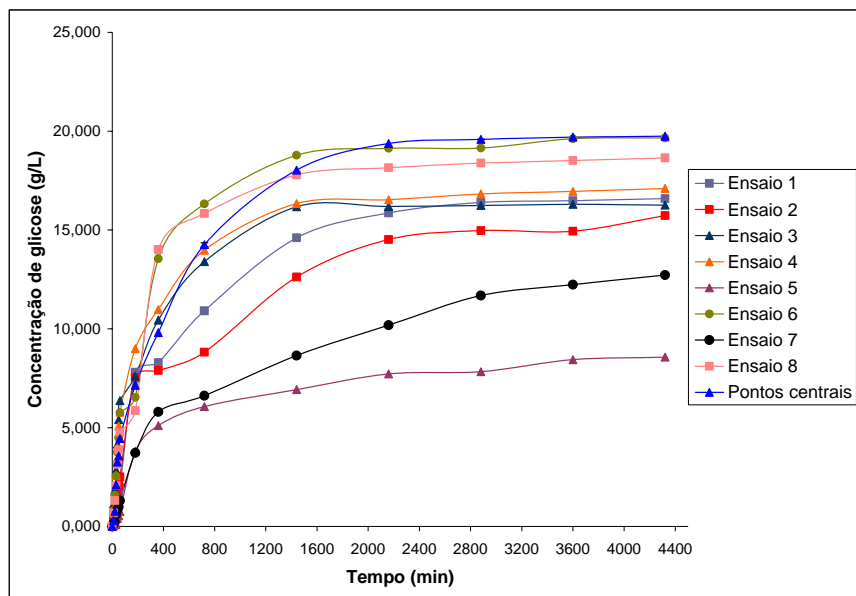


Figura 4.20: Concentrações de glicose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Com análise do perfil de celobiose, observa-se que quando não foi inserida carga de β -glicosidase (ensaio 7), grande quantidade de celobiose é acumulada no meio reacional, já que esta enzima é responsável pela conversão de celobiose em glicose. Este ensaio mostra a importância da adição de β -glicosidase para aumentar os rendimentos na hidrólise.

Já ao se considerar o perfil de glicose nota-se que para o ensaio 5, onde foi empregada pouca quantidade de celulase e alta carga de β -glicosidase, os resultados foram inferiores aos demais, demonstrando que a celulase também tem grande importância quando se deseja altos teores de glicose, uma vez que esta enzima é responsável pela conversão de celulose em celobiose. Assim, para o ensaio 7, com alto teor de celobiose, os resultados também não foram adequados quando se deseja obter glicose, já que não havia β -glicosidase suficiente para converter a celobiose formada em glicose, além também da celulase empregada ter sido inibida pela grande quantidade de celobiose presente no meio. Os melhores resultados de glicose observados foram para os pontos centrais, nos quais foram utilizados quantidades intermediárias de celulase e β -glicosidase.

Ao se comparar os perfis de glicose para os ensaios do ponto central (475 FPU/L e 750 CBU/L de celulase e β -glicosidase, respectivamente) com os do ensaio 6 (900 FPU/L e

750 CBU/L de celulase e β -glicosidase, respectivamente) percebe-se que o aumento da carga de celulase fez que a conversão final fosse atingida mais rapidamente (para 1440 minutos a concentração final de glicose havia sido atingida no ensaio 6 e para o ensaio no ponto central a concentração final foi atingida em torno de 2160 minutos). No entanto, a concentração final de glicose obtida no ensaio 6 foi a mesma obtida com praticamente metade da carga de celulase no ensaio no ponto central.

O ensaio 8 (475 FPU/L e 1500 CBU/L de celulase e β -glicosidase, respectivamente) teve comportamento similar ao ensaio 6 nos primeiros 700 minutos e depois convergiu para uma concentração de glicose ligeiramente mais baixa. Comparando este resultado com o do ensaio no ponto central (475 FPU/L e 750 CBU/L de celulase e β -glicosidase, respectivamente), nota-se que o aumento da carga de β -glicosidase acelerou a conversão no início da reação, mas não teve influência no aumento do rendimento, causando, inclusive, uma pequena diminuição deste.

As Figuras 4.21 e 4.22 mostram o comportamento das concentrações de xilose e arabinose ao longo do tempo.

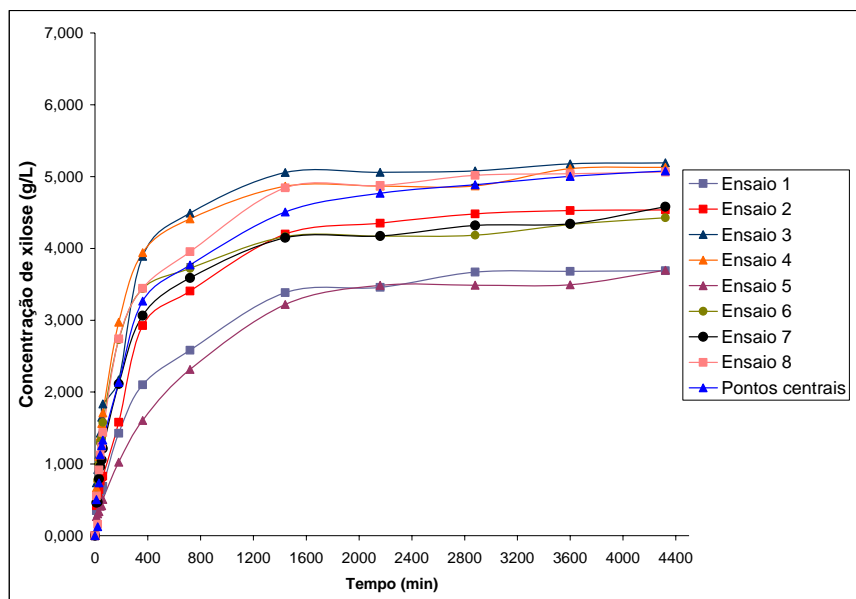


Figura 4.21: Concentrações de xilose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

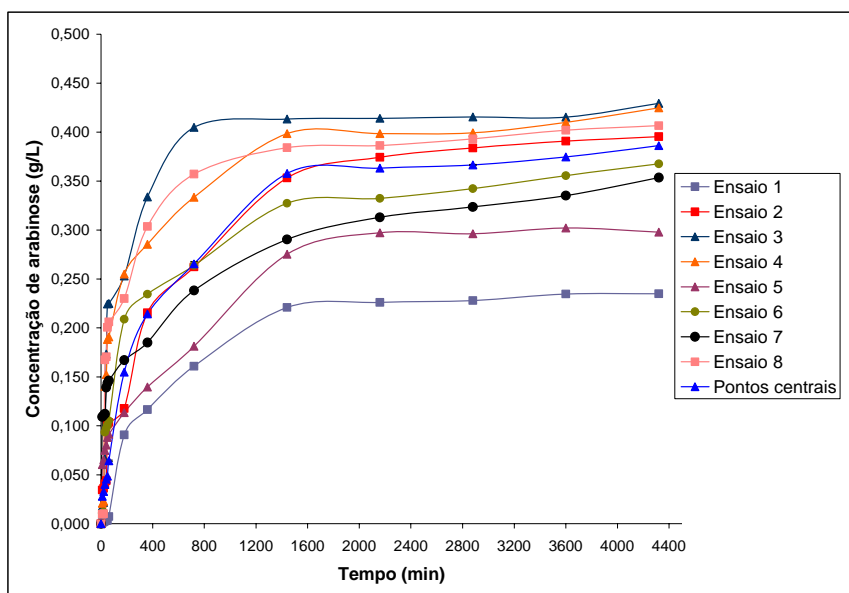


Figura 4.22: Concentrações de arabinose (g/L) observadas para os ensaios com variação de carga enzimática.

Nota-se um comportamento semelhante para os perfis de xilose e de arabinose, que estão diretamente relacionados à hemicelulose. As maiores concentrações de xilose e de arabinose foram para os ensaios 3, 4, 8 e no ponto central, nos quais houve maior remoção de hemicelulose.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

Nos ensaios destinados à caracterização do bagaço antes e após o pré-tratamento, nota-se que houve uma diminuição na porcentagem de lignina, aumento na porcentagem de glucanas e diminuição na porcentagem de xilanas quando considerado o bagaço pré-tratado. Gould (1984) cita que houve uma diminuição de aproximadamente 50% na porcentagem de lignina quando a palha de trigo é pré-tratada com peróxido de hidrogênio a pH ajustado em 11,5 por 24 h a 25°C. Rabelo (2007) obteve uma diminuição de, aproximadamente, 71% no teor de lignina após pré-tratamento e neste trabalho foi possível uma diminuição em torno de 61%. A diferença em relação aos resultados de Rabelo (2007) indica a sensibilidade das condições de pré-tratamento com relação à procedência do bagaço, já que o bagaço usado neste trabalho foi de colheita mecanizada, de cana não queimada e moído, enquanto o bagaço usado no trabalho de Rabelo (2007), além de não ser moído, era proveniente de cana queimada.

No estudo da influência da agitação no pré-tratamento, ficou evidente que a agitação uniforme do meio reacional é um fator importante para que a reação se processe, e isto pode ser observado pelos resultados apresentados quando a reação ocorreu em incubadora com controle de temperatura. A agitação deve ser um fator importante por facilitar a homogeneização do meio reacional e, desta maneira, possibilitar melhor desempenho do peróxido de hidrogênio. Seu melhor desempenho pode estar relacionado ao seu contato direto com todo o substrato, melhorando o processo de remoção da lignina e solubilização da hemicelulose.

Ensaio empregados na determinação da melhor concentração de peróxido no pré-tratamento mostraram que a partir de concentração de H₂O₂ de 11% (v/v), não há aumento significativo na liberação de glicose na etapa de hidrólise, o que nos levou a fixar esta concentração para os ensaios seguintes, até mesmo com o intuito de minimizar custos do processo.

Os ensaios destinados à determinação dos dados para o estudo cinético do pré-tratamento indicaram que com maior temperatura, de 65°C, a remoção de lignina foi mais eficiente. Em contrapartida, grande parte da celulose foi degradada. O melhor resultado foi para o pré-tratamento realizado durante 1 h a 25°C, quando a deslignificação foi um pouco menor, mas não houve degradação da celulose e houve a maior remoção de hemicelulose.

Os ensaios para a determinação dos dados cinéticos da hidrólise enzimática foram divididos em duas etapas: com variação de concentração de substrato e com variação da carga enzimática.

No caso em que a concentração de bagaço foi variada e a de enzimas foi mantida fixa, constatou-se que, com o aumento da concentração de bagaço, os teores dos açúcares avaliados em g/L sofreram acréscimo. Quando os resultados foram expressos em g/g de bagaço pré-tratado, a resposta apresentou comportamento inverso com o aumento da concentração de bagaço, resultando em diminuição do teor em g/g. O aumento da concentração de bagaço faz com que haja maior dificuldade na transferência de massa, dificultando a adsorção das enzimas. O fato de se ter trabalhado com carga enzimática fixa também ocasionou uma menor concentração de enzimas para a maior concentração de bagaço e como resultado sobraram mais celulose e hemicelulose não hidrolisadas no bagaço à medida que a sua concentração foi aumentada.

No segundo estudo, onde houve variação de carga enzimática, os resultados dados em g/L e em g/g de bagaço pré-tratado foram similares, já que para todos os ensaios foi empregada a mesma massa de bagaço. Foi possível concluir que há a necessidade de empregar concentrações não muito altas de celulase e pouca de β -glicosidase e que a β -glicosidase é realmente necessária para que ocorra conversão mais efetiva de celobiose em glicose, ao passo que a celulase é muito importante para que ocorra a conversão de celulose em celobiose. Assim, fica evidente que as duas enzimas atuam de forma sinérgica, maximizando a liberação de glicose para o meio reacional.

Os dados cinéticos foram obtidos com o objetivo de possibilitar uma modelagem cinética detalhada do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino em trabalhos futuros.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão para trabalhos futuros, com base nos resultados aqui apresentados, tem-se:

- Modelagem das etapas de pré-tratamento e hidrólise enzimática.
- Avaliação de características físicas, químicas e estruturais da lignina proveniente do bagaço pré-tratado com peróxido de hidrogênio alcalino para que seja possível propor o aproveitamento adequado deste material. Comparação de características como o poder calorífico, por exemplo, da lignina proveniente deste pré-tratamento com as ligninas recuperadas de outros tipos de pré-tratamentos.
- Quantificação da solução de peróxido de hidrogênio alcalino após pré-tratamento com o emprego de espectrofotometria, volumetria, cromatografia ou métodos eletroquímicos, avaliando se a concentração de peróxido empregada está ou não em excesso.
- Realização de um estudo sobre os efeitos que metais como ferro e cromo, incorporados ao bagaço quando este material passa pelas moendas, podem gerar sobre os resultados da hidrólise e verificar se há ou não influencia destes metais nesta etapa e de que maneira podem afetar o processo de deslignificação do material.
- Comparação dos resultados dos dados cinéticos obtidos neste trabalho com os dados cinéticos obtidos com bagaço pré-tratado com cal (Fuentes, 2009) para determinação da influência do pré-tratamento na cinética de hidrólise e nas concentrações de enzimas requeridas.
- Scale-up das etapas de pré-tratamento e hidrólise.
- Quantificação da formação de compostos inibidores, tais como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF).
- Determinação da influência de inibidores na etapa de fermentação alcoólica.
- Estudo cinético da fermentação alcoólica usando o hidrolisado como substrato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alesp - Legislação do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/legislacao/norma.do?id=217>>. Acesso em: 19/02/2009.

ALEXY, P.; KOSIKOVÁ, B.; PODSTRÁNSKA, G. The effect of blending lignin with polyethylene and polypropylene on physical properties. *Polymer*, v. 41, p. 4901-4908, 2000.

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica. Disponível em: <<http://www.aneel.gov.br/>>. Acesso em: 21/06/2008.

ANGYROPOUPOS, D. S.; MENACHEM, S. B. Lignin. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.*, v. 57, p. 127-158, 1997.

ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente*. Porto Alegre: Editora Bookman, 2001, 751 p.

AZZAM, A. M. Pretreatment of cane bagasse with hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health B*, v. 24, p. 421-433, 1989.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. Campinas: Editora Unicamp, 2007, 473 p.

BELDMAN, C.; LEEUWEN, M. F. S.; ROMBOUTS, F. M.; VORAGEN, F. G. J. The cellulase of *Trichoderma viride*. *European Journal of Biochemistry* v. 146, p. 301-308, 1985.

BENAR, P.; GONÇALVES, A. R.; MANDELLI, D.; SCHUCHARDT, U. Hydroxymethylation and oxidation of organosolv lignins and utilization of the products.

Biosource Technol., v. 68, p. 11-16, 1999.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology advances*, v. 15, p. 583-620, 1997.

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

CARMINAL, G.; SANTIN, J. L.; SOLA, C. Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of pretreated cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 27, p. 1282-1290, 1985.

CARRILO, F; LIS, M.J.; COLOM, X.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulose hydrolysis of wheat straw: kinetic study. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3360-3364, 2005.

CARVALHO, E. P. Perspectivas da agroenergia. In SEMINÁRIO BM & F Perspectivas para o Agro business, São Paulo, 2007.

CAVACO-PAULO, A. M. *A influência da agitação mecânica e da composição enzimática o tratamento do algodão com celulases*. Braga: Escola de Engenharia, Universidade do Minho, 1995. Tese (Doutorado).

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

CHEUNG, S. W.; ANDERSON, B. C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater. *Biosour. Technol.*, v. 59, p. 81-90, 1997.

CONVERSE, A.O.; MATSUNO, R.; TANAKA, M.; TANIGUCHI, M. A model of enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme, *Biotechnol. Bieng.*, v. 32, p. 38-45, 1988.

CONVERSE, A. O. Substrate factors limiting enzymatic hydrolysis. In Saddler J.N. (ed.), **BIOCONVERSION OF FOREST AND AGRICULTURAL PLANT RESIDUES**, Wallingford: CAB International, 1993, p. 93-106.

DEKKER, R. F. H. Hidrolisis enzimática de lignocelulósicos. In IX CURSO INTERNACIONAL DE INGIENERIA BIOQUÍMICA, Valparaiso – Valparaiso, 1989.

DIVNE, C.; STAHLBERG, J.; REINIKAINEN, T.; RUOHONEN, L.; PETTERSON, G.; KNOWLES, C. K. J.; TEERI, T. T.; JONES, T. A. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. Science, v. 265, p. 524-528, 1994.

DWIVEDI, C.P.; GHOSE, T.K. A model of hydrolysis of bagasse cellulose by enzyme from *Trichoderma reesei* QM 9414. J. Fermentation Technology, v. 57, p. 15-24, 1979.

EL GAMMAL, A. A.; KAMEL, Z.; ADEEB, Z.; HELMY, S. M. Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. Polym. Degrad. Stabil., v. 61, p. 535-542, 1998.

Fabricação do peróxido – Grupo Solvay. Disponível em: <<http://www.solvay.pt/solvayinportugal/plantofpovoa/productline/processodefabricacaoperoxido/0,,1666-5-0,00.htm>>. Acesso em: 10/05/2008.

FAN, L.T.; LEE, Y.H., BEARDMORE, D.H. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. Biotechnology & Bioengineering, p. 419-424, 1981.

FANG, J. M.; SUN, R. C.; SALISBURY, D.; FOWLER, P.; TOMKINSON, J. Comparative study of hemicelluloses from wheat straw by alkali and hydrogen peroxide extractions. Polymer Degradation and Stability, v. 66, p. 423-432, 1999.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, p. 610, 1989.

FUENTES, L. L. G. *Obtenção de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com cal*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009. Dissertação (Mestrado).

FURLANI NETO, V.L.; RIPOLI, T.C.; VILA NOVA, N.A. Colheita mecânica: perdas de matéria-prima em canaviais com e sem queima prévia. Revista STAB, v.14, n 6, 1996.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 618, 2002.

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*, p. 1003-1018, 2003.

GARDNER, P.T.; WOOD, T.J.; CHESSON, A.; STUCHBURY, T. Effect of degradation on the porosity and surface area of forage cell walls of differing lignin content. *J Sci Food Agric.*, v. 79, p. 11-18, 1999.

GHARPURAY, M.M, LEE, Y.H.; FAN, L.T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Biotechnology & Bioengineering*, p. 157-172, 1983.

GHOSE, T. K.; DAS, K. A simplified kinetic approach to cellulose-cellulase system. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Ed: Springer Berlin / Heidelberg, 1971, Cap. 3, v. 1, p. 55-76.

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

GLASER. W.G. Potential role of lignin in tomorrow's wood utilization technologies. *Forest Products Journal*, v. 31, p. 24-29, 1981.

GOULD, J. M. Alkaline peroxide delignification of agricultural to enhance enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 26, p. 46-52, 1984.

GOULD, J. M. Studies on the mechanism of alkaline peroxide delignification of agricultural residues. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, p. 225-231, 1985.

HOLTZAPPLE, M. T.; CARAM, H. S.; HUMPHREY, A.E. The HCH-1 model of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, p. 775-780, 1984.

HOLTZAPPLE, M. T.; ROSS, M.; CHANG, N.; CHANG, V.; ADELSON, S.; BRAZEL,

C. Biomass conversion to mixed alcohol fuels using the MixAlco process. Applied Biochemistry and Biotechnology, Ed: Humana Press Inc., 1997, v. 79, p. 609-631.

HSU, T. A., LADISCH, M. R., TSAO, G. T. Alcohol from cellulose. Chemical Technology, v. 10 (5), p. 315–319, 1980.

INGRAM, L. O.; DORAN, J. B. Conversion of cellulosic material to ethanol. FEMS Microbiology Reviews, v. 16, p. 235-241, 1995.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.N. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. Biomass and Bioenergy, v. 14, p. 277-287, 1997.

KASAHARA, K.; SASAKI, H.; DONKAI, N.; YOSHIHARA, T.; TAKAGISHI, T.. Modification of tencel with treatment of ferric sodium tartrate complex solution I. Effect of treatment condition. Cellulose, v. 8, p. 23–28, 2001.

KARHUNEN, T.; MANTYLA, A. L.; NEVALAINEN, K. M. H.; SOUMINEN, P.L. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. Mol Gen Genet, v. 241, p. 515-522, 1993.

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

KIRK, T. K.; FARREL, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol, v. 41, p. 465-505, 1987.

KLINKLE, H.B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. Biotechnology and Bioengineering, v. 81, p. 738-747, 2003.

KNAPPERT, D.; GREITHLEIN, H.; CONVERSE, A. Partial acid hydrolysis of cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. Biotechnol. Bioeng., v. 22, p. 1449, 1980.

KONG, F.; ENGLER, C. R.; SOLTES, E. J. Effects of cell-wall acetate, xylan backbone,

and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 34/35, p. 23-35, 1992.

KOULLAS, D.P.; CHRISTAKOPOULOS, P.F.; KEKOS, D.; KOUKIOS, E.G.; MACRIS, B.J. Effect of alkali delignification on wheat straw saccharification by fusarium oxysporum cellulases. *Biomass Bioenergy*, p. 9-13, 1992.

KRISHNA, S. H.; PRASANTHI, K.; CHOWDARY, G. V.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 33, p. 825-830, 1998.

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.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. *FEMS yeast research*, v. 3, p. 133-140, 2003.

LEE, Y. H.; FAN, L.T. Kinetic studies of the enzymatic hydrolysis of cellulose: analysis of extended hydrolysis time. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 26, p. 775-780, 1983.

LEGRINI, O. E. O.; BRAUN, A. M. Photochemical process for water treatment. *Chem. Rev.*, v. 93, p. 671-698, 1993.

LEISOLA, M. S. A.; KOSULIC, B.; MEUSSDOERFFER, F.; FIETCHER, A. Homology among multiple extracellular peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem*, v. 262, p. 419-424, 1987.

LIU, C. F.; SUN, R. C.; QIN, M.; HANG, A. P.; REN, J. L.; XUB, F.; YE, J.; WU, S. B. Chemical modification of ultrasound-pretreated sugarcane bagasse with maleic anhydride. *Industrial Crops and Products*, v. 26, p. 212-219, 2007.

MANI, S.; TABIL, L. G. OPUKU, A. Etanol from agricultural crop residues, na overview. *Asae/Csae North Central Intersectional Meeting*. Canada, 2002.

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.

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K.A.; BRAZ, A.D.; FERNADES, J. R. Peróxido de

hidrogênio: importância e determinação. *Química Nova*, v. 26, p. 373-380, 2003.

MELLO, Jr. C. A.; COSTA, O. R. L.; MACHADO, P. F.; D'ARCE, R. D.; MATTOS, W. R. S. Efeito do tratamento a pressão de vapor no bagaço de cana de açúcar sobre a sua degradação in vitro e digestibilidade in vivo. *Livestock Research for Rural Development*, v. 1, nº 1, 1989.

MELLO, E. B.; CANEPA, E. L.; COSTA, M. M. Visões Ambientais para o Financiamento de Biocombustíveis no Brasil. *Environmental Guidance for Bio-Fuels Financing*. Departamento de Meio Ambiente do BNDES, p. 129 – 13, 2007.

MEUNIER-GODDIK, L.; BOTHWELL, M.; SANGSEETHONG, K.; PIYACHOMKWAN, K.; CHUNG, Y. C.; THAMMASOUK, K.; TANJO, D.; PENNER, M. H. Physicochemical properties of pretreated poplar feedstocks during simultaneous saccharification and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 10, p. 667-674, 1999.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Washington: American Chemical Society, 1994, p. 292–324.

McMILLAN, J.D. Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol. *Handbook on fuel ethanol: production and utilization*, 1996.

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

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden. Standard Procedure n. 03; Determination of acid-insoluble lignin in biomass. Golden, 1995. 2-13 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden. Standard Procedure n. 04; Determination of acid-soluble lignin in biomass. Golden, 1996. 2-7 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden. Standard Procedure n. 06; Measurements of cellulase activities, 1996. 1-9 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden. Standard

Procedure n. 10; Determination of extractives in biomass, 2005. 1-10 p.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY (NREL), Golden. Standard Procedure n. 02, 03, 17, 19; Determination of structural carbohydrates and lignin biomass. Golden, 2006. 1-14 p.

NEVES, J. L. M.; MARCHI, A.S.; PIZZINATO, A. A. S.; MENEGASSO, L. R. Comparative testing of floating and a conventional fixed base cutter. In INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS CONGRESS, 24, 2001, Brisbane. Proceedings... Mackay: The ISSCT Congress Organizing Committee, 2001. v. 2, p. 257-262.

NIDETZKY, B.; STEINER, W. A new approach for modeling cellulase-cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hydrolysis of microcrystalline substrate. *Biotechnol. Bieng.*, v. 42, p. 469-479, 1993.

O' DWYER, J. P.; ZHU, L.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Enzymatic hydrolysis of lime-pretreatment corn stover and investigation of the HCH-1 model: inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 model. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2969-2977, 2007.

ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 47, p. 7-14, 2001.

PAES, L. A. D. Palha – Potencial como combustível adicional ao bagaço. Geração de energia por biomassa: bagaço e palha. In: Seminário alternativas energéticas a partir da cana-de-açúcar, Centro de Tecnologia Canavieira, CTC. Piracicaba, 2005.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biosource Technology*, v. 74, p. 17, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. *Biosource Technology*, p. 69-80, 2000.

PASHKOVA, A.; SVAJDA, K.; DITTMAYER, R. Direct synthesis of hydrogen peroxide

in a catalytic membrane contactor. *Chemical Engineering Journal*, v. 139, p. 165 – 171, 2008.

PERES, S. Gás do bagaço de cana: um combustível substituto do gás natural. In XV SNPTEE Seminário Nacional de Produção e Transmissão de Energia Elétrica. Foz do Iguaçu, 1999.

Peróxido de hidrogênio. Disponível em: <<http://www.peroxidos.com.br>>. Acesso em: 10 maio 2008.

PHILLIPS, D.R.; VAN LEAR, D. H. Biomass removal and nutrient drain as affected by total-tree harvest in south ern pine and hardwood stands. *Journal of Forestry*, v. 82, n. 9, p. 547-550, 1984.

PU, Y., ZIEMER, C., RAGAUSKAS, A. J. Analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp. *Carbohydr Res*, v. 341, p. 591–597, 2006.

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

REIN, P. W. Prospects for the conversion of a sugar mill into a biorefinery. *Proc. Int. Soc. SugarCane Technol*, 2007.

RILEY, C. Bioethanol: A renewable transportation fuel from biomass. In AICHe SPRING CONFERENCE, 2002.

RIPOLI, T.C.; MIALHE, L. G, BRITO, J. O . Queima de Canavial: O desperdício não mais admissível. *Álcool & Açúcar*, v. 54, p. 18-23, 1990.

ROHELA, R. S.; SAHOO, N.; PAUL, S. C.; CHOUDHURY, S.; CHAKRAVORTTY, V. Thermal studies on isolated and purified lignin, *Thermochim. Acta*, v. 287, p. 131-138, 1996.

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.

SADDLER, J.N.; HOGAN, C. M.; LOUIS-SEIZE, G.; YU, E. K. C. Factor affecting cellulase production and the efficiency of cellulose hydrolysis. In MOO-YOUNG, M., HASNAIN, S., LAMPTEY, J. *Biotechnology and Renewable Energy*. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986, p. 83-92.

SAKA, S. Chemical composition and distribution. Dekker, p. 3-55, 1991.

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.

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-ray diffractometer. *Textile Res. Journal*, v. 29, p. 786, 1959

SHEEHAN, J. The Road to bioethanol. A strategic perspective of the US Department of Energy's National Ethanol Program. In Himmel, M.E.; Baker, J.O.; Saffler, J.N (eds). *GLYCOSYL HYDROLASES FOR BIOMASS CONVERSION*. Washington: American Chemical Society, 2001, p. 2-25.

SILVA, F.T. *Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral de bagaço de cana*. Campinas: Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. Tese (Doutorado).

SINITSYN, A. P.; GUSAKOV, A. V.; VLASEN, E. Y. Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 30, 43-59, 1991.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: review. *Biosource Tech*, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, R. C.; SUN, X. F. Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 415-423, 2002.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 10, p. 347-375, 1996.

TANAHASHI, M.; TAKADA, S.; AOKI, T.; GOTO, T.; HIGUCHI, T.; HANAI, S. Characterization of explosion wood. 1. Structure and physical properties. *Wood Research*, v. 69, p. 36–51, 1983.

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

THOMPSON, R. Industrial inorganic chemicals: productions and uses. *Hydrogen Peroxide*, p. 175-198, 1995.

TIEN, M; KIRK, T.K. Lignin – degrading enzyme from the *Hymenomycete Phanerochaete chrysosporium* burds. *Science*, p. 661-663, 1983.

TÍMAR-BALÁZSY, A.; EASTOP, D. *Chemical Principles of Textile Conservation* Butterworth Heinemann. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1998.

TSAO, G.T. Cellulosic material as a renewable resource. *Process Biochemistry*, v. 10, p. 12-14, 1978.

UNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Do Plástico ao Herbicida. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 21/06/2008.

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: 31-07-2008.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J.N.C.; SOUZA, M.B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 136-140, p. 141-153, 2007.

VIOLETTE, S. M. *Oxygen delignification kinetics and selectivity improvement*. Maine: The Graduated School, The University of Maine, 2003. Tese (Doutorado).

WARD, O. P. *Biotecnologia de la fermentacion*. Zaragoza: Acribia, 1989.

WHEALS, A. E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. *Tibtech*, 17, p. 482-487, 1999.

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

WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose. *Adv. Chem. Ser.*, v. 181, p. 181-209, 1979.

WRIGHT, J.D. High temperature acid hydrolysis of cellulose for fuel alcohol fuel production. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, p. 19, 1983.

WRIGHT, J.D. Ethanol from lignocellulosic: an overview. *Energy Progress*, p. 71-78, 1988.

WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities and commercial challenges. *Annu. Rev. Environ.* v. 24, p. 189-226, 1999.

ZHU, L.; DWYER, J. P.; CHANG, V. S.; GRANDA, C. B.; HOLTZAPPLE, M. T. Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Biosource Technology*, p. 3817-3828, 2008.

APÊNDICE A - Dados cinéticos do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino.

Tabela A1: Dados cinéticos obtidos para as temperaturas de 25, 45 e 65°C na etapa de pré-tratamento. Experimentos realizados em triplicata.

Lignina total (%)			
Tempo (min)	25°C	45°C	65°C
0	25,10 ± 0,49	25,10 ± 0,49	25,10 ± 0,49
30	8,60 ± 1,10	8,18 ± 1,02	3,44 ± 0,15
60	7,24 ± 1,55	7,26 ± 0,22	1,54 ± 0,02
90	3,35 ± 0,34	4,05 ± 0,13	1,59 ± 0,03
120	3,38 ± 1,10	4,09 ± 0,27	1,61 ± 0,12
150	3,39 ± 0,65	4,08 ± 0,13	1,55 ± 0,08
180	3,19 ± 0,04	4,10 ± 0,66	1,57 ± 0,04

Celulose (%)			
Tempo (min)	25°C	45°C	65°C
0	37,35 ± 0,52	37,35 ± 0,52	37,35 ± 0,52
30	36,53 ± 0,44	34,77 ± 0,11	30,15 ± 0,13
60	37,08 ± 0,40	34,05 ± 0,19	25,82 ± 0,23
90	31,72 ± 0,17	34,13 ± 0,20	25,53 ± 0,08
120	31,70 ± 0,23	33,36 ± 0,57	25,88 ± 0,22
150	31,24 ± 0,06	32,71 ± 0,17	24,51 ± 0,10
180	25,41 ± 0,04	29,54 ± 0,38	20,46 ± 0,16

Hemicelulose (%)			
Tempo (min)	25°C	45°C	65°C
0	23,66 ± 0,92	23,66 ± 0,92	23,66 ± 0,92
30	8,84 ± 0,24	12,08 ± 0,25	8,16 ± 0,14
60	7,78 ± 0,03	9,70 ± 0,00	6,15 ± 0,02
90	5,21 ± 0,05	7,65 ± 0,02	6,08 ± 0,07
120	4,76 ± 0,24	7,74 ± 0,07	5,79 ± 0,02
150	4,77 ± 0,02	8,20 ± 0,02	5,67 ± 0,23
180	3,89 ± 0,12	6,40 ± 0,05	5,46 ± 0,26

APÊNDICE B - Dados cinéticos da hidrólise com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar. Experimentos realizados em triplicata.

Tabela B1: Dados de celobiose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,038 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,033 ± 0,00	0,069 ± 0,01
20	0,043 ± 0,01	0,106 ± 0,01	0,213 ± 0,01	0,091 ± 0,00	0,078 ± 0,00
30	0,060 ± 0,00	0,095 ± 0,01	0,121 ± 0,00	0,135 ± 0,00	0,171 ± 0,01
40	0,062 ± 0,01	0,089 ± 0,00	0,114 ± 0,00	0,156 ± 0,00	0,181 ± 0,00
50	0,061 ± 0,00	0,088 ± 0,00	0,096 ± 0,01	0,173 ± 0,00	0,206 ± 0,01
60	0,031 ± 0,00	0,096 ± 0,01	0,081 ± 0,01	0,212 ± 0,02	0,256 ± 0,02
180	0,038 ± 0,00	0,337 ± 0,01	0,713 ± 0,09	1,169 ± 0,13	1,323 ± 0,13
360	0,040 ± 0,00	0,115 ± 0,00	0,146 ± 0,01	0,260 ± 0,01	1,429 ± 0,02
720	0,041 ± 0,00	0,106 ± 0,01	0,186 ± 0,01	0,258 ± 0,01	2,007 ± 0,06
1440	0,042 ± 0,00	0,112 ± 0,01	0,197 ± 0,01	0,307 ± 0,00	1,510 ± 0,06
2160	0,044 ± 0,00	0,120 ± 0,01	0,220 ± 0,00	0,326 ± 0,01	0,694 ± 0,02
2880	0,013 ± 0,00	0,109 ± 0,00	0,217 ± 0,01	0,357 ± 0,01	0,719 ± 0,02
3600	0,005 ± 0,00	0,108 ± 0,00	0,228 ± 0,00	0,362 ± 0,01	0,723 ± 0,01
4320	0,006 ± 0,00	0,117 ± 0,00	0,187 ± 0,00	0,286 ± 0,00	0,759 ± 0,03

Tabela B2: Dados de celobiose (g celobiose/g biomassa pré-tratada a.s.) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,004 ± 0,00	0,000 ± 0,00	0,000 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,00
20	0,004 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,002 ± 0,00
30	0,006 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00
40	0,006 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00
50	0,006 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00
60	0,003 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,005 ± 0,00
180	0,004 ± 0,00	0,017 ± 0,00	0,024 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,026 ± 0,00
360	0,004 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,029 ± 0,00
720	0,004 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,040 ± 0,00
1440	0,004 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,008 ± 0,00	0,030 ± 0,00
2160	0,004 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,008 ± 0,00	0,014 ± 0,00
2880	0,001 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,014 ± 0,00
3600	0,001 ± 0,00	0,005 ± 0,00	0,008 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,014 ± 0,00
4320	0,001 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,006 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,015 ± 0,00

Tabela B3: Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,024 ± 0,00	0,027 ± 0,00	0,017 ± 0,00	0,050 ± 0,00	0,051 ± 0,00
20	0,039 ± 0,00	0,073 ± 0,00	0,085 ± 0,00	0,077 ± 0,00	0,075 ± 0,00
30	1,634 ± 0,00	2,575 ± 0,01	3,248 ± 0,12	3,345 ± 0,02	3,286 ± 0,06
40	1,747 ± 0,02	2,653 ± 0,01	3,415 ± 0,02	3,832 ± 0,01	3,348 ± 0,04
50	1,791 ± 0,01	3,332 ± 0,13	3,453 ± 0,01	3,893 ± 0,08	3,382 ± 0,05
60	1,840 ± 0,02	3,360 ± 0,12	3,454 ± 0,03	3,932 ± 0,04	3,769 ± 0,12
180	2,305 ± 0,04	5,546 ± 0,13	6,472 ± 0,22	7,949 ± 0,23	9,122 ± 0,10
360	3,249 ± 0,01	6,283 ± 0,12	8,202 ± 0,10	10,172 ± 0,10	12,366 ± 0,10
720	3,741 ± 0,01	7,364 ± 0,01	10,129 ± 0,17	11,724 ± 0,05	14,170 ± 0,03
1440	4,185 ± 0,02	8,023 ± 0,21	11,493 ± 0,24	13,755 ± 0,17	16,934 ± 0,16
2160	4,536 ± 0,01	8,855 ± 0,51	12,652 ± 0,15	15,961 ± 0,17	19,288 ± 0,33
2880	4,700 ± 0,14	9,129 ± 0,13	13,511 ± 0,05	17,407 ± 0,02	19,595 ± 0,01
3600	4,928 ± 0,02	9,402 ± 0,04	13,878 ± 0,02	17,982 ± 0,19	20,188 ± 0,09
4320	5,030 ± 0,01	9,734 ± 0,30	14,143 ± 0,08	18,044 ± 0,01	21,434 ± 0,22

Tabela B4: Dados de glicose (g glicose/g biomassa pré-tratada a.s.) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,002 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,001 ± 0,01
20	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,001 ± 0,00
30	0,163 ± 0,00	0,129 ± 0,00	0,108 ± 0,00	0,084 ± 0,00	0,066 ± 0,00
40	0,174 ± 0,00	0,132 ± 0,00	0,114 ± 0,00	0,096 ± 0,00	0,067 ± 0,00
50	0,178 ± 0,00	0,166 ± 0,01	0,115 ± 0,00	0,097 ± 0,00	0,068 ± 0,00
60	0,183 ± 0,00	0,168 ± 0,01	0,115 ± 0,00	0,098 ± 0,00	0,075 ± 0,00
180	0,229 ± 0,00	0,277 ± 0,01	0,216 ± 0,00	0,198 ± 0,01	0,182 ± 0,00
360	0,323 ± 0,00	0,314 ± 0,01	0,273 ± 0,00	0,254 ± 0,00	0,247 ± 0,00
720	0,372 ± 0,00	0,368 ± 0,00	0,337 ± 0,00	0,293 ± 0,00	0,283 ± 0,00
1440	0,417 ± 0,00	0,400 ± 0,01	0,383 ± 0,00	0,343 ± 0,00	0,338 ± 0,00
2160	0,451 ± 0,00	0,442 ± 0,03	0,421 ± 0,00	0,399 ± 0,00	0,385 ± 0,01
2880	0,468 ± 0,01	0,456 ± 0,01	0,450 ± 0,00	0,435 ± 0,00	0,391 ± 0,00
3600	0,491 ± 0,00	0,469 ± 0,00	0,462 ± 0,00	0,449 ± 0,00	0,403 ± 0,00
4320	0,501 ± 0,00	0,486 ± 0,02	0,471 ± 0,00	0,451 ± 0,00	0,428 ± 0,00

Tabela B5: Dados de xilose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,205 ± 0,02	0,223 ± 0,01	0,210 ± 0,01	0,907 ± 0,02	0,713 ± 0,02
20	0,209 ± 0,00	0,361 ± 0,01	0,702 ± 0,01	1,665 ± 0,05	1,720 ± 0,06
30	0,679 ± 0,00	1,065 ± 0,02	1,080 ± 0,01	1,684 ± 0,04	2,668 ± 0,00
40	0,673 ± 0,01	1,052 ± 0,05	1,145 ± 0,02	1,724 ± 0,02	3,196 ± 0,04
50	0,662 ± 0,02	1,105 ± 0,03	1,204 ± 0,01	1,830 ± 0,03	3,213 ± 0,02
60	0,753 ± 0,02	1,162 ± 0,02	1,263 ± 0,06	2,005 ± 0,05	3,719 ± 0,01
180	1,490 ± 0,04	2,562 ± 0,08	2,749 ± 0,05	3,822 ± 0,09	5,180 ± 0,03
360	1,851 ± 0,04	3,244 ± 0,05	3,846 ± 0,02	4,632 ± 0,06	5,779 ± 0,17
720	2,120 ± 0,05	3,848 ± 0,01	4,566 ± 0,02	5,666 ± 0,08	6,295 ± 0,07
1440	2,227 ± 0,02	4,176 ± 0,09	5,052 ± 0,01	5,832 ± 0,17	6,710 ± 0,04
2160	2,357 ± 0,01	4,337 ± 0,10	5,113 ± 0,02	5,863 ± 0,20	6,819 ± 0,12
2880	2,401 ± 0,02	4,413 ± 0,06	5,139 ± 0,00	5,934 ± 0,01	7,109 ± 0,13
3600	2,406 ± 0,03	4,472 ± 0,03	5,166 ± 0,01	5,943 ± 0,08	7,148 ± 0,15
4320	2,415 ± 0,00	4,495 ± 0,04	5,168 ± 0,00	6,210 ± 0,03	7,144 ± 0,13

Tabela B6: Dados de xilose (g xilose/g biomassa pré-tratada a.s.) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,020 ± 0,00	0,011 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,023 ± 0,02	0,014 ± 0,000
20	0,021 ± 0,00	0,018 ± 0,00	0,023 ± 0,00	0,042 ± 0,05	0,034 ± 0,00
30	0,068 ± 0,00	0,053 ± 0,00	0,036 ± 0,00	0,042 ± 0,04	0,053 ± 0,00
40	0,067 ± 0,00	0,053 ± 0,00	0,038 ± 0,00	0,043 ± 0,02	0,064 ± 0,00
50	0,066 ± 0,00	0,055 ± 0,00	0,040 ± 0,00	0,046 ± 0,03	0,064 ± 0,00
60	0,075 ± 0,00	0,058 ± 0,00	0,042 ± 0,00	0,050 ± 0,05	0,074 ± 0,00
180	0,148 ± 0,00	0,128 ± 0,00	0,092 ± 0,00	0,095 ± 0,10	0,103 ± 0,00
360	0,184 ± 0,00	0,162 ± 0,00	0,128 ± 0,00	0,116 ± 0,06	0,115 ± 0,00
720	0,211 ± 0,00	0,192 ± 0,00	0,152 ± 0,00	0,141 ± 0,08	0,126 ± 0,00
1440	0,222 ± 0,00	0,208 ± 0,00	0,168 ± 0,00	0,146 ± 0,09	0,134 ± 0,00
2160	0,235 ± 0,00	0,217 ± 0,00	0,170 ± 0,00	0,146 ± 0,10	0,136 ± 0,00
2880	0,239 ± 0,00	0,220 ± 0,00	0,171 ± 0,00	0,148 ± 0,01	0,142 ± 0,00
3600	0,240 ± 0,00	0,223 ± 0,00	0,172 ± 0,00	0,148 ± 0,08	0,143 ± 0,00
4320	0,240 ± 0,00	0,224 ± 0,00	0,172 ± 0,00	0,155 ± 0,30	0,143 ± 0,00

Tabela B7: Dados de arabinose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,028 ± 0,00	0,034 ± 0,00	0,044 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,073 ± 0,00
20	0,035 ± 0,00	0,043 ± 0,00	0,053 ± 0,01	0,016 ± 0,00	0,078 ± 0,00
30	0,046 ± 0,00	0,054 ± 0,00	0,095 ± 0,00	0,109 ± 0,01	0,127 ± 0,00
40	0,047 ± 0,00	0,062 ± 0,00	0,099 ± 0,00	0,110 ± 0,00	0,137 ± 0,00
50	0,058 ± 0,00	0,080 ± 0,03	0,106 ± 0,00	0,113 ± 0,00	0,141 ± 0,00
60	0,065 ± 0,00	0,085 ± 0,00	0,114 ± 0,01	0,116 ± 0,01	0,145 ± 0,00
180	0,073 ± 0,00	0,196 ± 0,01	0,259 ± 0,00	0,261 ± 0,01	0,344 ± 0,01
360	0,134 ± 0,00	0,258 ± 0,01	0,305 ± 0,01	0,349 ± 0,00	0,385 ± 0,00
720	0,167 ± 0,00	0,318 ± 0,00	0,388 ± 0,00	0,387 ± 0,00	0,420 ± 0,00
1440	0,196 ± 0,00	0,348 ± 0,01	0,413 ± 0,00	0,433 ± 0,00	0,492 ± 0,02
2160	0,212 ± 0,00	0,372 ± 0,00	0,419 ± 0,00	0,486 ± 0,02	0,525 ± 0,00
2880	0,229 ± 0,00	0,384 ± 0,00	0,421 ± 0,00	0,504 ± 0,01	0,566 ± 0,01
3600	0,229 ± 0,00	0,384 ± 0,00	0,423 ± 0,00	0,504 ± 0,00	0,570 ± 0,02
4320	0,232 ± 0,00	0,384 ± 0,00	0,423 ± 0,00	0,505 ± 0,03	0,571 ± 0,02

Tabela B8: Dados de arabinose (g arabinose/g biomassa pré-tratada a.s.) obtidos para hidrólise enzimática com variação da concentração de bagaço de cana-de-açúcar.

	1%	2%	3%	4%	5%
Tempo (min)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,003 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,001 ± 0,00	0,000 ± 0,00	0,001 ± 0,00
20	0,003 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,002 ± 0,00	0,000 ± 0,00	0,002 ± 0,00
30	0,005 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00
40	0,005 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00
50	0,006 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00
60	0,007 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,004 ± 0,00	0,003 ± 0,00	0,003 ± 0,00
180	0,007 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,007 ± 0,00	0,007 ± 0,00
360	0,013 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,009 ± 0,00	0,008 ± 0,00
720	0,017 ± 0,00	0,016 ± 0,00	0,012 ± 0,00	0,010 ± 0,00	0,008 ± 0,00
1440	0,020 ± 0,00	0,017 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,011 ± 0,00	0,010 ± 0,00
2160	0,021 ± 0,00	0,019 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,012 ± 0,00	0,010 ± 0,00
2880	0,023 ± 0,00	0,019 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,011 ± 0,00
3600	0,023 ± 0,00	0,019 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,011 ± 0,00
4320	0,023 ± 0,00	0,019 ± 0,00	0,014 ± 0,00	0,013 ± 0,00	0,011 ± 0,00

APÊNDICE C - Dados cinéticos da hidrólise com variação da carga celulase e β -glicosidase. Experimentos em triplicata no ponto central.

Tabela C1: Dados de celobiose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)	Celobiose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,005	0,030	0,017	0,007	0,003	0,008	0,313	0,009	0,006 \pm 0,00
20	0,100	0,044	0,028	0,037	0,013	0,072	0,540	0,022	0,027 \pm 0,00
30	0,129	0,055	0,059	0,186	0,034	0,152	1,028	0,178	0,107 \pm 0,00
40	0,063	0,064	0,266	0,258	0,020	0,202	1,366	0,236	0,257 \pm 0,00
50	0,070	0,078	0,321	0,309	0,022	0,228	1,678	0,278	0,229 \pm 0,00
60	0,023	0,076	0,392	0,340	0,028	0,276	1,965	0,304	0,332 \pm 0,01
180	0,391	0,381	0,395	0,689	0,110	0,503	2,526	0,692	0,564 \pm 0,01
360	0,513	0,653	0,638	0,701	0,055	0,484	2,526	0,720	0,703 \pm 0,01
720	0,570	0,702	0,499	0,512	0,443	0,402	3,622	0,593	0,613 \pm 0,01
1440	0,585	0,678	0,528	0,539	0,466	0,445	4,329	0,409	0,554 \pm 0,10
2160	0,477	0,548	0,535	0,557	0,667	0,465	4,610	0,542	0,705 \pm 0,01
2880	0,271	0,270	0,149	0,419	0,704	0,468	4,323	0,343	0,453 \pm 0,01
3600	0,386	0,380	0,318	0,397	0,762	0,481	4,567	0,713	0,477 \pm 0,01
4320	0,629	0,629	0,475	0,426	0,712	0,499	4,623	0,769	0,473 \pm 0,01

Tabela C2: Dados de celobiose (g/g bagaço pré-tratado) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)	Celobiose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,000 ± 0,00
20	0,003	0,001	0,001	0,001	0,000	0,002	0,018	0,001	0,001 ± 0,00
30	0,004	0,002	0,002	0,006	0,001	0,005	0,034	0,006	0,004 ± 0,00
40	0,002	0,002	0,009	0,009	0,001	0,007	0,046	0,008	0,009 ± 0,00
50	0,002	0,003	0,011	0,010	0,001	0,008	0,056	0,009	0,008 ± 0,00
60	0,001	0,003	0,013	0,011	0,001	0,009	0,066	0,010	0,011 ± 0,00
180	0,013	0,013	0,013	0,023	0,004	0,017	0,084	0,023	0,019 ± 0,00
360	0,017	0,022	0,021	0,023	0,002	0,016	0,084	0,024	0,023 ± 0,00
720	0,019	0,023	0,017	0,017	0,015	0,013	0,121	0,020	0,020 ± 0,00
1440	0,020	0,023	0,018	0,018	0,016	0,015	0,144	0,014	0,018 ± 0,03
2160	0,016	0,018	0,018	0,019	0,022	0,015	0,154	0,018	0,023 ± 0,00
2880	0,009	0,009	0,005	0,014	0,023	0,016	0,144	0,011	0,015 ± 0,00
3600	0,013	0,013	0,011	0,013	0,025	0,016	0,152	0,024	0,016 ± 0,00
4320	0,021	0,021	0,016	0,014	0,024	0,017	0,154	0,026	0,016 ± 0,00

Tabela C3: Dados de glicose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)	Glicose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,299	0,358	1,134	0,879	0,040	0,808	0,151	0,680	0,296 ± 0,02
20	0,635	0,705	1,846	1,531	0,088	1,577	0,210	1,309	0,763 ± 0,02
30	1,061	1,654	2,851	2,583	0,108	2,552	0,608	2,087	2,100 ± 0,20
40	1,447	1,738	4,165	3,974	0,406	3,758	0,852	3,145	3,254 ± 0,10
50	1,559	2,079	5,404	5,073	0,536	4,494	0,995	3,880	3,570 ± 0,02
60	1,969	2,504	6,366	5,782	0,763	5,758	1,301	4,776	4,446 ± 0,02
180	7,802	7,530	7,608	8,994	3,800	6,538	3,722	5,868	7,143 ± 0,28
360	8,296	7,897	10,442	10,984	5,102	13,553	5,799	14,010	9,813 ± 0,12
720	10,913	8,821	13,402	13,982	6,071	16,324	6,617	15,839	14,258 ± 0,48
1440	14,606	12,625	16,171	16,340	6,927	18,786	8,642	17,789	18,031 ± 0,46
2160	15,859	14,516	16,190	16,531	7,718	19,132	10,181	18,148	19,380 ± 0,12
2880	16,396	14,974	16,243	16,822	7,836	19,150	11,682	18,385	19,584 ± 0,07
3600	16,484	14,939	16,296	16,959	8,445	19,620	12,242	18,518	19,699 ± 0,19
4320	16,587	15,728	16,260	17,104	8,570	19,659	12,722	18,647	19,747 ± 0,14

Tabela C4: Dados de glicose (g/g bagaço pré-tratado) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)	Glicose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,010	0,012	0,038	0,029	0,001	0,027	0,005	0,023	0,010 ± 0,00
20	0,021	0,024	0,062	0,051	0,003	0,053	0,007	0,044	0,025 ± 0,00
30	0,035	0,055	0,095	0,086	0,004	0,085	0,020	0,070	0,070 ± 0,01
40	0,048	0,058	0,139	0,133	0,014	0,125	0,028	0,105	0,108 ± 0,00
50	0,052	0,069	0,180	0,169	0,018	0,150	0,033	0,129	0,119 ± 0,00
60	0,066	0,083	0,212	0,193	0,025	0,192	0,043	0,159	0,148 ± 0,00
180	0,260	0,251	0,254	0,300	0,127	0,218	0,124	0,196	0,238 ± 0,01
360	0,277	0,263	0,348	0,366	0,170	0,452	0,193	0,467	0,327 ± 0,00
720	0,364	0,294	0,447	0,466	0,202	0,544	0,221	0,528	0,475 ± 0,02
1440	0,487	0,421	0,539	0,545	0,231	0,626	0,288	0,593	0,601 ± 0,02
2160	0,529	0,484	0,540	0,551	0,257	0,638	0,339	0,605	0,646 ± 0,00
2880	0,546	0,499	0,541	0,561	0,261	0,638	0,389	0,613	0,653 ± 0,00
3600	0,549	0,498	0,543	0,565	0,281	0,654	0,408	0,617	0,657 ± 0,01
4320	0,553	0,524	0,542	0,570	0,286	0,655	0,424	0,621	0,658 ± 0,00

Tabela C5: Dados de xilose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,348	0,417	0,736	0,667	0,266	0,552	0,459	0,551	0,503 ± 0,00
20	0,424	0,527	0,919	0,801	0,302	0,776	0,466	0,160	0,126 ± 0,00
30	0,544	0,640	1,131	1,101	0,336	0,990	0,792	0,916	0,736 ± 0,07
40	0,629	0,758	1,428	1,384	0,410	1,296	0,960	1,124	1,128 ± 0,01
50	0,641	0,818	1,648	1,563	0,418	1,362	1,054	1,243	1,252 ± 0,01
60	0,685	0,829	1,836	1,708	0,506	1,578	1,215	1,439	1,331 ± 0,04
180	1,427	1,580	2,170	2,973	1,023	2,731	2,112	2,740	2,134 ± 0,08
360	2,101	2,925	3,891	3,941	1,605	3,440	3,065	3,445	3,267 ± 0,02
720	2,583	3,406	4,491	4,412	2,315	3,722	3,588	3,954	3,770 ± 0,01
1440	3,385	4,199	5,058	4,866	3,221	4,165	4,147	4,844	4,507 ± 0,03
2160	3,459	4,353	5,060	4,867	3,486	4,172	4,174	4,877	4,770 ± 0,04
2880	3,670	4,482	5,080	4,870	3,489	4,184	4,320	5,019	4,886 ± 0,05
3600	3,681	4,528	5,178	5,110	3,494	4,333	4,345	5,040	5,004 ± 0,00
4320	3,691	4,536	5,193	5,127	3,696	4,427	4,583	5,064	5,080 ± 0,01

Tabela C6: Dados de xilose (g/g bagaço pré-tratado) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)	Xilose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,012	0,014	0,025	0,022	0,009	0,018	0,015	0,018	0,004 ± 0,00
20	0,014	0,018	0,031	0,027	0,010	0,026	0,016	0,005	0,017 ± 0,00
30	0,018	0,021	0,038	0,037	0,011	0,033	0,026	0,031	0,025 ± 0,00
40	0,021	0,025	0,048	0,046	0,014	0,043	0,032	0,037	0,038 ± 0,00
50	0,021	0,027	0,055	0,052	0,014	0,045	0,035	0,041	0,042 ± 0,00
60	0,023	0,028	0,061	0,057	0,017	0,053	0,040	0,048	0,044 ± 0,00
180	0,048	0,053	0,072	0,099	0,034	0,091	0,070	0,091	0,071 ± 0,00
360	0,070	0,097	0,130	0,131	0,053	0,115	0,102	0,115	0,109 ± 0,00
720	0,086	0,114	0,150	0,147	0,077	0,124	0,120	0,132	0,126 ± 0,00
1440	0,113	0,140	0,169	0,162	0,107	0,139	0,138	0,161	0,150 ± 0,00
2160	0,115	0,145	0,169	0,162	0,116	0,139	0,139	0,163	0,160 ± 0,00
2880	0,122	0,149	0,169	0,162	0,116	0,139	0,144	0,167	0,163 ± 0,00
3600	0,123	0,151	0,173	0,170	0,116	0,144	0,145	0,168	0,167 ± 0,00
4320	0,123	0,151	0,173	0,171	0,123	0,148	0,153	0,169	0,169 ± 0,00

Tabela C7: Dados de arabinose (g/L) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)	Arabinose (g/L)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,001	0,035	0,017	0,021	0,060	0,011	0,109	0,010	0,028 ± 0,00
20	0,002	0,036	0,022	0,023	0,065	0,012	0,111	0,010	0,033 ± 0,00
30	0,003	0,041	0,066	0,140	0,075	0,094	0,112	0,167	0,040 ± 0,00
40	0,003	0,044	0,173	0,152	0,080	0,097	0,139	0,171	0,046 ± 0,00
50	0,003	0,102	0,224	0,188	0,088	0,101	0,144	0,201	0,048 ± 0,00
60	0,007	0,103	0,225	0,191	0,092	0,105	0,146	0,206	0,064 ± 0,00
180	0,091	0,118	0,253	0,255	0,113	0,209	0,167	0,230	0,155 ± 0,00
360	0,117	0,215	0,334	0,285	0,140	0,234	0,185	0,304	0,214 ± 0,00
720	0,161	0,262	0,405	0,333	0,181	0,264	0,238	0,357	0,265 ± 0,00
1440	0,221	0,353	0,413	0,399	0,275	0,327	0,290	0,384	0,358 ± 0,02
2160	0,226	0,374	0,414	0,399	0,297	0,332	0,313	0,386	0,363 ± 0,01
2880	0,228	0,384	0,416	0,399	0,296	0,342	0,324	0,393	0,367 ± 0,01
3600	0,235	0,391	0,415	0,410	0,302	0,356	0,335	0,402	0,375 ± 0,01
4320	0,235	0,395	0,429	0,425	0,298	0,368	0,354	0,407	0,386 ± 0,00

Tabela C8: Dados de arabinose (g/g bagaço pré-tratado) obtidos para hidrólise enzimática com variação da carga enzimática.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Pontos Centrais
Tempo (min)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)	Arabinose (g/g)
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,000	0,004	0,000	0,001 ± 0,00
20	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002	0,000	0,004	0,000	0,001 ± 0,00
30	0,000	0,001	0,002	0,005	0,002	0,003	0,004	0,006	0,001 ± 0,00
40	0,000	0,001	0,006	0,005	0,003	0,003	0,005	0,006	0,002 ± 0,00
50	0,000	0,003	0,007	0,006	0,003	0,003	0,005	0,007	0,002 ± 0,00
60	0,000	0,003	0,008	0,006	0,003	0,004	0,005	0,007	0,002 ± 0,00
180	0,003	0,004	0,008	0,009	0,004	0,007	0,006	0,008	0,005 ± 0,00
360	0,004	0,007	0,011	0,010	0,005	0,008	0,006	0,010	0,007 ± 0,00
720	0,005	0,009	0,013	0,011	0,006	0,009	0,008	0,012	0,009 ± 0,00
1440	0,007	0,012	0,014	0,013	0,009	0,011	0,010	0,013	0,012 ± 0,00
2160	0,008	0,012	0,014	0,013	0,010	0,011	0,010	0,013	0,012 ± 0,00
2880	0,008	0,013	0,014	0,013	0,010	0,011	0,011	0,013	0,012 ± 0,00
3600	0,008	0,013	0,014	0,014	0,010	0,012	0,011	0,013	0,012 ± 0,00
4320	0,008	0,013	0,014	0,014	0,010	0,012	0,012	0,014	0,012 ± 0,00