



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES
REDUTORES TOTAIS A PARTIR DO BAGAÇO
DE LARANJA (*Citrus sinenses*) POR
HIDRÓLISES ÁCIDA DILUÍDA E ENZIMÁTICA**

DISSENTE: Danielle Pires Nogueira

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Araceli Aparecida Seolatto
COORIENTADORA: Prof.^a Dra. Fernanda Ferreira Freitas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GOIÂNIA - 2016

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS
TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL
DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Danielle Pires Nogueira		
E-mail:	nogueira.dp@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Desempregada		
Agência de fomento:		Sigla:	
País:		UF:	
		CNPJ:	
Título:	Estudo da obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja (<i>Citrus sinenses</i>) por hidrólises ácida diluída e enzimática.		
Palavras-chave:	Planejamento composto central, xilanase, celulase		
Título em outra língua:			
Palavras-chave em outra língua:	Central composite design, xylanase, cellulase		
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	18 de abril de 2016		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química		
Orientador (a):	Araceli Aparecida Seolatto		
E-mail:	araceliseolatto@gmail.com		
Co-orientador (a):	Fernanda Ferreira Freitas		
E-mail:	fernanda_ferreira_freitas@ufg.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento: SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Danielle Pires Nogueira

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 07 / 08 / 16

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

**ESTUDO DA OBTENÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES
TOTAIS A PARTIR DO BAGAÇO DE LARANJA (*Citrus
sinenses*) POR HIDRÓLISES ÁCIDA DILUÍDA E ENZIMÁTICA**

DISSENTE: Danielle Pires Nogueira

ORIENTADORA: Prof.^a Dra. Araceli Aparecida Seolatto
Coorientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Ferreira Freitas

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Engenharia Química como
requisito parcial para a obtenção
do grau de Mestre em Engenharia
Química

GOIÂNIA – 2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Pires Nogueira, Danielle

Estudo da obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja (*Citrus sinenses*) por hidrólises ácida diluída e enzimática [manuscrito] / Danielle Pires Nogueira. - 2016.
v, 74 f.

Orientador: Profa. Dra. Araceli Aparecida Seolatto; co-orientadora
Dra. Fernanda Ferreira Freitas.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Apêndice.
Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

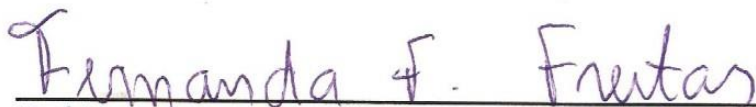
1. Planejamento composto central. 2. Xilanase. 3. Celulase. I.
Seolatto, Araceli Aparecida, orient. II. Ferreira Freitas, Fernanda, co orient. III. Título.

Folha de Aprovação

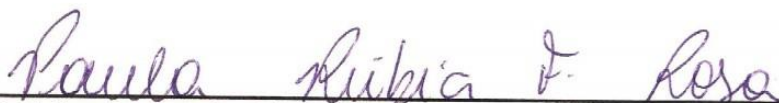
Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pela discente Danielle Pires Nogueira, em 18/04/2016:



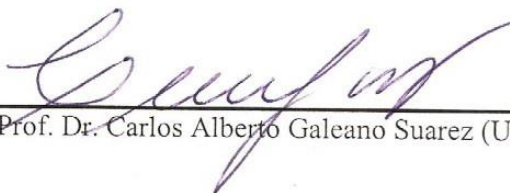
Prof. Dra. Araceli Aparecida Seolatto (UFG)



Prof. Dra. Fernanda Ferreira Freitas (UFG)



Prof. Dra. Paula Rúbia Ferreira Rosa (UFSCar)



Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez (UFG)

Dedico este trabalho a meus pais, Marli e Jose Wilson pela infinita fonte de amor e apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, José Wilson e Marli, e minha irmã, Alinne, por todo o apoio, emocional e financeiro.

Às minhas orientadoras, Araceli e Fernanda, pelo voto de confiança e ensinamentos.

Aos colegas de bancada, Lorena, Rodrigo, Rowander, Lorena Alcântara e Mariana, pelo auxílio nos momentos de dúvida e infinitas risadas.

Aos colegas de mestrado, Vitor, Aline, Camila, e Késia, que ajudaram nas disciplinas e nos momentos de dificuldade.

À minha querida Prof.^a Dra. Adriana, pelo apoio no momento mais difícil nesta caminhada.

À minha prima Isadora, pelos conselhos e ajuda.

Às minhas grandes amigas, Naiane, Nathalia, Thatyana e Yasmini, que tem me acompanhado e apoiado desde os tempos de graduação.

A Isadora Ferreira e Luciana Fontinelle, pelo auxílio na realização do trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia na pessoa de Janaína Fisher pelas análises de caracterização.

À Funape e ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Biocombustíveis.....	4
2.1.1 Etanol.....	5
2.1.2 Políticas Sobre a Bioenergia no Brasil e no mundo.....	7
2.2 Materiais lignocelulósicos.....	8
2.2.1 Bagaço de laranja.....	11
2.3 Hidrólise enzimática.....	12
2.4 Hidrólise ácida diluída.....	13
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Materiais.....	16
3.1.1 Reagentes.....	16
3.1.2 Equipamentos.....	17
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Obtenção e preparo da biomassa e caracterização quanto a umidade, cinzas, holocelulose, hemicelulose, celulose e lignina.....	18
3.2.1.1 Obtenção e Preparo da Biomassa.....	18
3.2.1.2 Determinação da Umidade.....	19
3.2.1.3 Determinação de Cinzas.....	19
3.2.1.4 Determinação do Conteúdo de Holocelulose, Celulose e Hemicelulose da Biomassa.....	20
3.2.1.4.1 Extrativos.....	20
3.2.1.4.2 Holocelulose, Hemicelulose e Celulose.....	21
3.2.1.5 Caracterização do Conteúdo de Lignina.....	22
3.2.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio.....	23
3.2.3 Pré-teste Hidrólise Enzimática.....	24
3.2.4 Planejamento Composto Central.....	25
3.2.4.1 Hidrólise Ácida.....	25
3.2.4.2 Hidrólise Enzimática.....	25

3.2.5 Determinação de Açúcares Redutores Totais.....	26
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	27
4.1 Obtenção e Caracterização da Biomassa.....	27
4.1.1 Preparo da Biomassa.....	27
4.1.2 Conteúdo de Umidade, Cinzas, Holocelulose, Celulose, Hemicelulose, Extrativos e Lignina.....	29
4.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio.....	32
4.3 Pré-teste Hidrólise Enzimática.....	32
4.4 Planejamento Composto Central.....	33
4.4.1 Hidrólise Ácida.....	33
4.4.2 Hidrólise Enzimática.....	45
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
APÊNDICE A – TAMPÕES.....	61
APÊNDICE B – REAGENTE DE DNS.....	63
APÊNDICE C – CÁLCULOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	64
APÊNDICE D – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS...	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema da Pluralidade de Biocombustíveis Formados a partir de Fontes Lignocelulósicas	5
Figura 2.2: Esquema de Biorrefinarias de Multiproduto Através de Fracionamento de Lignocelulose Seguido por Conversões.....	9
Figura 2.3: Anatomia da Laranja.....	11
Figura 2.4: Esquema Bioquímico da Hidrólise Ácida na Cadeia de Celulose.....	14
Figura 3.1: Fluxograma dos Métodos Seguidos no Capítulo Três.....	18
Figura 3.2: Sistema de Extração Soxhlet.....	20
Figura 4.1: Bagaço de Laranja Cortado Antes da Secagem.....	27
Figura 4.2: Bagaço de Laranja Disposto em Bandejas Dentro da Estufa Antes da Secagem.....	28
Figura 4.3: Bagaço de Laranja Seco Antes da Moagem.....	28
Figura 4.4: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Completo....	36
Figura 4.5: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Reduzido....	37
Figura 4.6: Valores Preditos pelo Modelo <i>versus</i> Valores Observados no Experimento.....	38
Figura 4.7: Resíduos <i>versus</i> Valores Observados.....	38
Figura 4.8: Superfície de Resposta da Relação Entre a Temperatura e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	40
Figura 4.9: Superfície de Contorno da Relação Entre a Temperatura e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	40
Figura 4.10: Superfície de Resposta da Relação Entre o Tempo e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	42
Figura 4.11: Superfície de Contorno da Relação Entre o Tempo e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	42
Figura 4.12: Superfície de Resposta da Relação Entre o Tempo e a Temperatura na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	44
Figura 4.13: Superfície de Contorno da Relação Entre o Tempo e a Temperatura na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).....	44
Figura 4.14: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo.....	48
Figura 4.15: Valores Preditos pelo Modelo <i>versus</i> Valores Observados no Experimento.....	49

Figura 4.16: Resíduos <i>versus</i> Valores Observados.....	49
Figura 4.17: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Xilanase e a Concentração de Celulase na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	51
Figura 4.18: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Xilanase e a Concentração de Celulase na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	51
Figura 4.19: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Celulase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	53
Figura 4.20: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Celulase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	53
Figura 4.21: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Xilanase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	55
Figura 4.22: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Xilanase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Fatores do Pré-teste da Combinação de Enzimas.....	24
Tabela 3.2: Fatores do Planejamento Experimental 2 ³ Completo com Composto Central da Hidrólise Ácida do Bagaço de Laranja.....	25
Tabela 3.3: Fatores do Planejamento Experimental 2 ³ Completo com Composto Central da Hidrólise Enzimática do Bagaço de Laranja.....	26
Tabela 4.1: Resultados da Caracterização Granulométrica do Bagaço de Laranja Seco Moído.....	29
Tabela 4.2: Médias das Análises de Caracterização do Bagaço de Laranja Seco Moído.....	30
Tabela 4.3: Resultados de ART após Pré-teste de Hidrólise Enzimática com e sem Xilanase.....	32
Tabela 4.4: Concentração de ART Liberados pela Hidrólise Ácida em mg de ART por g de Biomassa.....	33
Tabela 4.5: Parâmetros da Regressão da Hidrólise Ácida.....	35
Tabela 4.6: Parâmetros Significativos da Regressão da Hidrólise Ácida...	36
Tabela 4.7: Concentração de ART Liberados pela Hidrólise Enzimática em mg de ART por g de Biomassa.....	46
Tabela 4.8: Parâmetros Significativos a Regressão da Hidrólise Enzimática.....	47

RESUMO

Frente as recentes buscas por novos combustíveis de fontes renováveis o etanol de segunda geração tem ganhado força, por poder ser produzido a partir de diversas matérias primas lignocelulósicas, como os resíduos agroindustriais. Objetivou-se com este trabalho estudar a geração de açúcares redutores por hidrólises ácida diluída e enzimática do bagaço de laranja proveniente da indústria de suco. O bagaço de laranja foi coletado, cortado, seco e moído. Granulometria, umidade, cinzas, concentrações de holocelulose, celulose, hemicelulose e lignina solúvel e insolúvel foram determinadas. O pré-tratamento foi realizado com hidróxido de cálcio de acordo com o previamente testado por Silva et al. (2013). Foi realizado um pré-teste da combinação das enzimas. Para as hidrólises foram feitos dois planejamentos fatoriais do tipo composto central 2^3 , com resposta em açúcares redutores totais (ART). Para a hidrólise ácida diluída os fatores estudados foram concentração de HCl, temperatura e tempo de hidrólise, na enzimática as concentrações de celulase e hemicelulase e o tempo. Na análise granulométrica encontrou-se 47,75% da biomassa com diâmetro superior a 0,833 mm, 32,84% de biomassa com diâmetro médio de 0,564 mm e 19,41% com diâmetro inferior a 0,295 mm. A umidade da biomassa antes da secagem foi de 84,69%, depois da secagem de 7,38% e as cinzas 3,79%. O conteúdo de celulose foi de 22,90% e o de hemicelulose 3,39%. O conteúdo de lignina foi de 9,90%. Houve uma perda de massa média de 30,03% no pré-tratamento. O pré-teste indicou um efeito positivo na combinação das enzimas para geração de açúcares redutores. Os resultados de açúcares redutores da hidrólise ácida variaram de $9,32 \pm 0,68$ mg ART por g de biomassa a $30,15 \pm 0,31$ mg ART por g biomassa, o fator mais significativo foi a temperatura e o menos o tempo, não foi possível encontrar a região ótima com os fatores estudados. Os resultados de açúcares redutores da hidrólise enzimática variaram de $75,33 \pm 3,82$ mg ART por g biomassa a $99,66 \pm 0,62$ mg ART por g biomassa, o fator mais significativo foi a concentração de celulase e o menos a concentração de xilanase. Com os fatores estudados não foi possível encontrar a região ótima de geração de açúcares redutores. A hidrólise enzimática gerou maiores concentrações de açúcares redutores que a hidrólise ácida.

Palavras-chave: Planejamento composto central, xilanase, celulase.

ABSTRACT

Due to the recent research for new fuels from renewable sources ethanol has been gaining momentum, because it can be produced from diverse raw materials, such as agro-industrial residues. The objective with this work was to study the production of reducing sugar by dilute acid, and enzymatic hydrolysis of the orange bagasse from juice industry. The orange bagasse was collected, cut into pieces, and crushed. Granulometry, and the contents of moisture, ashes, holocellulose, cellulose, hemicellulose, soluble and insoluble lignin were determined. The pre-treatment was done with calcium hydroxide following what was previously tested by Silva et al. (2013). A pre-test of the enzymes combination was done using 2 g of pre-treated biomass, in dry base, using 3 FPU/mL of cellulase, and 0 U/g and 3 U/g of xylanase. For the hydrolysis two central composite factorial 2^3 designs were done, with the answer in total reducing sugars (ART). For the dilute acid hydrolysis the factors were HCl concentration, temperature, and time, and for the enzymatic the concentrations of cellulase and xylanase and time. The granulometry showed that 47.75% of the biomass with diameter over 0.833 mm, 32.84% of the biomass with an average diameter of 0.564 mm, and 19.41% of the biomass with diameter under 0.295 mm. The moisture content prior to drying was 84.69% and 7.38%, the ashes content was 3.79%. The cellulose content was 22.90% and the hemicellulose was 3.39%. The lignin content was 9.90%. The reducing sugar results for the acid hydrolysis varied from 9.32 ± 0.68 mg ART per g of biomass to 30.15 ± 0.31 mg ART per g biomass, the most significant factor was temperature, and the least was time. It was not possible to find the optimum region with the studied factors. The reducing sugar results for the enzymatic hydrolysis varied from 75.33 ± 3.82 mg ART per g biomass to 99.66 ± 0.62 mg ART per g biomass, the most significant factor was the cellulase concentration, and the least significant the xylanase concentration. The studied factors did not show the optimum region to maximize the reducing sugars content. The enzymatic hydrolysis produced larger concentrations of reducing sugars than the acid hydrolysis.

Keywords: Central composite design, xylanase, cellulase.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis são utilizados pelos seres humanos desde a pré-história e eram os mais comuns antes do século 19, quando começaram a ser substituídos por combustíveis fósseis, que atendem a mais de 80% da necessidade energética do mundo. Entretanto, suas reservas são limitadas e estão se esgotando a uma velocidade alarmante. Aquecimento global, altos preços do petróleo, esgotamento das reservas, assim como novos investimentos tem levado a busca por combustíveis renováveis e sustentáveis. Os resíduos lignocelulósicos gerados por processos industriais podem ser usados para produzir combustíveis de 2ª geração reduzindo o volume de resíduos sólidos e resolvendo o problema de geração de energia. Apesar de serem promissores ainda são necessárias muitas pesquisas para que esses processos sejam economicamente viáveis (ACKER et al., 2014; CANIZO et al., 2014; GUO et al., 2015; KOSINKOVA et al., 2015).

Um dos biocombustíveis que vem sendo mais estudados é o etanol, ele pode ser produzido a partir de diversas matérias-primas de grande disponibilidade e baixo custo (CANIZO et al., 2014; COTANA et al., 2014). A celulose é um dos polissacarídeos mais comuns no mundo e os resíduos ricos em lignocelulose são gerados em grandes quantidades pela agricultura e pelas indústrias. Os custos de geração de biomassa no Brasil são considerados os mais baixos do mundo, com possibilidade de, nos próximos anos, aumentar a produção de etanol lignocelulósico em 50% sem aumentar as áreas de cultivo já existentes (FONSECA, 2014; SILVA et al., 2015).

Os primeiros passos para a conversão de biomassa lignocelulósica em etanol são a redução do tamanho de partícula e o pré-tratamento, que expõe a matriz lignocelulósica para a hidrólise. Os passos seguintes são a hidrólise, a fermentação e a destilação (COTANA et al., 2014; CANIZO et al., 2014; SILVA et al., 2015). O processo considerado mais impactante é a hidrólise, que pode ser enzimática ou ácida (DUSSÁN et al., 2014). A hidrólise ácida

pode ser concentrada ou diluída. Para o processo diluído são necessárias altas temperaturas que podem gerar compostos indesejados, e com ácidos concentrados podem haver dificuldades no processo, como corrosão e custos de neutralização. Dependendo das condições ela dispensa o pré-tratamento, porém para quebrar a celulose são necessárias altas temperaturas e concentrações de ácido. Entretanto, as condições extremas podem gerar cofatores inibitórios e degradar os açúcares a outros compostos (LENIHAN et al., 2010; DUSSÁN et al., 2014; CANIZO et al., 2014; FONSECA, 2014). Para a hidrólise enzimática é necessário pré-tratar a biomassa para tornar a celulose acessível às enzimas. A maior parte dos estudos envolvem enzimas, apesar disso os volumes de hidrolisado são insuficientes para os processos de fermentação subsequentes. Mesmo com a redução do custo das enzimas nos últimos 20 anos, elas ainda representam em torno de 50% do custo do etanol e segunda geração, que é muito superior ao do etanol de primeira geração (RABELO, 2010; DUSSÁN et al., 2014; ACKER et al., 2014).

A laranja é muito consumida em todo o mundo, *in natura* ou processada, gerando enormes quantidades de bagaço como resíduo, aproximadamente 50% do fruto. O Brasil é o líder mundial na produção de laranjas, detendo 35% da produção, cerca de 16,3 milhões de toneladas em 2013, além de ser o maior produtor de suco de laranja concentrado congelado. O bagaço de laranja contém aproximadamente 16% de hemicelulose, 28% de celulose e 9% de lignina, se mostrando uma alternativa viável para produzir etanol de segunda geração (KUMAR et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Em teoria, qualquer material vegetal pode ser utilizado na geração de bioetanol, visto que a celulose, a hemicelulose e a lignina são os três principais compostos na construção das paredes celulares de todas as plantas. Entretanto, é bastante difícil desentrelaçar estes três compostos das fibras, despolimerizando-os em açúcares simples, por isso conduzem-se várias pesquisas a fim de desenvolver métodos eficazes de pré-tratamento para a obtenção de açúcares simples a partir de fontes lignocelulósicos (GUO et al., 2015; RODRIGUES, 2011).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar a viabilidade da obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço da laranja. Para tal foram avaliados dois tipos de hidrólise, ácida diluída e enzimática. Para a hidrólise ácida estudou-se a aplicação de temperaturas mais brandas para reduzir os gastos energéticos bem como a geração de compostos inibitórios. Para a hidrólise enzimática estudou-se a combinação de uma celulase e uma hemicelulase para potencializar a geração de açúcares.

1.1.2 Objetivos específicos

- Secar, moer e caracterizar o bagaço de laranja obtido na indústria de sucos Gyn Fruit quanto a umidade, cinzas e conteúdo lignocelulósico;
- Pré-tratar a biomassa com hidróxido de cálcio;
- Avaliar a combinação de celulase e xilanase para aumentar a geração de açúcares redutores totais na hidrólise enzimática;
- Estudar a hidrólise ácida diluída analisando os fatores temperatura, tempo, e concentração de ácido clorídrico de acordo com planejamento experimental pré-definido;
- Estudar a hidrólise enzimática analisando os fatores concentração de xilanase, concentração de celulase e tempo de hidrólise de acordo com pré-teste de combinação de enzimas e planejamento experimental pré-definido;

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biocombustíveis

A palavra biocombustível se refere a biomassa vegetal e produtos refinados, em estado sólido, líquido e gasoso, que queimados geram energia na forma de calor e luz. Seres humanos utilizam biocombustíveis desde a pré-história, e antes do século 19 a madeira era o combustível predominante para cozimento e aquecimento, assim como o óleo vegetal era o principal combustível para iluminação. Hoje em dia, os combustíveis fósseis atendem mais de 80% da necessidade energética mundial, porém suas reservas são limitadas (GUO et al., 2015). A redução dessas reservas, assim como o aquecimento global, o alto preço do petróleo e a crescente demanda energética, têm levado à busca por combustíveis renováveis e sustentáveis (CANIZO et al, 2014; KOSINKOVA, 2015).

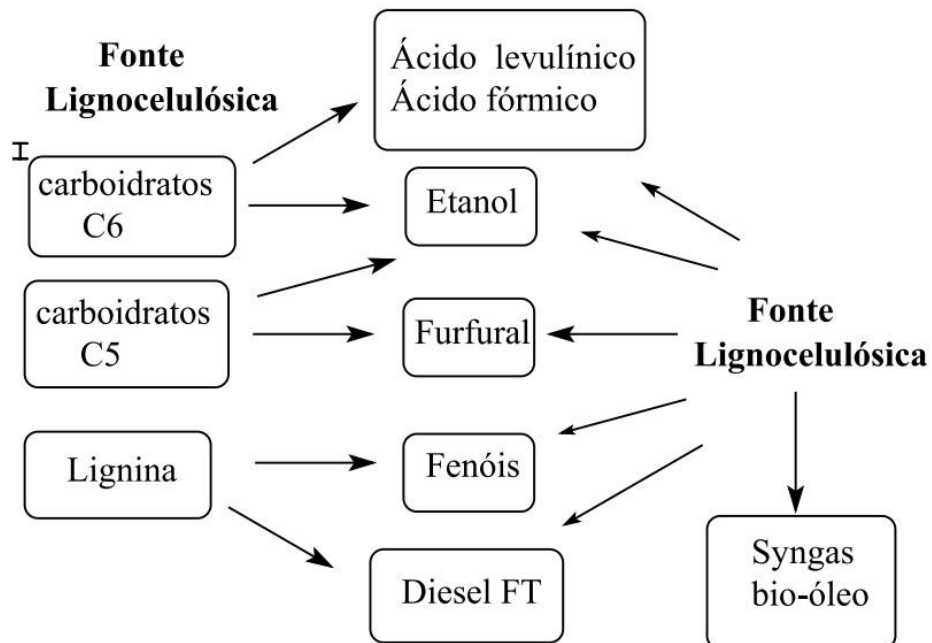
Segundo Rodrigues (2011), combustíveis baseados em biomassa usados principalmente em transportes, são chamados biocombustíveis de primeira e/ou segunda geração, sendo os de primeira geração aqueles gerados com matérias-primas também utilizadas na alimentação, seja de humanos ou de animais, e os de segunda geração aqueles produzidos a partir de resíduos, rejeitos ou produtos não comestíveis.

Dentre os biocombustíveis sólidos temos madeira, que pode ser utilizada inteira, na forma de serragem, *pellets* ou carvão, gerando diferentes quantidades de calor. Os biocombustíveis líquidos incluem bioetanol e biodiesel. Os biocombustíveis gasosos são biogás e gás de síntese, que tem aplicações similares ao gás natural. A utilização total de biocombustíveis atingiu $0,55 \times 10^{20}$ J/ano em 2012 representando 80% do total de combustíveis renováveis. Particularmente bioetanol e biodiesel tem tido suas produções aumentadas para complementar as reservas decrescentes de combustíveis fósseis (GUO et al.,2015).

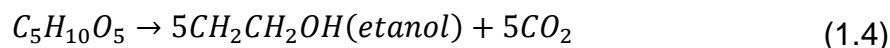
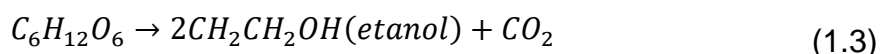
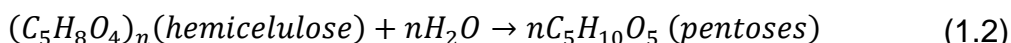
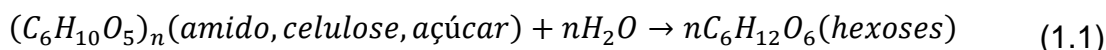
2.1.1 Etanol

Para atingir as metas de redução de combustíveis fósseis na Europa, a produção de etanol de biomassa lignocelulósica se torna estratégica, pois é uma forma tecnologicamente sustentável de produção, que não compete com a agricultura alimentar, permitindo o uso de resíduos e reduzindo os impactos ambientais associados aos biocombustíveis de primeira geração (COTANA et al., 2014). Nos dias de hoje, a maior parte do etanol produzido no mundo vem de insumos como grãos, cana de açúcar, milho ou beterraba, entretanto, ao utilizar biomassa lignocelulósica, pode-se reaproveitar o rejeito de insumos renováveis para produzir energia. Apesar de promissor, o uso desses resíduos para a geração de combustíveis economicamente interessantes ainda necessita de pesquisas (ACKER et al, 2014; GUO et al, 2015; KOSINKOVA, 2015). A Figura 2.1 exemplifica a variedade de produtos que podem ser gerados pela hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

Figura 2.1: Esquema da Pluralidade de Biocombustíveis Formados a partir de Fontes Lignocelulósicas (RODRIGUES, 2011).



Guo et al. (2015) ressalta que o etanol pode ser produzido a partir de biomassa através da fermentação, que envolve as seguintes reações bioquímicas (Equações 1.1 a 1.4):



O processo típico para a fabricação de etanol de primeira geração, produzido a partir de culturas alimentares, trata-se de uma série de passos, tais como moagem, liquefação e sacarificação (mostos amiláceos), fermentação, destilação, secagem e desnaturação. (GUO et al., 2015). Para a produção de bioetanol de segunda geração são necessários 5 processos: (1) Moagem: redução do tamanho de partícula; (2) Pré-tratamento: remoção da lignina e parte da hemicelulose para expor a matriz celulósica para a posterior hidrólise; (3) Hidrólise: quebra dos polissacarídeos a monossacarídeos; (4) Fermentação: conversão dos monossacarídeos a etanol; (5) Destilação: recuperação do etanol gerado (SILVA et al., 2015).

No panorama mundial, o etanol comercial obteve uma produção de 4,0 bilhões de litros em 1990, já nos anos 2000 houve um ligeiro aumento para 4,5 bilhões de litros, mas rapidamente a produção alcançou 23,3 bilhões de litros (em 2010). Os 23,4 bilhões de litros consumidos em 2013 foram produzidos nos EUA, Brasil, Europa, China e Canadá. Esses dados mostram que a produção e comercialização de biocombustíveis no exterior aumentaram potencialmente, exigindo assim políticas internacionais (GUO et al., 2015).

Em 2013 a primeira usina de etanol celulósico em escala comercial (A Crescentino Biorefinery, Crescentino, Vercelli, Itália) entrou em pleno funcionamento, tendo como meta produzir anualmente 20 milhões de galões de etanol a partir de palha de trigo e a cana. Sua produção utiliza a tecnologia patenteada "Proesa" em que a biomassa das plantas é pré-tratada com vapor (alta temperatura e pressão), seguido por hidrólise enzimática (GUO et al., 2015). No Brasil a Raízen, usina sucroenergética de Piracicaba-SP também produz etanol de segunda geração (RAÍZEN, 2014).

2.1.2 Políticas Sobre a Bioenergia no Brasil e no mundo

O Brasil é o país pioneiro no desenvolvimento de biocombustíveis no mundo, estando na liderança da produção e vendas do etanol. A primeira investida do governo brasileiro foi na década de 1970, quando houve uma crise do petróleo, o Brasil então lançou o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), introduzindo uma série de medidas a fim de melhorar a produção de etanol, reduzir a dependência do petróleo importado e lidar com a queda acentuada do preço nacional de açúcar. O sucesso do Proálcool faz com que a indústria de cana de açúcar e etanol no Brasil corresponda a 3,5% do PIB nacional, fornecendo cerca de 3,6 milhões de empregos. 50% da produção nacional de cana é utilizada para produzir etanol. Para manter sua posição de liderança no mundo, o Brasil continuamente incentiva a produção de etanol. Em abril de 2013, o governo brasileiro anunciou uma série de políticas de incentivo à produção de etanol, como a isenção dos impostos PIS e CONFIN para as indústrias de etanol, assim como o facilitamento de empréstimos junto ao BNDES a juros baixos para que os agricultores de cana expandam a terra cultivada, promovendo a melhoria das espécies produzidas (SU et al., 2015).

Brasil promove o desenvolvimento de biocombustíveis por meio de legislação e política financeira para assegurar a execução do plano. A Lei Federal nº 11.116 promulgada em maio de 2005 fornece PIS / PASEP e benefícios fiscais CONFINS para o biodiesel produzido a partir do óleo de rícino, provenientes das zonas Norte e Nordeste, áreas semiáridas do país. O Brasil também criou demanda para incentivar a produção de biodiesel e a Petrobrás tem contrato com empresas que produzem biodiesel e sua adição ao diesel já está em execução (SU et al., 2015).

Nos últimos anos, o Brasil vem concentrando esforços em pesquisa e desenvolvimento e industrialização de biocombustíveis avançados, especialmente da área de aviação, buscando a obtenção de cooperação internacional para o desenvolvimento de pesquisas nessa área. Em outubro de 2011, a EMBRAER assinou um Acordo de desenvolvimento de Biocombustíveis para a Aviação com a empresa americana, Boeing Company, com o objetivo de desenvolver conjuntamente biocombustíveis para aviação,

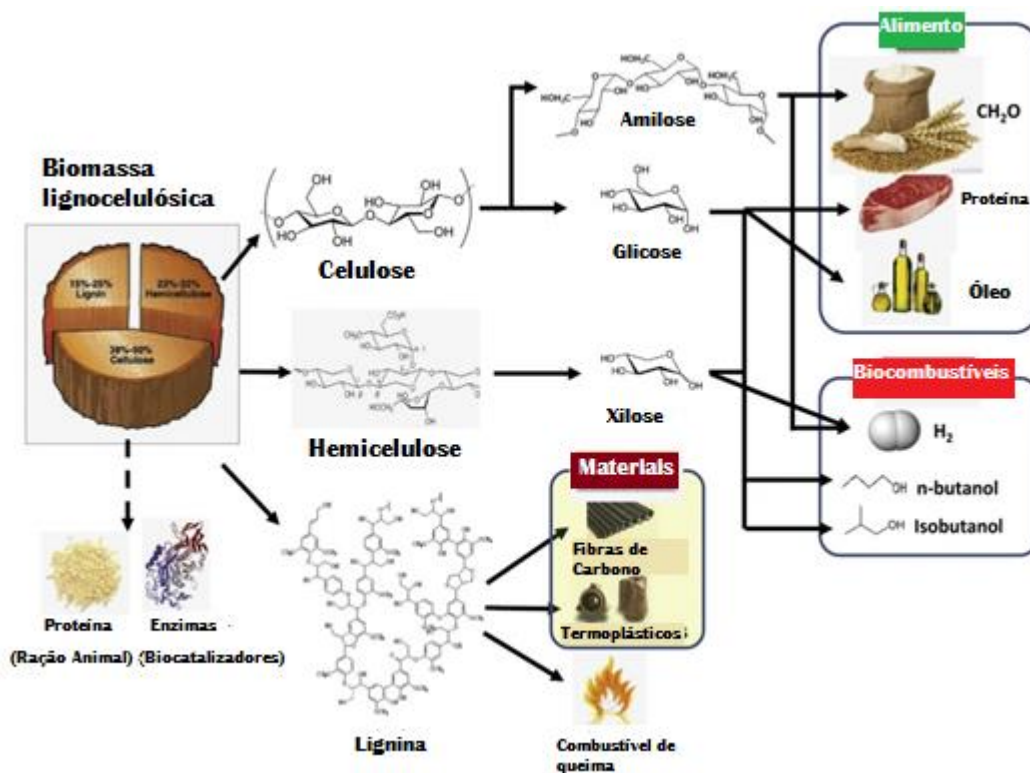
assim como possibilitar a criação da indústria sustentável de biocombustíveis para aviação. Algumas empresas brasileiras, incluindo a Embraer se juntaram para desenvolver biocombustíveis de aviação à base de cana com a EUA General Electric e a Amyris, e lançaram o primeiro avião que utiliza biocombustíveis à base de cana (SU et al., 2015).

Os EUA, regulamentaram em 2007 a Lei de Independência de Energia e Segurança, a qual propõe a redução do consumo de gasolina em 20% dentro de 10 anos, e aumenta a adição de etanol à gasolina de 4,7 bilhões de litros em 2007 para 136 bilhões de litros em 2022, sendo que 60 bilhões desses litros serão de biocombustíveis. Nos últimos anos foram investidos 42% dos grãos de milho colhidos (114 milhões de toneladas/ano) na produção de bioetanol na tentativa de substituir 10% da demanda de gasolina. Os países europeus utilizam principalmente trigo e beterraba branca para produzir etanol. Já na China, as principais matérias-primas são milho, trigo e mandioca, enquanto no Canadá são milho e trigo (GUO et al., 2015). O governo europeu está guiando o desenvolvimento de energia limpa estabelecendo metas de energia renovável, apoiando a indústria, impostos subsídios, e com o financiamento de grandes projetos (SU et al., 2015).

2.2 Materiais Lignocelulósicos

Com uma política de agronomia sustentável é possível gerar vários insumos que conduzam uma segurança econômica, aumento da produção de alimentos e biocombustíveis, visando biorrefinarias mais eficientes. Tendo em vista que a estrutura da biomassa possui uma composição heterogênea (Figura 2.2), ou seja, a biomassa contém uma ampla variedade de componentes em sua composição, pois suas fontes são grãos, madeira, grama e resíduos biológicos. Todavia, essa diversidade pode ser vista tanto uma vantagem como uma desvantagem para a produção de biocombustíveis, visto que as biorrefinarias podem produzir um conjunto maior de classes de produtos, entretanto, necessitam de realizar um número maior de processos tecnológicos para obter tais produtos (CHEN e ZHANG, 2015; RODRIGUES, 2011).

Figura 2.2: Esquema de Biorrefinarias de Multiproduto Através de Fracionamento de Lignocelulose Seguido por Conversões (CHEN e ZHANG, 2015).



Os três componentes primários que constituem todos os tipos de biomassa lignocelulósica são: celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polissacarídeo de 6 carbonos formado por uma longa cadeia de moléculas de glicose. A hemicelulose é um componente relativamente amorfo e mais facilmente quebrada quimicamente por calor do que a celulose, é constituída por uma mistura de polissacarídeos C₆ (galactose e manose) e polissacarídeos C₅ (xilose e arabinose). A lignina é um componente estrutural dos vegetais, que age como um cimento dando rigidez às estruturas, formada por uma rede polimérica tridimensional de unidades metoxilas, arilpropanos e hidroxifenóis. O que dá a rigidez a esta rede polimérica são as ligações cruzadas. A lignina é o maior constituinte não carboidrato, correspondendo entre 15% e 25% do vegetal (RODRIGUES, 2011).

Dentre os principais componentes da biomassa, a celulose é um dos polissacarídeos mais comuns no mundo e resíduos ricos em material lignocelulósico são gerados em abundância pela agricultura e a industrial

(FONSECA, 2014; SILVA et al., 2015). A celulose um homopolissacarídeo de cadeia simples composto basicamente por anéis de β -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo β -D (1,4) glicosídicas de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$. A unidade repetitiva da celulose é a celobiose. Apesar da estrutura química simples ela pode assumir uma diversa gama de conformações físicas dependendo da origem e dos posteriores processos tecnológicos. As principais características da celulose são tamanho, forma, porosidade, grau de polimerização, área superficial, associação com compostos não lignocelulósicos, conformação celular e cristalinidade sendo todos eles relevantes para o processo de hidrólise (RABELO, 2010).

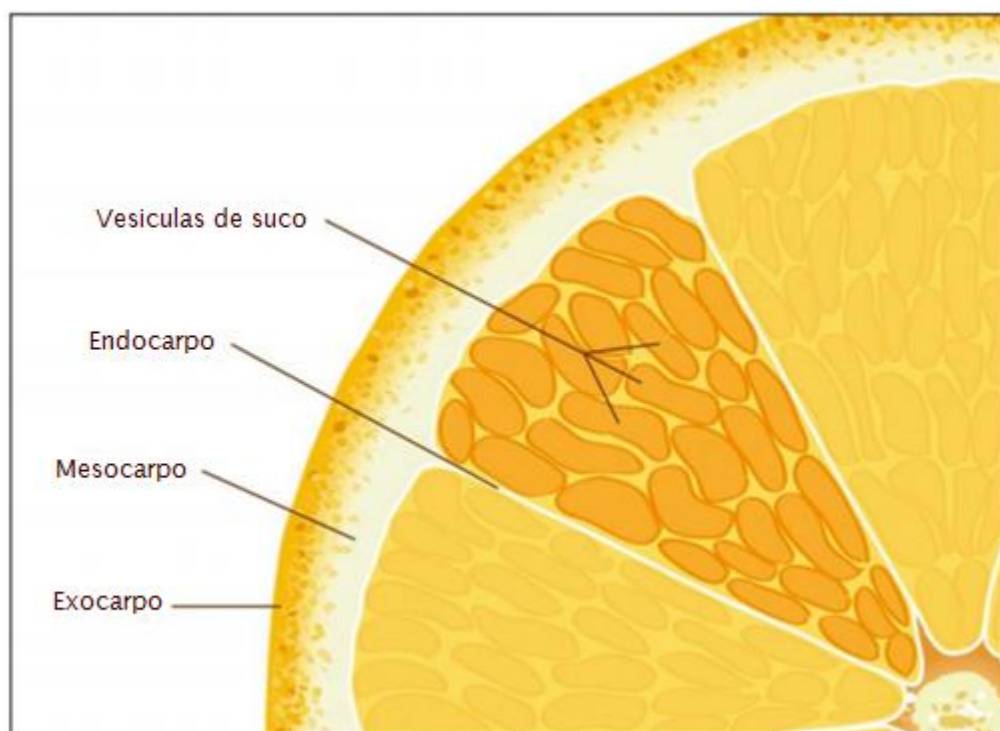
A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza e está intimamente associado à celulose e à lignina. Sua composição é mais heterogênea que a da celulose, sendo composta por diferentes classes de açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxi-hexoses). As xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e a xilose é o açúcar mais comum na sua composição. As hemiceluloses, de fórmula geral $(C_5H_8O_4)_n$, se associam à celulose por ligações de hidrogênio e Forças de *Van Der Waals* e à lignina por ligações covalentes. As hemiceluloses se diferem da celulose principalmente por sua constituição heterogênea, no que se refere às unidades de açúcares, formando cadeias mais curtas e ramificadas (RABELO, 2010; da SILVA, 2013; SILVA, 2014).

A lignina é uma macromolécula polifenólica e sua estrutura ainda não é totalmente conhecida. Porém, sabe-se que ela tem um efeito negativo na hidrólise e na fermentação, sendo necessária sua remoção prévia. A lignina é incorporada à parede celular durante o crescimento do vegetal e sua estrutura, composta basicamente de unidades de fenilpropano é tridimensional e amorfa. Ela está presente na lamela média e na parede secundária das células, conferindo rigidez. A lignina é responsável pela resistência a impacto, dobra e compressão e também está ligada ao transporte de água, nutrientes e metabólitos (RABELO, 2010, SILVA, 2014).

2.2.1 Bagaço de Laranja

A laranja é vastamente consumida em todo o mundo, tanto pelo seu sabor quanto por suas propriedades nutricionais e medicinais. A indústria provê laranjas tanto *in natura* quanto forma de suco, enquanto o bagaço é produzido em altos volumes e descartado na forma de resíduo. Essa grande geração de resíduos é um dos maiores freios do desenvolvimento da indústria de cítricos (KUMAR et al., 2011). A representação da anatomia da laranja está apresentada na Figura 2.3.

Figura 2.3: Anatomia da Laranja (AWAN, 2010).



O Brasil é o maior produtor mundial de laranjas, detendo cerca de 35% da produção mundial de laranjas, com uma produção de cerca de 16,3 milhões de toneladas na safra de 2013, além de ser o maior produtor de suco de laranja concentrado congelado. O resultado desta vasta produção é a alta geração de resíduos (bagaço), que equivalem a cerca de 50% do fruto. O bagaço de laranja contém cerca de 16% de hemicelulose, 28% de celulose e 9% de lignina, o que leva ao desenvolvimento de projetos a partir dos resíduos do processamento da laranja e obtenção de produtos valiosos, como

hesperidina, óleo essencial, e o bioetanol. Nesse sentido, o uso de bagaço de laranja se mostra uma alternativa viável à geração de etanol de segunda geração (AWAN, 2013; SILVA et al., 2015).

2.3 Hidrólise Enzimática

As primeiras etapas para a conversão de biomassa para etanol são a redução do tamanho de partícula e o pré-tratamento. O principal objetivo do pré-tratamento é abrir a matriz lignocelulósica e tornar o substrato mais acessível para as etapas subsequentes de hidrólise e fermentação (CANIZO et al., 2014). Os pré-tratamentos podem ser químicos, físicos, biológicos ou uma combinação entre eles, dependendo do grau de separação necessário e do fim dado ao material. Um pré-tratamento ideal é aquele em que as fibras reagem mais, há preservação da hemicelulose e não há liberação significativa de inibidores (SILVA, 2014). Como primeiro passo do processo de conversão bioquímica da biomassa para produzir etanol celulósico o pré-tratamento desempenha um papel crítico, pois prepara a biomassa para a obtenção de açúcares fermentáveis (YU et al., 2014).

As enzimas utilizadas para hidrólise de materiais lignocelulósicos são produzidas por microrganismos, principalmente fungos filamentosos e bactérias. A espécie de fungos *Trichoderma reesei* está entre as mais estudadas. Apesar da queda no custo das enzimas nos últimos 20 anos, elas ainda representam cerca de 50% do custo do etanol de segunda geração, que tem um custo muito superior ao do etanol de primeira geração (RABELO, 2010; DUSSÁN et al., 2014).

Segundo Awan (2013) a hidrólise enzimática é considerada a mais apropriada para a posterior produção de etanol 2G a partir de biomassa. Neste processo, as longas cadeias de celulose e hemicelulose, são quebradas pelas enzimas e monômeros, hexoses e pentoses, são liberados. O bagaço de laranja pode ser hidrolisado a monossacarídeos aplicando-se uma combinação de enzimas. Tanto fungos quanto bactérias são capazes de produzir enzimas para a hidrólise de material lignocelulósico. Comparando com os fungos, as bactérias celulolíticas produzem volumes inferiores de

enzimas celulolíticas ativas. De todos os gêneros de fungos, o *Trichoderma* tem sido o mais extensivamente estudado para a produção de celulase. Ele produz uma mistura complexa de enzimas celulasas com alta especificidade para as ligações glicosídicas β -1,4. As celulasas são normalmente uma mistura de várias celobiohidrolases e endoglucanases suplementadas com betaglicosidades.

A maioria dos estudos de obtenção de etanol da fração celulósica envolve o uso de enzimas. Apesar disso o volume de hidrolisado obtido é ainda insuficiente para os processos de fermentação subsequentes. Entretanto, os polissacarídeos presentes na biomassa lignocelulósica são diretamente acessíveis pelas enzimas, principalmente pela presença de lignina. Para aumentar a taxa de hidrólise é necessário pré-tratar a biomassa, normalmente com um ácido ou uma base, para quebrar as ligações entre a lignina e a hemicelulose e expor a celulose à enzima (RABELO, 2010; DUSSÁN et al., 2014; ACKER et al, 2014).

A aplicação de enzimas em biomassas lignocelulósicas demonstra vantagens distintas quando comparada aos métodos de hidrólise à base de ácido, pois o processo ocorre em condições mais suaves, produz potencialmente rendimentos mais elevados e não tem problemas de corrosão, por exemplo. Por conseguinte, a hidrólise enzimática é considerada mais adequado para a produção etanol a partir de biomassa (AWAN, 2013).

2.4 Hidrólise Ácida Diluída

Outra maneira para produzir etanol a partir do material lignocelulósico é a hidrólise ácida. A hidrólise ácida é um processo conhecido há mais de 200 anos. A hidrólise ácida pode ser realizada com ácido concentrado ou diluído. O processo consisti na exposição do material ao ácido em condições específicas de temperatura, tempo, concentração de ácido e pressão. Quando se usa o ácido diluído são necessárias temperaturas altas que podem gerar muitos compostos indesejados. Com o ácido concentrado pode-se haver dificuldades no processo, como corrosão dos tubos e reatores e custos em neutralizar o hidrolisado. Entretanto, a hidrólise ácida é mais rápida e simples,

comprada à hidrólise enzimática. Pode-se usar diversos ácidos diferentes, porém o mais visto na literatura é o ácido sulfúrico (LENIHAN et al., 2010, AWAN, 2013; DUSSÁN et al., 2014).

O mecanismo da hidrólise ácida (Figura 2.4) da cadeia de celulose inicia-se com a protonação do oxigênio glicosídico com a quebra posterior da ligação C1-O, o deslocamento do par de elétrons existentes no oxigênio do anel glicosídico ocorre adjacente ao C1. No passo seguinte, o ataque nucleofílico de água no C1 resulta na regeneração ácida, que finaliza a etapa de despolimerização, quando a hidrólise ocorre no interior da cadeia de celulose gerando novas ligações, ou produzindo a glicose, quando a hidrólise ocorre diretamente nas ligações (AWAN, 2013).

Figura 2.4: Esquema Bioquímico da Hidrólise Ácida na Cadeia de Celulose (AWAN, 2013).



Dependendo das condições, a hidrólise ácida remove a lignina e consegue hidrolisar parte da hemicelulose criando poros que dão acesso à celulose cristalina, dispensando a etapa de pré-tratamento. A celulose, entretanto, é mais resistente ao processo, necessitando de temperaturas mais altas e tempos de contato mais longos, que podem levar a geração de fatores inibitórios para a fermentação. Outro problema advindo destas condições são as reações paralelas, de degradação dos açúcares a outros compostos, que reduzem a eficiência da hidrólise. Antes de proceder a fermentação é necessário neutralizar o meio, produzindo sais, que podem não ser separados do meio, dependendo do sal formado ele pode agir como suplemento ou

inibidor das leveduras (LENIHAN et al., 2010; CANIZO et al., 2014; DUSSÁN et al., 2014).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

- Acetato de Sódio cristal PA ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$)-Dinâmica;
- Acetona PA (CH_3COCH_3)-Dinâmica;
- Ácido 3,5-Dinitrosalicílico PA ($\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$)-Vetec;
- Ácido Acético PA ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)-Neon;
- Ácido Cítrico PA ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)-Vetec;
- Ácido Clorídrico PA (HCl)-Quemis;
- Ácido Sulfúrico PA (H_2SO_4)-FMaia;
- Álcool Etílico PA 95% ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)-Neon;
- Ciclohexano PA (C_6H_{12})-Neon;
- Clorito de Sódio PA (NaClO_2)-Neon;
- D-(+)-Glicose Anidra PA ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)-Cromoline;
- D-(+)-Xilose Anidra PA ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5$)-Merck;
- Enzima Celulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921-Sigma-Aldrich;
- Enzima Xilanase de *Trichoderma reesei*-Granotec;
- Fosfato de Sódio Dibásico PA ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)-Vetec;
- Hidróxido de Cálcio PA [$\text{Ca}(\text{OH})_2$]-Vetec;
- Hidróxido de Potássio PA (KOH)-Merck;
- Hidróxido de Sódio Micropérolas PA (NaOH)-Isofar;
- Papel de filtro Whatman nº 1;

- Tartarato de Sódio e Potássio PA ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$)-Isofar;
- Xilana de madeira de faia pureza $\geq 90\%$ -Sigma-Aldrich;

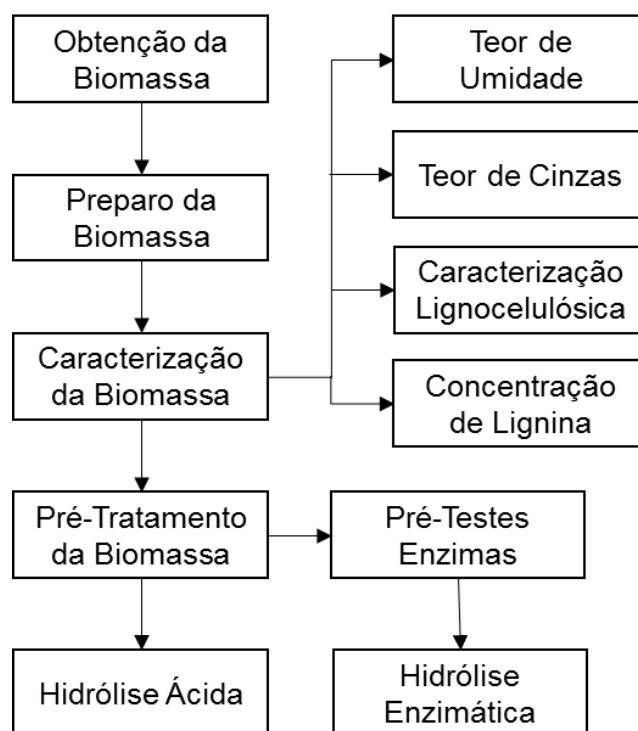
3.1.2 Equipamentos

- Agitador de peneiras para análises granulométricas eletromagnético marca Bertel;
- Autoclave modelo AB12 marca Phoenix;
- Balança analítica modelo ATY224 marca Shimadzu com precisão de 0,0001 g;
- Balança semi-analítica modelo BL320H marca Shimadzu com precisão de 0,001 g;
- Banho Ultratermostatizado modelo MA-184 da marca Marconi;
- Bomba de vácuo modelo ECO-740/LAB/Q marca Biomec;
- Espectrofotômetro UV-visível, com precisão na terceira casa, modelo SP1105 marca Belphotonix;
- Espectrofotômetro UV-VIS NI 1800UV, comprimento de onda de 190 a 1100 nm, marca Novainstruments;
- Estufa com circulação de ar marca MLW;
- Estufa de secagem modelo 400-5ND marca Nova Ética;
- Incubadora de bancada modelo TE-4200 marca Tecnal;
- Incubadora refrigerada com agitação modelo TE-421 marca Tecnal;
- Manta de aquecimento modelo 52 marca Fisatom;
- Medidor de pH modelo TEC-51 marca Tecnal;
- Moinho de facas marca Citec;
- Mufla marca Fornitec;
- Peneiras para análise granulométrica de inox 340, aberturas 20 e 48 mesh marca Bertel;

3.2 Métodos

A Figura 3.1 apresenta o fluxograma das etapas seguidas neste capítulo, desde a obtenção da biomassa até a realização das hidrólises.

Figura 3.1: Fluxograma dos Métodos Seguidos no Capítulo Três.



3.2.1 Obtenção e Preparo da Biomassa e Caracterização quanto a Umidade, Cinzas, Holocelulose, Hemicelulose, Celulose e Lignina

3.2.1.1 Obtenção e Preparo da Biomassa

O bagaço de laranja foi gentilmente cedido pela indústria Gyn Fruit sucos, localizada em Goiânia-GO. A secagem do bagaço de laranja foi realizada em estufa com circulação de ar a 50°C, até peso constante. Após esse tempo o material foi moído em moinho de facas e a umidade foi aferida em estufa como descrito no item 3.2.1.2. Depois de moído foi determinada a distribuição granulométrica do bagaço seco moído de acordo com o procedimento padrão do NRLE "Preparation of Samples for Compositional

Analysis” descrito por Hames et al. (2008) utilizando duas peneiras, de 20 e 48 mesh, além do fundo, presas em um agitador de peneiras eletromagnético por 15 minutos.

3.2.1.2 Determinação da Umidade

Para a determinação da umidade da biomassa úmida e após a secagem e moagem foram pesados 5 g de amostra em cápsulas de porcelana previamente secas a 105 °C e taradas. As capsulas com amostra seca foram resfriadas à temperatura ambiente e pesadas. O procedimento, realizado em triplicata, foi repetido até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976) e o valor calculado pela Equação 3.1:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade por cento a } 105 \text{ } ^\circ\text{C p/p} \quad (3.1)$$

N = Perda de peso em g

P = massa em gramas da amostra

3.2.1.3 Determinação de Cinzas

Para a determinação do conteúdo de cinzas foram pesados 5 g da biomassa em um cadinho de porcelana previamente aquecido em mufla a 550°C, resfriado à temperatura ambiente em dessecador e pesado. A amostra foi então seca em estufa, carbonizada a temperatura baixa e incinerada a 550°C. As amostras foram resfriadas em dessecador, até temperatura ambiente. O procedimento de incineração, realizado em triplicata, foi repetido até peso constante (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976) e o valor calculado pela Equação 3.2.

$$\frac{100 \times C}{A} = \text{cinzas por cento p/p} \quad (3.2)$$

C = massa de cinzas em gramas

A = massa de amostra em gramas

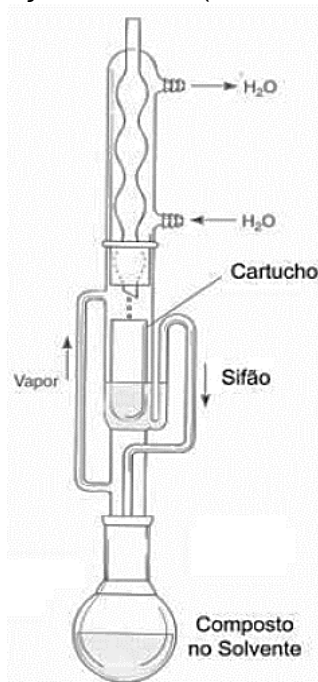
3.2.1.4 Determinação do Conteúdo de Holocelulose, Celulose e Hemicelulose da Biomassa

A caracterização da matéria prima quanto a celulose e hemicelulose foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Browning (1967) e todas as etapas necessárias para a caracterização estão descritas nos itens abaixo.

3.2.1.4.1 Extrativos

Os extrativos podem interferir na quantificação dos componentes celulósicos, por isso devem ser removidos antes de realizar a caracterização. Para remover os extrativos foram colocadas cerca de 6 g de biomassa em um cartucho de celulose. O cartucho foi então coberto com algodão e colocado no extrator de sohxlet. Foram colocados 300 mL de ciclohexano em um balão de fundo redondo. O sistema de extração foi montado com uma manta de aquecimento, o balão, o extrator de sohxlet e um condensador de bolas como demonstrado na Figura 3.2. Devido à característica da biomassa foi necessário repetir este processo diversas vezes para obter massa suficiente para proceder a caracterização.

Figura 3.2: Sistema de Extração Soxhlet (QUALIVIDROS, 2016).



A temperatura da manta foi ajustada para que houvesse, pelo menos, 5 ciclos por hora por 25 h. Após as 25 h de extração com o ciclohexano o processo foi repetido, para a mesma biomassa com 300 mL de uma mistura de ciclohexano:etanol na proporção de 2:1, e posteriormente com água. Ao fim da extração a biomassa sem extrativos foi retirada do cartucho e levada à estufa a 40°C até a evaporação completa do solvente.

3.2.1.4.2 Holocelulose, Hemicelulose e Celulose

Foram pesados 5 g de biomassa livre de extrativos em um balão, adicionou-se 100 mL de água. Essa suspensão foi colocada em um banho termostático a 75°C. Em seguida, adicionou-se 3 g de clorito de sódio e 2 mL de ácido acético, fechou-se o balão para evitar a perda do gás cloro e a reação ocorreu por 1 h. Repetiu-se o processo até observar a exposição da holocelulose (resíduo esbranquiçado). Resfriou-se o líquido reacional a 10°C e filtrou-se em funil de placa porosa, previamente tarado, com água a 5°C até remover todo o reagente amarelo da reação do clorito de sódio com o ácido acético. O funil contendo o resíduo foi seco em estufa a 105°C até peso constante. Assim foi possível quantificar a holocelulose.

Pesou-se 3 g da holocelulose extraída, colocou-se em um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 5% (m/v). Para realizar a hidrólise básica da holocelulose o frasco Erlenmeyer foi vedado e mantido sob agitação orbital de 150 rpm por 2 h. Após a hidrólise o material foi filtrado em funil de placa porosa e lavado com 50 mL de KOH 5% e em seguida com 100 mL de água deionizada. O filtrado foi recolhido em um frasco Erlenmeyer de um litro e o volume foi completado com solução de etanol e ácido acético (1:1), para precipitar a hemicelulose A, ou seja, a fração de hemicelulose solúvel em KOH 5%. O resíduo fibroso foi então transferido quantitativamente para o frasco Erlenmeyer de 250 mL e o procedimento anterior foi repetido. Após a filtração este foi lavado com 25 mL de KOH 24%, 50 mL de água, 25 mL de ácido acético 10% (v/v) e 100 mL de água deionizada. O filtrado foi coletado em um frasco Erlenmeyer de 1 L e o volume foi completado com solução de etanol e ácido acético (1:1), para

precipitar a hemicelulose B, ou seja, a porção de hemicelulose solúvel em KOH 24%. O resíduo fibroso foi lavado com água, até a neutralidade do filtrado. Este foi então lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 °C até peso constante, e pesado. Este resíduo é a celulose. Após a precipitação, as porções de hemiceluloses A e B foram filtradas em funis de placa porosa, secas a 105 °C até peso constante e quantificadas. A soma das hemiceluloses A e B é a quantidade total de hemicelulose do material (BROWNING, 1967).

3.2.1.5 Caracterização do Conteúdo de Lignina

Para caracterizar a biomassa quanto ao conteúdo de lignina é necessário realizar a hidrólise ácida do material livre de extrativos (RABELO, 2010). Primeiro os extrativos do material, com umidade abaixo de 10% e diâmetro de partícula inferior a 20 mesh, foram removidos de acordo com o item 3.2.1.4.1. Pesaram-se 0,3 g de material livre de extrativos, descontada a umidade, em um tubo de ensaio aos quais foram adicionados 3,0 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (m/m). Os tubos foram incubados, em banho termostático, a 30°C por 1 h. O conteúdo foi agitado com bastão de vidro, pressionando contra o fundo do tubo a cada 5 a 10 minutos, sem remover do banho. Este processo é denominado hidrólise ácida concentrada.

Para a hidrólise ácida diluída, o conteúdo dos tubos foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyer de 125 mL com auxílio de 84 mL de água, baixando a concentração de H₂SO₄ para 4%. Os frascos Erlenmeyer foram vedados com folha de alumínio e elásticos, e autoclavados por 1 h a 121°C e pressão de 1,1 bar. Após a descompressão da autoclave os frascos foram retirados e resfriados a temperatura ambiente antes de serem abertos. O material foi filtrado à vácuo, em papel de filtro. O resíduo sólido foi lavado com água até a neutralidade do filtrado. O papel de filtro contendo o resíduo, previamente seco a 105°C e tarado, foi seco a 105 °C até peso constante. Após a secagem este foi resfriado em dessecador e pesado, o conteúdo de lignina insolúvel foi calculado de acordo com a Equação 3.3.

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \left(\frac{R - P}{M} \times 100 \right) - \% \text{ cinzas} \quad (3.3)$$

R=massa do resíduo + papel de filtro

P=massa do papel de filtro

M=massa de biomassa sem extrativos inicial em base seca

Para a quantificação da lignina solúvel uma alíquota de 1 mL do hidrolisado foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL completando o volume com água e homogeneizando esta solução. Para zerar o espectro, o branco foi feito com H₂SO₄ 4%, autoclavado da mesma maneira que o hidrolisado, diluindo 1 ml para 100 mL. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 280 nm em cubeta de quartzo. A leitura deve ser realizada até 6 h após a hidrólise. Para calcular a concentração de lignina solúvel foram utilizadas as Equações 3.4 e 3.5:

$$C_{\text{lignina solúvel}} = (41,87 \cdot A_t - 0,3279) \cdot 10^{-3} \quad (3.4)$$

$$\% \text{lignina solúvel} = \left(\frac{C_{\text{lignina solúvel}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot FD}{M_1} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

A_t=absorbância da solução de lignina a 280 nm

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

FD=fator de diluição para a leitura da absorbância, 100

M₁=massa de bagaço utilizado na hidrólise, em base seca, g

3.2.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio

O pré-tratamento foi realizado de acordo com o previamente estudado por Silva et al. (2013). Entretanto, ao realizar o pré-tratamento na primeira batelada verificou-se que, ao lavar a biomassa pré-tratada, o hidróxido de cálcio não passava pelos poros do papel de filtro e não era possível separá-lo dos finos da biomassa. Portanto, escolheu-se separar os finos, biomassa com diâmetro inferior a 0,295 mm, antes de realizar o pré-tratamento. Ele foi então realizado com hidróxido de cálcio e a proporção foi de 1:4:20 (p/p/v), em relação a hidróxido de cálcio, substrato e água deionizada,

respectivamente. A temperatura foi de 60°C por 20 h e agitação de 150 rpm. Após o pré-tratamento a biomassa foi lavada com 500 mL de água deionizada, para neutralizar o bagaço. Para facilitar o armazenamento o bagaço de laranja pré-tratado foi seco a 40°C até peso constante. Para quantificar a perda de massa com o pré-tratamento utilizou-se a Equação 3.6.

$$PM = \frac{BS - BP}{BS} \times 100 \quad (3.6)$$

PM = perda de massa %

BS = massa de bagaço seco g

BP = massa de bagaço pré-tratado g

3.2.3 Pré-teste Hidrólise Enzimática

Como a concentração de hemicelulose encontrada na caracterização do material de acordo com o item 3.2.1.4.2 foi baixa, realizou-se um pré-teste com o objetivo de estudar a possibilidade de combinar as enzimas celulase e xilanase no estudo da hidrólise. Foram comparadas as concentrações de ART liberadas em experimentos contendo apenas celulase com experimentos contendo as duas enzimas (Tabela 3.1). A concentração de celulase escolhida foi de 3 FPU/mL por grama de sólido, este sólido considerado é o substrato da enzima, ou seja, celulose. Testou-se a combinação com xilanase na mesma concentração, 3 U/g por g de sólido, o sólido neste caso sendo a hemicelulose. A concentração de sólidos para a hidrólise foi de 1%, para garantir a homogeneização durante o processo. A hidrólise foi realizada a 45°C, pH 4,8, determinados no apêndice D, e agitação de 150 rpm por 48 h. O pré-teste foi realizado em triplicata.

Tabela 3.1: Fatores do Pré-teste da Combinação de Enzimas.

Concentração de Sólidos (%)	Celulase (FPU/mL g de sólido)	Xilanase (U/g por g de sólido)
1,0	3,0	3,0
1,0	3,0	0,0

3.2.4 Planejamento Composto Central

Para a avaliação das hidrólises ácida e enzimática foi aplicado um planejamento fatorial do tipo composto central a dois níveis, com três variáveis, acrescido de três réplicas no ponto central, 2³ ensaios para a investigação de um modelo linear e ainda seis experimentos nos pontos axiais (α), totalizando 17 experimentos (BOX e HUNTER, 1957).

3.2.4.1 Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida foi realizada com ácido clorídrico (HCl) diluído. Foram pré-tratados 2 g de bagaço de laranja, em base seca, para esta hidrólise. Os fatores estudados foram concentração de HCl, temperatura e tempo de hidrólise. Os níveis codificados e não codificados, escolhidos com base nos trabalhos de Fonseca (2014) e Dussán et al. (2014), estão apresentados na Tabela 3.2. O bagaço de laranja pré-tratado foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL e foram adicionados 50 mL de solução de HCl, com a diluição referente a cada experimento. O valor de α rotacional, determinado pelo software Statistica 7.0, foi 1,68179.

Tabela 3.2: Fatores do Planejamento Experimental 2³ Completo com Composto Central da Hidrólise Ácida do Bagaço de Laranja.

Fatores	Valor dos Níveis (-1; 1)	Ponto central (0)	$\pm\alpha$
Concentração de HCl (%)	2,00	3,50	0,98
	5,00		6,02
Tempo (minutos)	35,00	45,00	28,18
	55,00		61,82
Temperatura (°C)	30,00	40,00	23,18
	50,00		56,81

3.2.4.2 Hidrólise Enzimática

Para maximizar a obtenção de ART optou-se por trabalhar com dois tipos de enzimas, celulase da Sigma-Aldrich e xilanase da Granotec, ambas de *Trichoderma reesei*. Escolheu-se trabalhar com esta combinação de

enzimas porque há indicações do seu efeito sinérgico na geração de glicose (XIN et al., 2015). Os fatores avaliados nesta hidrólise foram concentração de cada uma das enzimas, e tempo de hidrólise. A concentração de sólidos foi de 1% (celulose e hemicelulose em base seca) (Apêndice C). Foi utilizado tampão acetato de sódio pH 4,8 e a hidrólise foi executada em incubadora sob agitação de 150 rpm e temperatura de 45°C. O pH e a temperatura ótimos foram determinados de acordo com o Apêndice D (Tabela 3.3). O valor codificado de α rotacional, determinado pelo software Statistica 7.0, foi 1,68179.

Tabela 3.3: Fatores do Planejamento Experimental 2³ Completo com Composto Central da Hidrólise Enzimática do Bagaço de Laranja.

Fatores	Valor dos Níveis (-1; 1)	Ponto central (0)	$\pm\alpha$
Concentração de Celulase (FPU/mL)	3,00	4,50	1,98
	6,00		7,02
Concentração de Xilanase (U/g)	1,00	2,50	0,00
	4,00		5,00
Tempo (h)	24,00	32,00	18,54
	40,00		45,45

3.2.5 Determinação de Açúcares Redutores Totais

Depois de realizada a etapa de hidrólise, foi medida uma alíquota de 1 mL do filtrado, colocou-se em um tubo de ensaio e adicionou-se 2 mL do reagente de ácido dinitrosalicílico (DNS) (Apêndice B). Foi feito um “branco” contendo 1 mL de água deionizada (água) e 2 mL do reagente de DNS. A mistura foi então levada ao banho termostático a 95°C \pm 1°C por 5 min, em seguida os tubos foram levados a um banho de gelo, para parar a reação. O volume foi completado para 25 mL e a absorbância foi lida e espectrofotômetro com comprimento de onda 540 nm em cubetas de vidro (MILLER, 1959).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Obtenção e Caracterização da Biomassa

4.1.1 Preparo da Biomassa

O bagaço de laranja foi coletado na indústria de sucos Gyn Fruit e imediatamente seco para evitar reações de degradação. Antes da secagem, o bagaço de laranja foi cortado em tiras, para facilitar a secagem aumentando a área superficial, e colocado em bandejas. As bandejas contendo o bagaço de laranja foram dispostas na estufa e suas posições foram trocadas por 3 vezes durante a secagem, para que esta fosse homogênea. As Figuras 4.1 a 4.3 ilustram o bagaço de laranja cortado antes da secagem, o bagaço disposto nas bandejas dentro da estufa e o bagaço de laranja seco antes de ser moído.

Figura 4.1: Bagaço de Laranja Cortado Antes da Secagem.



Figura 4.2: Bagaço de Laranja Disposto em Bandejas Dentro da Estufa Antes da Secagem.



Figura 4.3: Bagaço de Laranja Seco Antes da Moagem.



Depois de 36h de secagem, tempo necessário para a estabilização do peso, o bagaço foi moído e classificado quanto à granulometria. As peneiras usadas foram as de numeração 20 mesh, abertura 0,833 mm e 48 mesh, abertura 0,295 mm (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Resultados da Caracterização Granulométrica do Bagaço de Laranja Seco Moído.

Peneira	Abertura (mm)	Diâmetro Médio (mm)	Fração Mássica Retida (%)
20	0,833	-	47,75
48	0,295	0,564	32,84
Fundo	-	-	19,41

Observando a Tabela 4.1 acima, verifica-se que cerca de 47,7% do bagaço de laranja seco moído ficou retido na peneira de 20 mesh, ou seja, diâmetro superior a 0,833 mm. Na peneira de 48 mesh ficaram retidos cerca de 32,8% da biomassa, diâmetro médio 0,564 mm. Pela peneira de 48 mesh passaram 19,41%, denominados finos, com diâmetro inferior a 0,295 mm.

4.1.2 Conteúdo de Umidade, Cinzas, Holocelulose, Celulose, Hemicelulose, Extrativos e Lignina

Ao avaliar a umidade da biomassa antes do processo de secagem encontrou-se um valor de 84,69%, Awan (2013) encontrou, em bagaço de laranja oriundo de restaurante, cerca de 81% de umidade, e em resíduo de indústria de suco, que passa por um processo de prensagem posterior à extração de suco, aproximadamente 77%. Estes valores são próximos aos encontrados neste trabalho, apesar da diferença nos métodos de extração de suco. Todas as análises de caracterização subsequentes foram realizadas somente no bagaço de laranja seco, por ser a biomassa utilizada nas hidrólises.

Após a secagem em estufa com circulação de ar a 50°C e moagem em moinho de facas a umidade apresentou um valor de cerca de 7,5%, uma perda de massa de água de 77%. Retore et al. (2010) encontrou no resíduo da

indústria de suco de laranja seco e peletizado pela própria indústria, umidade de cerca de 13,5%. Silva et al. (2015) estudando o resíduo de uma indústria de suco de laranja seco em estufa com circulação de ar a 55°C e moído em moinho de facas encontrou umidade de cerca de 10% após a secagem. Clemente et al. (2012) ao estudar a farinha preparada com o bagaço de laranja proveniente da extração do suco a nível de bancada encontrou umidade de cerca de 1%. A maior parte dos trabalhos encontrados teve umidades próximas a este trabalho, apesar dos diferentes métodos de extração de suco e de secagem do bagaço. A tabela 4.2 apresenta os resultados das análises de caracterização do bagaço de laranja seco deste trabalho em comparativo com outros autores.

Tabela 4.2: Médias das Análises de Caracterização do Bagaço de Laranja Seco Moído.

Umidade (%)	Cinzas (%)	Lignina (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Referência
-	3,5	0,84	9,21	10,05	Rivas et al. (2008)
13,36	8,57	4,92	21,08	7,64	Retore et al. (2010)
0,96±0,06	-	-	-	-	Clemente et al. (2012)
80,93±0,53*	1,95±0,35*	4,40±0,19*	4,98±0,47*	3,62±1,03*	Awan (2013)
10,05±0,10	3,46±0,07	-	-	-	Silva et al. (2015)
7,38±0,03	3,79±0,04	9,90±0,24	22,90±0,41	3,39±0,38	Este trabalho

* Valores referentes ao bagaço de laranja úmido.

A análise de cinzas, apresentou um valor pouco menor que 4%. Rivas et al. (2008) encontrou em bagaço de laranja oriundo de uma indústria de processamento de frutas cítricas um valor de cerca de 3,5%, aproximadamente o mesmo valor encontrado por Silva et al. (2015) em bagaço de laranja da produção de suco. O trabalho de Retore et al. (2010) apresentou o maior valor encontrado de cinzas na literatura pesquisada, cerca de 8,5% em bagaço de laranja. Awan (2013) encontrou para o bagaço úmido porcentagem de cinzas próximo a 2%. Dentro da literatura pesquisada dois trabalhos apresentaram resultados próximos ao encontrado neste trabalho (RIVAS et al, 2008; SILVA et al, 2015), uma das literaturas apresentou os

resultados apenas para o bagaço de laranja úmido, dificultando a comparação (AWAN, 2013), e Retore et al. (2010) encontraram valor superior, porém há uma grande variabilidade constitucional em materiais vegetais de diferentes regiões e safras (AWAN, 2013).

Após a remoção dos extrativos a biomassa foi realizada a quantificação quanto a holocelulose, celulose e hemicelulose. A concentração de holocelulose da biomassa sem extrativos foi de 69,48%, dos quais 71,48% eram celulose e 10,63% eram hemicelulose. Portanto, a concentração na biomassa sem extrativos foi de cerca de 49,7% de celulose e 7,4% de hemicelulose. Considerando a biomassa integral encontrou-se 22,9% de celulose e 3,39% de hemicelulose. Com relação à celulose, Retore et al. (2010) encontraram valor similar em bagaço de laranja, 21,08%, já Rivas et al. (2008) encontraram valor inferior, também em bagaço de laranja, 9,21%. Ao comparar os resultados de hemicelulose os outros trabalhos encontrados apresentaram valores superiores, 7,64% e 10,05% (Retore et al., 2010; Rivas et al., 2008). Deve-se ressaltar que estas diferenças podem ser explicadas pelo fato do material vegetal apresentar variação na composição dependendo do método usado para a extração do suco e o ambiente de cultivo.

A concentração de lignina foi determinada de acordo com o item 3.2.1.5 e as concentrações de lignina solúvel e insolúvel foram calculadas com as Equações 3.3 a 3.5. As concentrações de lignina solúvel e insolúvel, na biomassa livre de extrativos, foram, respectivamente, 17,87% e 3,71%. A lignina total do bagaço de laranja seco livre de extrativos, calculada somando a lignina solúvel e a insolúvel, foi cerca de 21,5%, porém para ter a concentração real deve-se considerar a biomassa total, chegando a uma concentração de lignina de 9,9%. O valor encontrado no presente trabalho supera o encontrado em todos os trabalhos pesquisados para bagaço de laranja, Retore et al. (2010) encontraram cerca de 4,9%, Rivas et al. (2008) encontraram 0,84%, ambos no bagaço seco, e Awan (2013) encontrou 4,4% para o bagaço úmido.

Para os extrativos, foi encontrado um valor de 54,1%, após todos os solventes, Rivas et al. (2008) encontraram, em bagaço de laranja um valor de

25% de extrativos em etanol e 45% em água, valor próximo ao encontrado neste trabalho. Os extrativos foram removidos para não interferir nas análises de caracterização lignocelulósica.

4.2 Pré-tratamento com Hidróxido de Cálcio

O pré-tratamento foi realizado de acordo com as condições apresentadas no item 3.2.2. Depois de pré-tratada e lavada, a biomassa foi seca e armazenada. A perda de massa foi quantificada após o pré-tratamento. O valor obtido médio foi de 30,03%, valor inferior ao experimento realizado por Silva et al. (2013), que nessas condições teve perda média de 58,43%. Para a hidrólise ácida foram pré-tratados 2 g de biomassa, em base seca, para cada experimento, conforme o planejamento composto central (Item 3.2.4.1). Para a hidrólise enzimática foram pré-tratados 2 g, porém, foi necessário repetir o experimento, e, para reduzir os erros, a massa foi aumentada para 5 g em base seca (Item 3.2.4.2).

4.3 Pré-teste Hidrólise Enzimática

A média dos resultados de ART encontrados no pré-teste de hidrólise enzimática, realizado em triplicata, descrito no item 3.2.3 estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Resultados de ART após Pré-teste de Hidrólise Enzimática com e sem Xilanase.

Concentração de Sólidos (%)	Celulase (FPU/mL g de sólido)	Xilanase (U/g por g de sólido)	ART (mg/mL)
1,0	3,0	3,0	0,629±0,024
1,0	3,0	0,0	0,534±0,032

A diferença entre as concentrações de ART com e sem a xilanase foi de aproximadamente 15%, o que pode indicar um efeito sinérgico da combinação das enzimas na hidrólise, como percebido por Xin et al. (2015). Todavia, como a concentração de açúcares não foi tão superior com a combinação das enzimas, escolheu-se estudar um ponto sem a xilanase no

planejamento composto central da hidrólise enzimática (Item 3.2.4.2), para avaliar melhor o impacto xilanase na liberação de ART do bagaço de laranja seco pré-tratado.

4.4 Planejamento Composto Central

4.4.1 Hidrólise Ácida

Após o pré-tratamento com hidróxido de cálcio, foi realizada a hidrólise ácida e quantificado a concentração de açúcares redutores totais (ART). Foram encontradas concentrações de ART variando de $9,32 \pm 0,68$ mgART/g de biomassa a $30,15 \pm 0,31$ mgART/g de biomassa. A Tabela 4.4 ilustra os resultados obtidos.

Tabela 4.4: Concentração de ART Liberados pela Hidrólise Ácida em mg de ART por g de Biomassa.

Experimento	Concentração de Ácido (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	ART (mg/g)
1	(-1) 2,00	(-1) 30,00	(-1) 35,00	$9,32 \pm 0,68$
2	(-1) 2,00	(-1) 30,00	(+1) 55,00	$13,02 \pm 0,93$
3	(-1) 2,00	(+1) 50,00	(-1) 35,00	$18,38 \pm 0,93$
4	(-1) 2,00	(+1) 50,00	(+1) 55,00	$18,86 \pm 1,61$
5	(+1) 5,00	(-1) 30,00	(-1) 35,00	$14,64 \pm 0,12$
6	(+1) 5,00	(-1) 30,00	(+1) 55,00	$16,58 \pm 0,87$
7	(+1) 5,00	(+1) 50,00	(-1) 35,00	$22,46 \pm 0,75$
8	(+1) 5,00	(+1) 50,00	(+1) 55,00	$26,51 \pm 0,99$
9	(-α) 0,98	(0) 40,00	(0) 45,00	$11,57 \pm 0,49$
10	(+α) 6,02	(0) 40,00	(0) 45,00	$20,00 \pm 1,62$
11	(0) 3,5	(-α) 23,18	(0) 45,00	$14,47 \pm 1,37$
12	(0) 3,5	(+α) 56,82	(0) 45,00	$30,15 \pm 0,31$
13	(0) 3,5	(0) 40,00	(-α) 28,18	$17,10 \pm 0,00$
14	(0) 3,5	(0) 40,00	(+α) 61,82	$18,77 \pm 0,25$
15	(0) 3,5	(0) 40,00	(0) 45,00	$16,53 \pm 0,31$
16	(0) 3,5	(0) 40,00	(0) 45,00	$18,86 \pm 0,68$
17	(0) 3,5	(0) 40,00	(0) 45,00	$17,70 \pm 1,06$

Observa-se uma boa reprodutibilidade entre os pontos centrais, evidenciando a qualidade da repetibilidade do processo. A maior resposta foi obtida no experimento 12, realizado na temperatura de maior nível utilizada no experimento (+ α). Ao se comparar este experimento com um dos pontos centrais verifica-se um aumento de quase 50% no valor da resposta. Acredita-se em primeira instância que a variável temperatura possui uma forte influência na liberação de ART após a hidrólise ácida. Ao observar as próximas duas maiores respostas (Experimentos 7 e 8), verifica-se que ao manter as variáveis concentração de HCl e temperatura em seus níveis superiores (+1) e mudar do nível +1 para o -1 de tempo, a resposta caiu aproximadamente 15%, ou seja, pode ser que a variável tempo, na faixa estudada, não exerça tanta influência no processo de liberação de ART quando se trabalha com níveis altos das outras variáveis. Esse fato pode ser observado ao se verificar os experimentos 1 e 2, onde para os níveis inferiores de concentração de HCl e temperatura houve um aumento de cerca de 28% entre os níveis inferior e superior de tempo, praticamente o dobro da diferença entre os experimentos 7 e 8. Porém, quando se observa os experimentos 6 e 8 que estão nos níveis superiores de tempo e concentração de ácido, entre os níveis -1 e +1 de temperatura há um aumento de quase 40% corroborando para o fato da temperatura ser um fator mais relevante para a geração de ART. De maneira similar, os experimentos 1 e 3, que estão nos níveis inferiores de concentração de ácido e tempo tem um aumento de ART de quase 50% ao passar do nível -1 para o +1 de temperatura. Observa-se uma igualdade de resposta entre os experimentos 3 e 4 pode-se, então, verificar que ao trabalhar com o nível inferior de concentração de ácido, temperaturas maiores e aumento do tempo entre os níveis inferior e superior a resposta não se altera. Com isso, pode-se inferir, que as melhores respostas combinam temperaturas altas e altas concentrações de ácido, e o tempo sendo menos relevante.

A partir dos resultados obtidos na hidrólise foi realizada a regressão múltipla das variáveis com o software Statistica 7.0, tendo como fatores dos termos isolados, as interações e os termos quadráticos de cada uma das variáveis, sendo C a concentração de HCl, T a temperatura e t o tempo. A

Tabela 4.5 apresenta a forma do modelo de regressão múltiplo completo (Equação 4.1), com R² de 96,5%.

Tabela 4.5: Parâmetros da Regressão da Hidrólise Ácida.

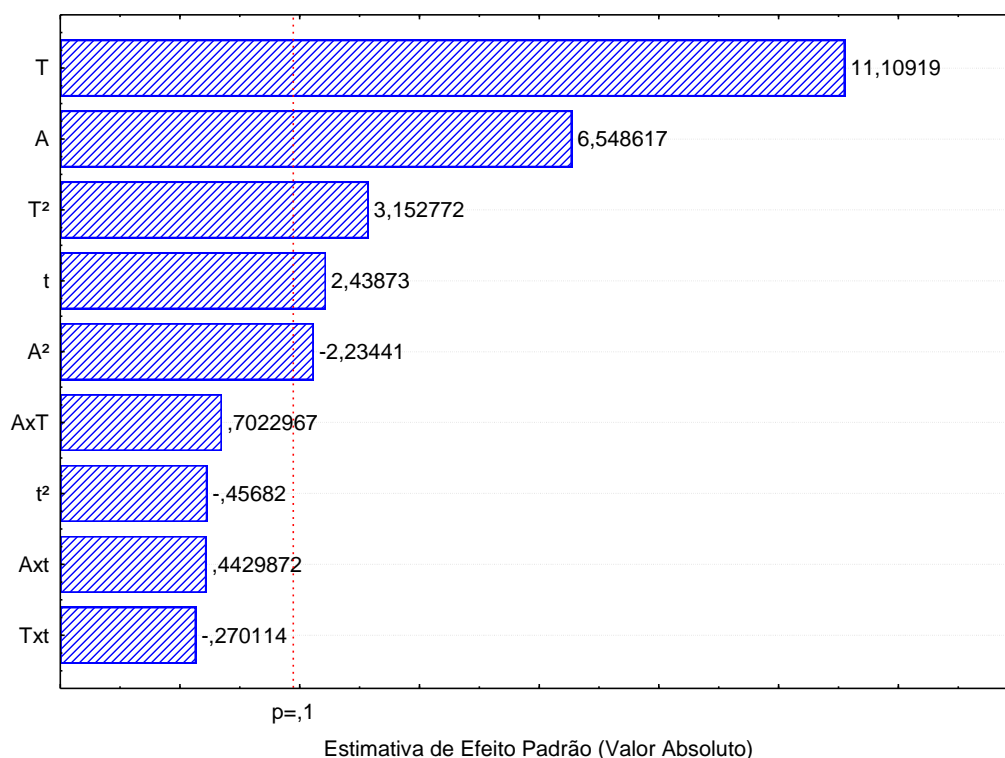
Fatores	Nível de significância	Coefficientes
Intercepto	0,000000	17,77753
A	0,000319	2,54790
A ²	0,060576	-0,95685
T	0,000011	4,32230
T ²	0,016090	1,35012
t	0,044842	0,94885
t ²	0,661638	-0,19563
A×T	0,505170	0,35701
A×t	0,671142	0,22519
T×t	0,794863	-0,13731

A = Concentração de HCl; T = Temperatura; t = Tempo.

$$\begin{aligned}
 ART = & 17,77753 + 2,5479A - 0,95685A^2 + 4,3223T + 1,35012T^2 \\
 & + 0,94885t - 0,19563t^2 + 0,35701AT + 0,22519At \\
 & - 0,13731Tt
 \end{aligned} \quad (4.1)$$

Para determinar quais os fatores relevantes para o modelo, foi realizada a análise de Pareto, apresentada na Figura 4.4. A análise de Pareto mostra visualmente quais são os fatores significativos para o modelo, e quão significativos eles são. Pode-se observar que os fatores concentração de HCl (A), quadrático e linear, temperatura (T), quadrática e linear, e tempo (t) linear foram significativos. Pode-se observar que o termo linear da temperatura (T) foi o mais significativo, sendo seu efeito quase 50% superior ao da concentração de ácido linear (A). O terceiro fator mais significativo foi o componente quadrático da temperatura (T²), que teve um efeito quase 50% inferior à concentração de ácido linear e muito próximo, em valores absolutos, aos outros dois termos relevantes, tempo linear (t) e concentração de ácido quadrática (A²). O fator quadrático do tempo (t²) e as interações entre os termos não foram significativos para o modelo a um nível de significância p=0,1.

Figura 4.4: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Completo.



A = Concentração de HCl; T = Temperatura; t = Tempo.

Os fatores não relevantes obtidos na regressão múltipla, com nível de significância superior a 10% ($p < 0,1$), foram excluídos do modelo gerando a nova tabela de análise estatística dos resultados, como ilustra a Tabela 4.6. Com os valores significativos, obteve-se a equação do modelo reduzida (Equação 4.2) com coeficiente de determinação $R^2=96\%$.

$$ART = 17,52752 + 2,54790C - 0,89906C^2 + 4,32230T + 1,40791T^2 + 0,94885t \quad (4.2)$$

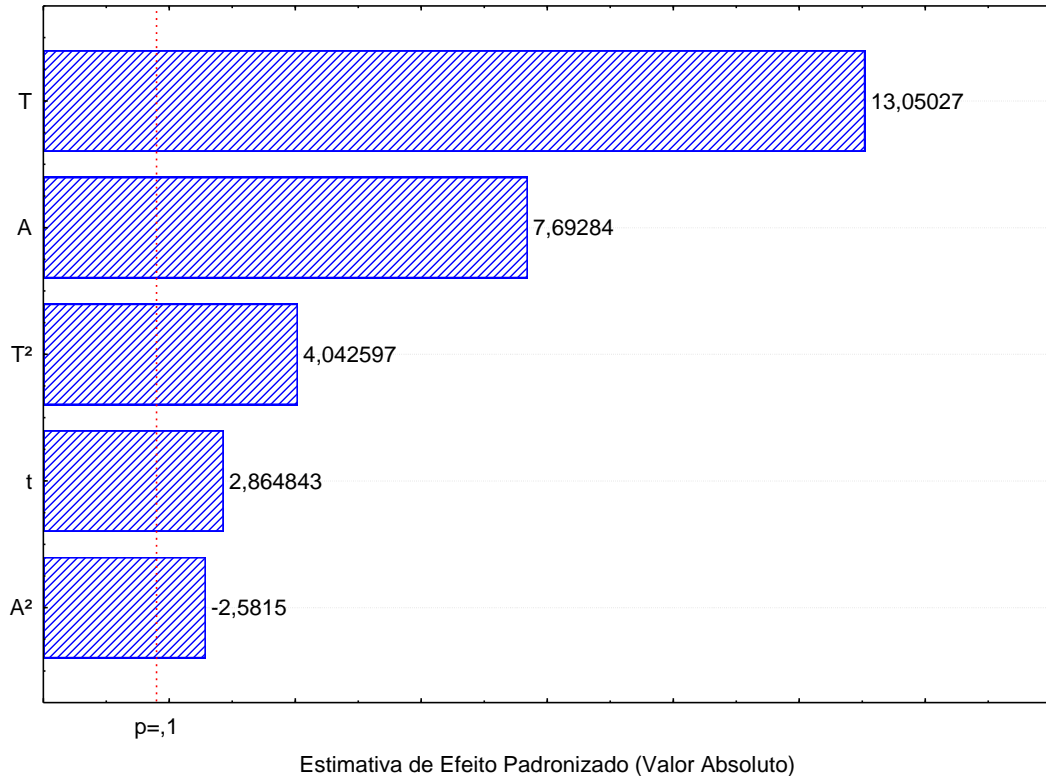
Tabela 4.6: Parâmetros Significativos a Regressão da Hidrólise Ácida.

Fatores	Nível de significância	Coeficientes
Intercepto	0,000000	17,52752
A	0,000009	2,54790
A ²	0,025522	-0,89906
T	0,000000	4,32230
T ²	0,001940	1,40791
t	0,015383	0,94885

A = Concentração de HCl; T = Temperatura; t = Tempo.

Foi realizada a análise de Pareto do modelo reduzido, apresentada na Figura 4.5.

Figura 4.5: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo Reduzido.



A = Concentração de HCl; T = Temperatura; t = Tempo;

Ao observar a análise de Pareto dos termos do modelo reduzido pode-se visualizar que eles são todos significativos a um nível de significância $p=0,1$. Pode-se observar, também, que a relação de significância entre os termos se manteve mesmo após a redução do modelo.

Pode-se observar a aproximação entre os resultados obtidos experimentalmente e os obtidos pelo modelo de ajuste, indicando que há uma boa relação entre o modelo e os pontos experimentais conforme Figura 4.6, o que justifica o bom resultado obtido para o coeficiente de determinação. Ao observar a Figura 4.7, os valores dos resíduos pelos resultados obtidos, vê-se que os pontos se distribuem de forma aleatória em torno do zero, não apresentando qualquer tendência quanto à distribuição, indicando que o modelo obtido é representativo do experimento.

Figura 4.6: Valores Preditos pelo Modelo *versus* Valores Observados no Experimento.

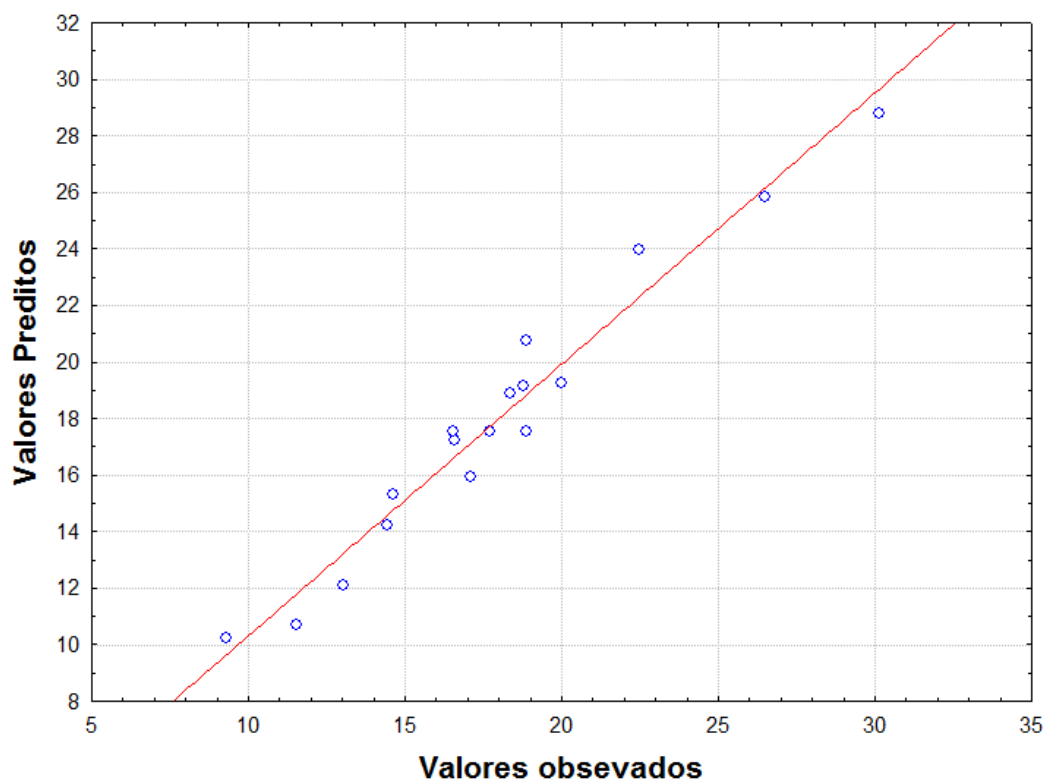
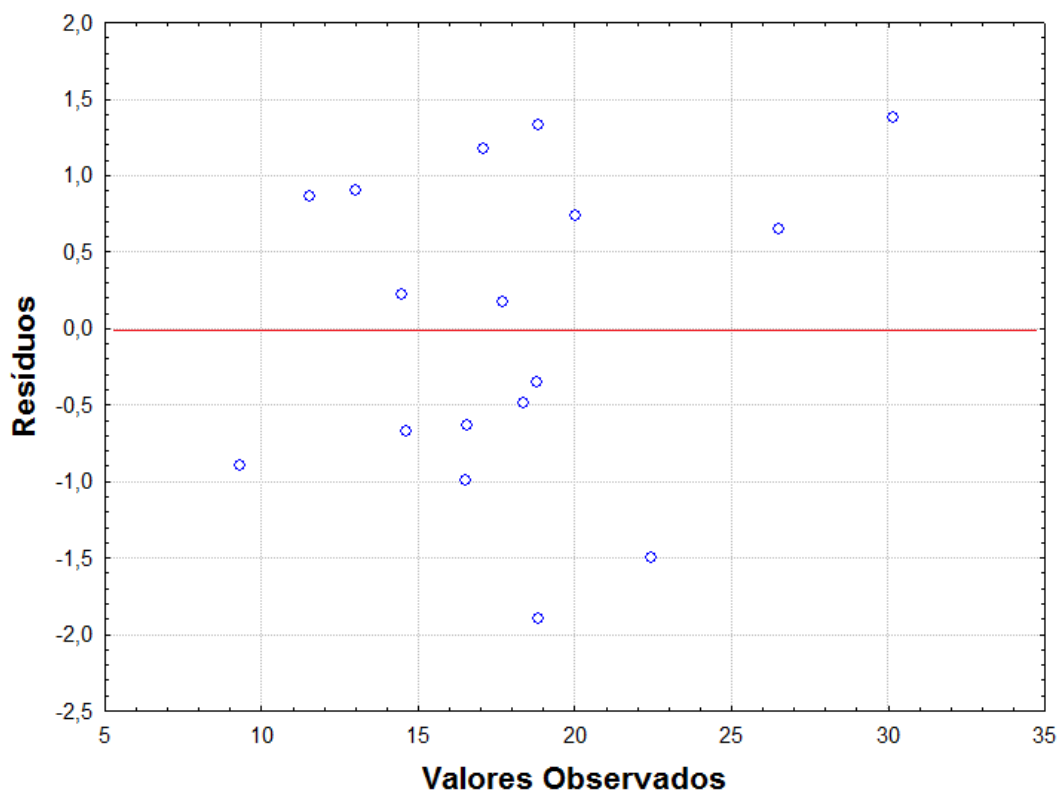


Figura 4.7: Resíduos *versus* Valores Observados.



A partir da equação reduzida, construiu-se as superfícies de resposta e as curvas de níveis correspondentes a cada par de variáveis independentes em função da variável resposta concentração de ART. Pode-se ver nas Figuras 4.8 e 4.9 que os níveis superiores de temperatura – acima de 40°C – levaram às maiores concentrações de ART, todavia as concentrações de HCl se mostraram menos relevantes ao experimento quando comparadas à temperatura. Dussán et al. (2014) ao estudar a hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com temperaturas de 155°C a 175°C, e concentrações de ácido sulfúrico de 2% a 6% encontrou uma significância maior na concentração de ácido que na temperatura. Lenihan et al. (2010) estudaram a hidrólise de casca de batata com concentrações de ácido fosfórico de 2,5% a 10,0% e temperaturas de 135°C a 200°C, em reator batelada, os resultados indicaram que as temperaturas superiores levaram a degradação dos açúcares durante a hidrólise, reduzindo o rendimento, e que as concentrações de ácido mais altas levaram a maior liberação de açúcares. Os resultados encontrados neste trabalho foram contra o encontrado por outros autores, pois a temperatura foi mais significativa que a concentração de ácido, enquanto os autores citados tiveram a concentração de ácido como fator mais significativo. Esse fato pode ser devido às temperaturas estudadas pelos outros autores serem muito altas, levando à degradação dos açúcares gerados. Outro fator que pode colaborar é a faixa de temperaturas estudada neste trabalho ser muito baixa, não hidrolisando totalmente os compostos lignocelulósicos do bagaço de laranja à açúcares. Ao comparar os resultados há indícios de que altas temperaturas degradam os compostos de interesse gerados a compostos indesejados, que podem ser inibidores do posterior processo fermentativo, que não foi estudado neste trabalho, reduzindo o rendimento do processo de hidrólise. Entretanto, as temperaturas estudadas no presente trabalho são muito brandas para hidrolisar completamente a biomassa, sendo necessários estudos posteriores, com temperaturas mais altas, para encontrar uma região ótima para a geração de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja seco moído pré-tratado.

Figura 4.8: Superfície de Resposta da Relação Entre a Temperatura e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).

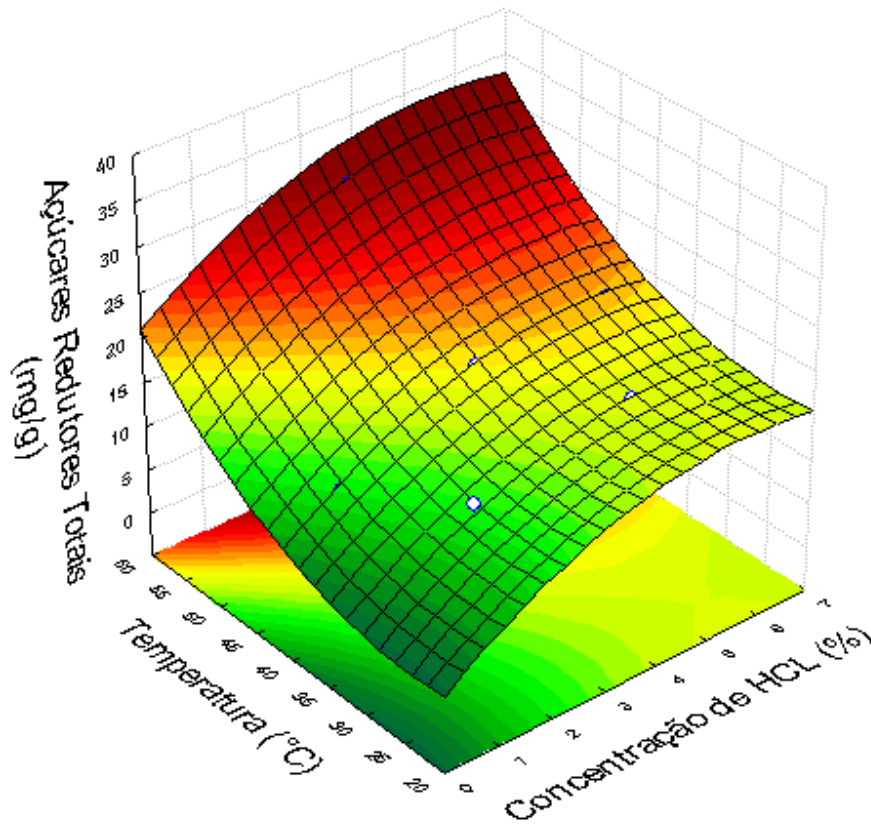
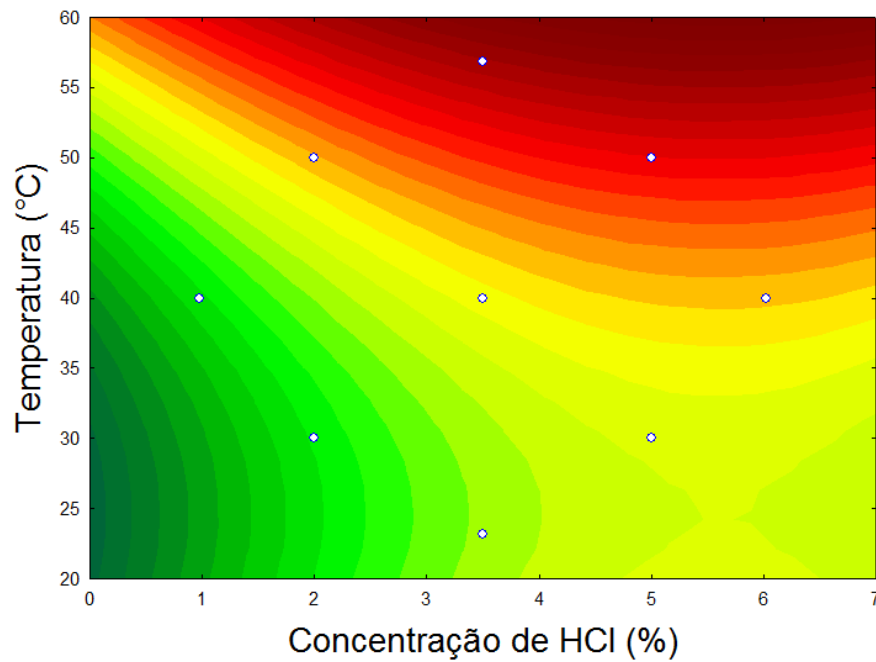


Figura 4.9: Superfície de Contorno da Relação Entre a Temperatura e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).



Quando se compara o tempo e a concentração de HCl, observa-se que a partir de concentrações intermediárias – de 3% –, ocorre uma maior liberação de ART, enquanto não há interferência substancial do tempo (Figuras 4.10 e 4.11). Dussán et al. (2014) encontraram uma relação contrária ao estudar concentrações de ácido sulfúrico variando de 2% a 6% e tempos de 10 a 30 minutos para bagaço de cana-de-açúcar, a concentração de ácido sulfúrico não influenciou na liberação de açúcares, enquanto tempos menores levaram aos maiores rendimentos da hidrólise. Lenihan et al. (2010) ao estudar a hidrólise ácida de casca de batata em um reator batelada com alíquotas retiradas a 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min, e concentrações de ácido fosfórico de 2,5% a 10,0%, encontraram que as maiores concentrações de ácido levam ao maior rendimento de hidrólise, porém tempos longos levam a degradação dos açúcares, reduzindo o rendimento. Awan (2013) ao estudar a hidrólise ácida do bagaço de laranja com concentrações de ácido sulfúrico de 0,5% a 1,5% e tempos de 15 e 30 minutos em autoclave a 120°C e pressão de $9,4 \times 10^4$ Pa, encontrou os melhores níveis de açúcares com concentração intermediária de ácido, 1,0%, e tempo superior, 30 min. Pode-se inferir que dentro das condições estudadas tanto o tempo quanto a concentração de ácido foram significativos para a maior geração de açúcares redutores totais, com a concentração de ácido apresentando uma significância maior. Outros pesquisadores encontraram que a concentração de ácido foi mais significativa, e que tempos muito altos podem levar a transformação dos açúcares gerados em outros compostos, que não são de interesse no processo fermentativo, reduzindo o rendimento. Ao observar as figuras vê-se que as condições estudadas mostraram um indício de região ótima, indicando que as condições que maximizam a geração de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja seco moído pré-tratado não estão muito distantes das estudadas. Entretanto, são necessários estudos posteriores para encontrar essa região ótima e avaliar a viabilidade da aplicação do resíduo da produção de suco de laranja para a produção de bioetanol.

Figura 4.10: Superfície de Resposta da Relação Entre o Tempo e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).

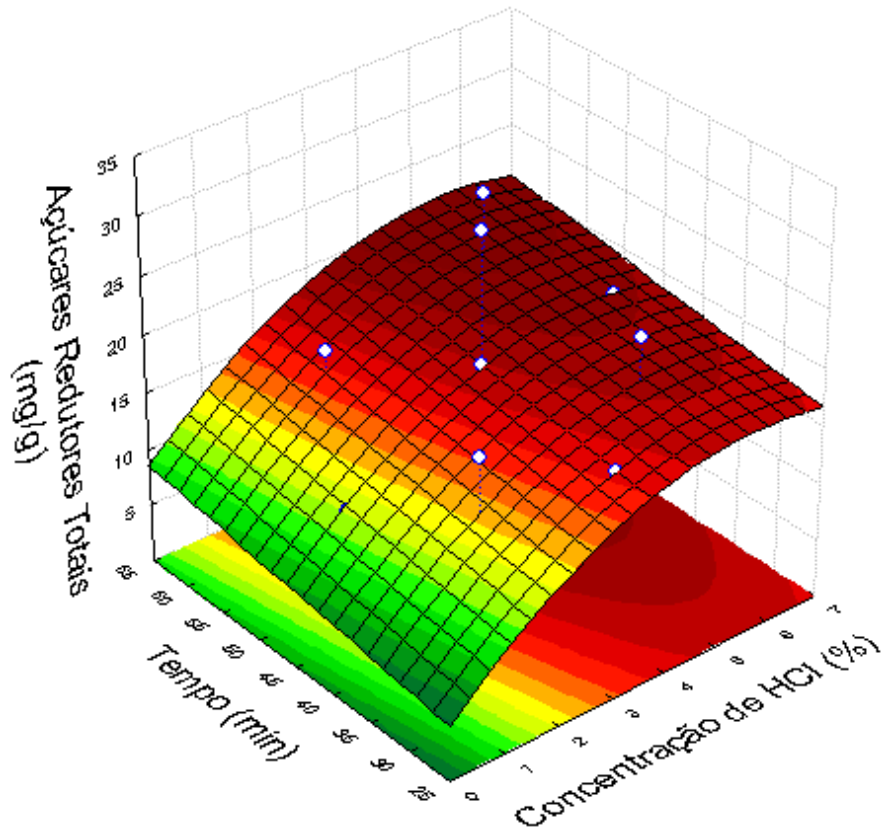
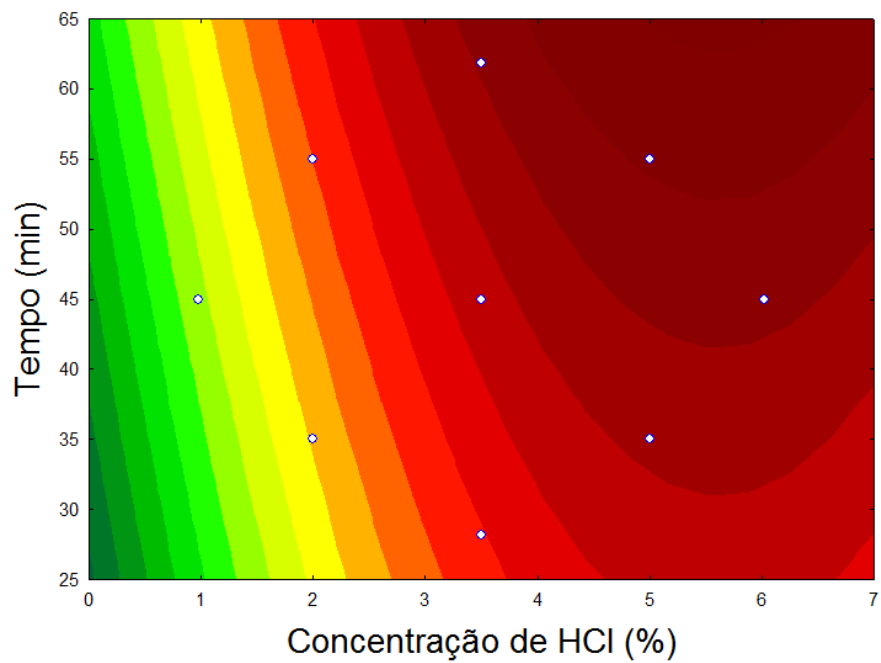


Figura 4.11: Superfície de Contorno da Relação Entre o Tempo e a Concentração de HCl na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).



Avaliando a relação entre tempo e a temperatura, os níveis superiores de temperatura, a partir de 50°C, provocaram elevações nos níveis de ART, enquanto o tempo quase não foi significativo para o aumento da concentração de açúcares (Figuras 4.12 e 4.13). Lenihan et al. (2010) estudando a hidrólise ácida de casca de batata por hidrólise ácida com ácido fosfórico com temperaturas variando de 135°C a 200°C e coleta de alíquotas no tempo de 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 min, encontrou uma relação de aumento na concentração de açúcares em tempos inferiores a 20 min, para todas as temperaturas, mas os melhores resultados foram encontrados para a menor temperatura. Dussán et al. (2014) na hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico encontrou as melhores condições para os menores níveis tanto de tempo quanto de temperatura. Novamente os resultados encontrados no presente trabalho divergem dos encontrados em outras pesquisas, sendo a temperatura mais relevante que o tempo para a geração de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja. Os trabalhos citados acima estudaram faixas de temperatura superiores a estudada neste trabalho, e as temperaturas muito altas favorecem a degradação dos açúcares gerados na hidrólise, reduzindo seu rendimento. Faz-se necessário reiterar o ponto anteriormente abordado, apesar das temperaturas muito altas trabalharem contra a geração de açúcares redutores totais, as temperaturas estudadas no presente trabalho estão abaixo do necessário para maximizar a produção de açúcares redutores totais pela hidrólise do bagaço de laranja. As temperaturas muito altas levam à degradação dos açúcares gerados, reduzindo o rendimento do processo. Apesar de ser necessário pouco tempo para hidrólises com altas temperaturas, se as temperaturas forem altas demais os açúcares vão sendo degradados ao mesmo tempo em que são gerados, por isso é importante estudar quais são as condições necessárias para aumentar a geração de açúcares, lembrando que o gasto energético também deve ser minimizado. Faz-se necessário estudos posteriores para encontrar as faixas de tempo, temperatura e concentração de HCl que geram as maiores concentrações de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja seco moído pré-tratado.

Figura 4.12: Superfície de Resposta da Relação Entre o Tempo e a Temperatura na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).

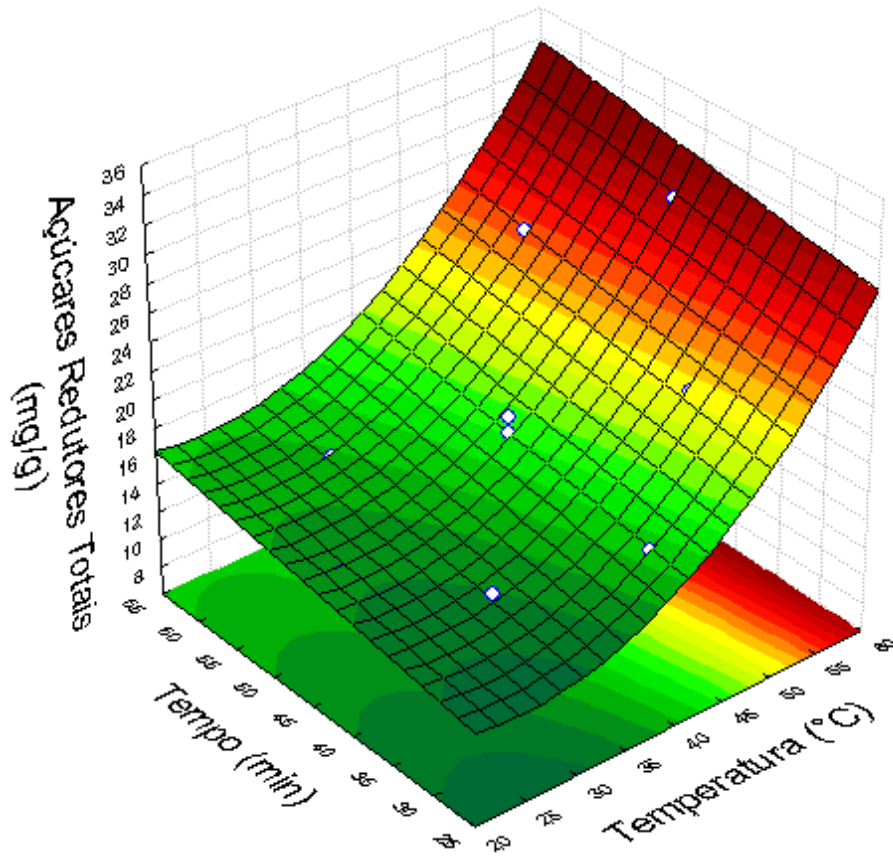
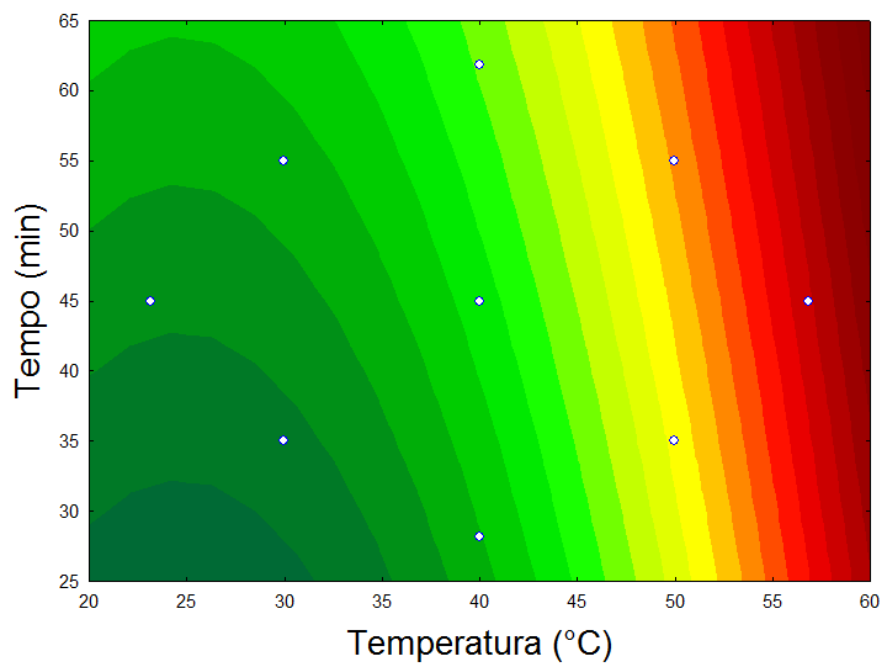


Figura 4.13: Superfície de Contorno da Relação Entre o Tempo e a Temperatura na Liberação de Açúcares Redutores Totais (ART).



A partir dos dados obtidos infere-se que baixas temperaturas de hidrólise ácida diluída levam a uma hidrólise parcial dos compostos lignocelulósicos, ou seja, uma maior liberação de açúcares redutores ocorre a temperaturas maiores do que as estudadas neste trabalho. Porém, ao comparar com a literatura, vê-se que temperaturas muito altas favorecem a degradação dos açúcares formados, reduzindo o rendimento do processo (DUSSÁN et al., 2014; AWAN, 2013; LENIHAN et al., 2010). Pelas superfícies de resposta, pode-se perceber que para maximizar, ou ao menos encontrar a região ótima, seria necessário ampliar a faixa de temperaturas estudadas a níveis mais altos. Isto implica na necessidade de estudos posteriores para encontrar os níveis máximos de liberação de ART do bagaço de laranja pré-tratado.

4.4.2 Hidrólise Enzimática

O estudo da hidrólise enzimática após pré-tratamento com hidróxido de cálcio foi realizado com as enzimas celulase e xilanase (Apêndice D) pH 4,8 e 150 rpm com 1% de sólidos. Através do planejamento estatístico estudado (Item 3.2.4.2), foram obtidas as concentrações de cerca de 75 mg de ART por g de biomassa a aproximadamente 100 mg/g conforme ilustram os resultados obtidos (Tabela 4.7). É possível observar que os resultados de açúcares redutores totais liberados pela hidrólise enzimática foram cerca de 3 vezes superiores aos da hidrólise ácida diluída. Esse resultado pode indicar que, apesar das condições ótimas da hidrólise ácida não terem sido encontradas, a hidrólise enzimática seja mais eficiente para a geração de açúcares a partir do bagaço de laranja.

Tabela 4.7: Concentração de ART Liberados pela Hidrólise Enzimática em mg de ART por g de Biomassa.

Experimento	Celulase (FPU/mL)	Xilanase (U/g)	Tempo (h)	ART (mg/g)
1	(-1) 3,00	(-1) 1,00	(-1) 24,00	80,54±0,00
2	(-1) 3,00	(-1) 1,00	(+1) 40,00	75,62±1,09
3	(-1) 3,00	(+1) 4,00	(-1) 24,00	80,43±5,06
4	(-1) 3,00	(+1) 4,00	(+1) 40,00	80,43±1,46
5	(+1) 6,00	(-1) 1,00	(-1) 24,00	97,16±3,47
6	(+1) 6,00	(-1) 1,00	(+1) 40,00	98,14±2,22
7	(+1) 6,00	(+1) 4,00	(-1) 24,00	84,11±1,47
8	(+1) 6,00	(+1) 4,00	(+1) 40,00	98,78±1,25
9	(-α) 1,98	(0) 2,50	(0) 32,00	75,33±3,82
10	(+α) 7,02	(0) 2,50	(0) 32,00	99,66±0,62
11	(0) 4,5	(-α) 0,00	(0) 32,00	89,93±1,91
12	(0) 4,5	(+α) 5,00	(0) 32,00	84,21±2,85
13	(0) 4,5	(0) 2,50	(-α) 18,54	83,82±2,50
14	(0) 4,5	(0) 2,50	(+α) 45,45	88,08±1,18
15	(0) 4,5	(0) 2,50	(0) 32,00	83,62±1,91
16	(0) 4,5	(0) 2,50	(0) 32,00	83,13±0,55
17	(0) 4,5	(0) 2,50	(0) 32,00	80,78±1,94

Pode-se observar uma boa reprodutibilidade dos pontos centrais significando uma boa qualidade da repetibilidade do processo. Observa-se pela Tabela 4.7 que as maiores concentrações de ART ocorreram nos experimentos 5, 6, 8 e 10, correspondentes aos níveis superiores de concentração de celulase (+1 e +α) e níveis variáveis de temperatura e concentração de xilanase. Os menores valores de ART foram nos experimentos 2 e 9 que tem em comum os níveis inferiores de celulase, -1 e -α respectivamente. Os experimentos 1 e 2 – nível -1 de celulase – tiveram concentrações de ART cerca de 15% inferiores aos experimentos 7 e 8 – nível +1 de celulase – corroborando para a maior significância da celulase frente ao tempo de hidrólise. Os experimentos 3 e 4 contribuem ainda mais para essa ideia, por apresentar a mesma concentração de ART para os níveis inferior e superior de tempo. Pode-se observar que a concentração de xilanase quase não interferiu na liberação de ART, o que pode ser observado ao comparar os experimentos 1 e 3 que com níveis iguais de celulase e tempo e níveis

diferentes de xilanase apresentam praticamente a mesma concentração de ART.

A partir dos resultados obtidos na hidrólise foi realizada a regressão múltipla das variáveis com o software Statistica 7.0. Devido à grande variabilidade inerente aos processos biológicos, como os catalisados por enzimas, foram considerados os fatores com nível de significância inferior a 10% ($p < 0,1$). Os fatores dos termos isolados, dos termos quadráticos e das interações entre os termos estão apresentados na Tabela 4.8, onde podemos ver que todos os fatores foram relevantes para o modelo. A partir destes termos, onde C é a concentração de celulase (FPU/mL), X a concentração de xilanase (U/g) e t o tempo (h), temos a Equação 4.3 na forma completa, com fator de correlação R^2 de 98,3%.

$$\begin{aligned}
 ART = & 82,52181 + 7,4752C + 1,71908C^2 - 1,26906X + 1,56793X^2 \\
 & + 1,31147t + 1,17272t^2 - 2,139887CX + 2,56974Ct \\
 & + 2,32445Xt
 \end{aligned} \quad (4.3)$$

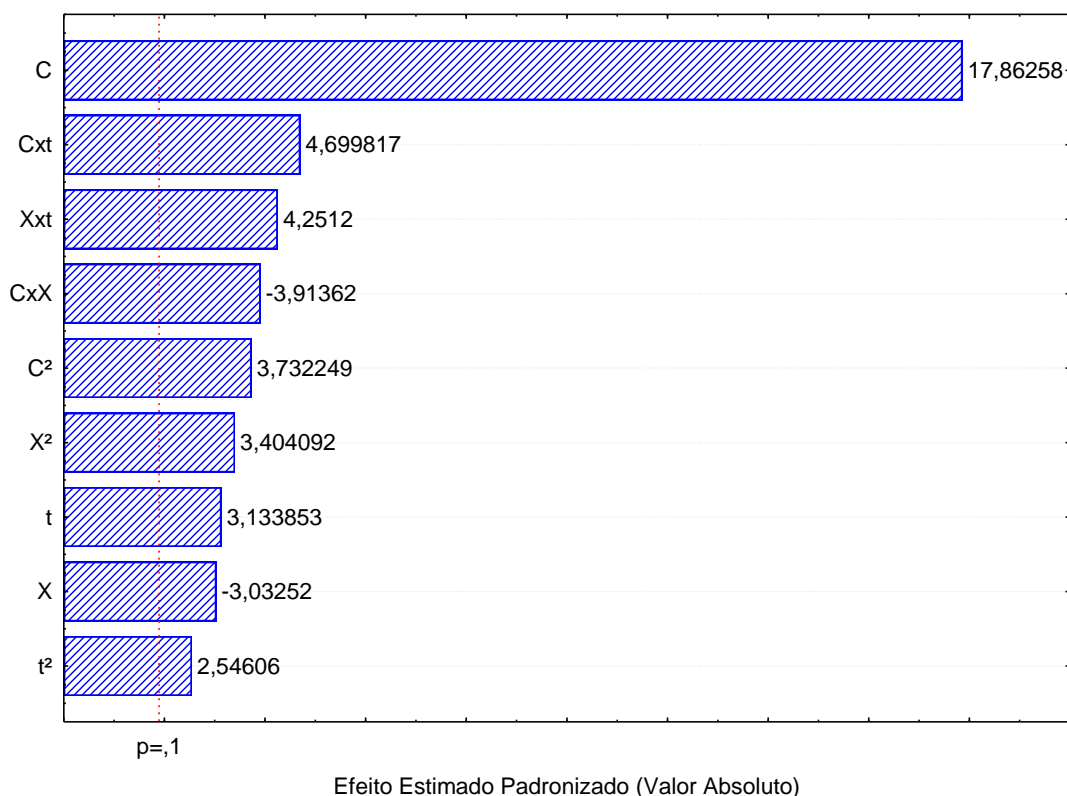
Tabela 4.8: Parâmetros Significativos a Regressão da Hidrólise Enzimática.

Fatores	Nível de significância	Coefficientes
Intercepto	0,000000	82,52181
C	0,000000	7,47520
C ²	0,007337	1,71908
X	0,019047	-1,26906
X ²	0,011379	1,56793
t	0,016520	1,31147
t ²	0,038323	1,17272
CxX	0,005796	-2,13987
Cxt	0,002209	2,56974
Xxt	0,003788	2,32445

C = Concentração de Celulase; X = Concentração de xilanase; t = Tempo.

Para comprovar que todos os fatores foram relevantes para o modelo foi realizada a análise de Pareto (Figura 4.14).

Figura 4.14: Análise de Pareto dos Coeficientes do Modelo.



A análise de Pareto mostra visualmente quais são os fatores significativos para o modelo, e quão significativos eles são. Pode-se observar que todos os fatores, incluindo a relação entre eles foram significativos. Pode-se observar que a concentração de celulase (C) foi o termo mais significativo, sendo seu efeito quase 74% superior ao da relação entre a concentração de celulase e do tempo (Cxt). A diferença de significância entre o segundo fator e o último, o componente quadrático do tempo (t^2) foi de cerca de 50%, porém pelo gráfico pode-se ver que a significância da concentração de celulase é muito superior à dos outros fatores.

É possível observar a aproximação entre os resultados obtidos experimentalmente e os obtidos pelo modelo de ajuste, indicando que há uma boa correlação entre os pontos experimentais e o modelo, conforme Figura 4.15, o que justifica o bom resultado obtido para o fator de correlação. Ao observar a Figura 4.16, dos valores dos resíduos pelos resultados obtidos, vê-se que os pontos se distribuem de forma aleatória em torno do zero, não

representando nenhuma tendência quanto à distribuição, indicando que o modelo obtido é representativo do experimento.

Figura 4.15: Valores Preditos pelo Modelo *versus* Valores Observados no Experimento.

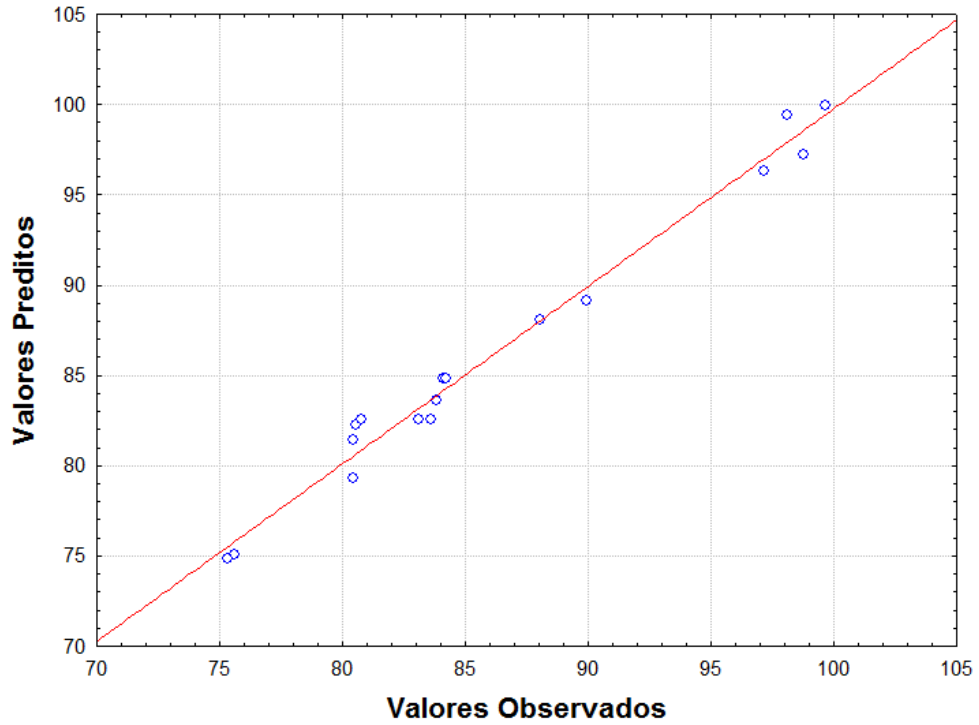
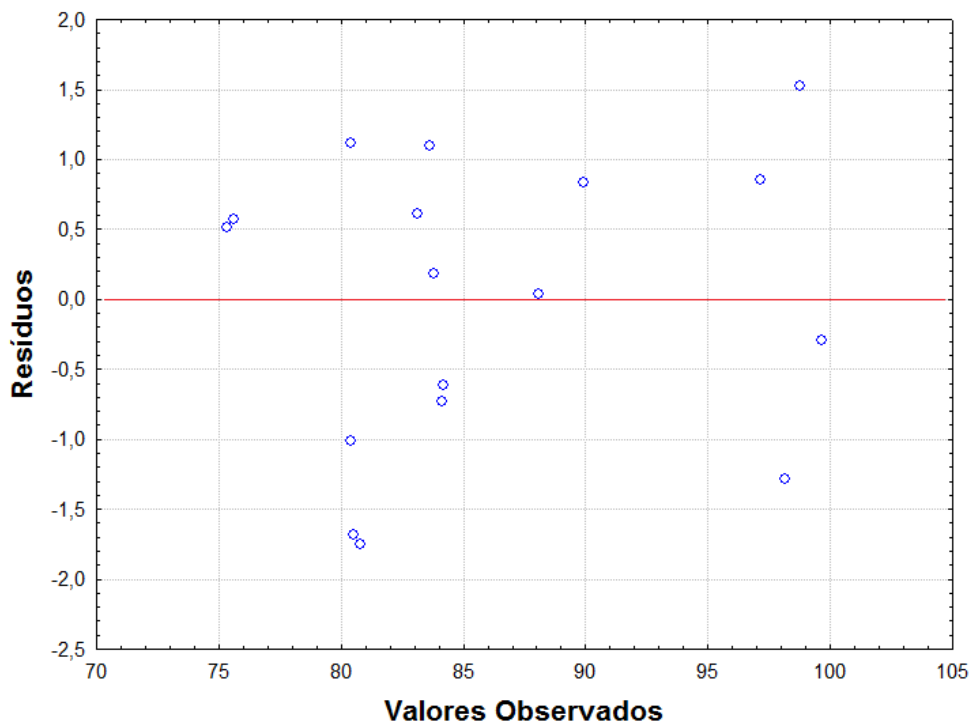


Figura 4.16: Resíduos *versus* Valores Observados.



As Figuras 4.17 e 4.18 demonstram a relação entre as concentrações das enzimas na liberação de açúcares redutores totais, observa-se que os maiores valores ocorreram nas maiores concentrações de celulase – 7,02 FPU/mL – e menores concentrações de xilanase – 0,00 U/g –, sendo a concentração de celulase mais significativa. Os resultados encontrados neste trabalho vão contra ao encontrado por Xin et al. (2015) que encontraram um efeito sinérgico para a geração de açúcares na combinação de celulases e hemicelulases para a hidrólise do caule e da palha de milho. Selig et al. (2008) também encontraram uma relação positiva para a geração de açúcares da combinação de xilanase e celulase na hidrólise de caule e palha de milho. Lin et al. (2010) estudando a hidrólise de palha de arroz e de substrato artificial também encontraram um efeito sinérgico na combinação de celulase e hemicelulase. O mesmo efeito sinérgico foi encontrado por Bura et al. (2009) na hidrólise de caule e palha de milho e álamo pela combinação de celulase e hemicelulase. Ao contrário do encontrado por outros pesquisadores, os resultados deste trabalho não encontraram o efeito sinérgico da combinação de enzimas. A falta de trabalhos similares com casca de laranja para comparar os resultados é um dos fatores que dificulta a total confirmação deste fato. Outro fator que pode ser responsável pela diferença nos resultados é a baixa concentração de hemicelulose na biomassa, devido à pequena massa utilizada para o pré-tratamento e posterior hidrólise, é possível que não houvesse substrato para ser hidrolisado pela enzima xilanase. Há também que ressaltar que os trabalhos com que se compara os resultados são todos referentes a outras biomassas. Tipos diferentes de plantas possuem diferentes composições lignocelulósicas, podendo este ser o motivo dos resultados inconclusivos. Os resultados obtidos pelo planejamento composto central da hidrólise enzimática do bagaço de laranja indicam que são necessários estudos posteriores, para comprovar que o efeito sinérgico da combinação de celulases e hemicelulases é realmente inexistente na hidrólise do bagaço de laranja.

Figura 4.17: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Xilanase e a Concentração de Celulase na Geração de Açúcares Redutores Totais.

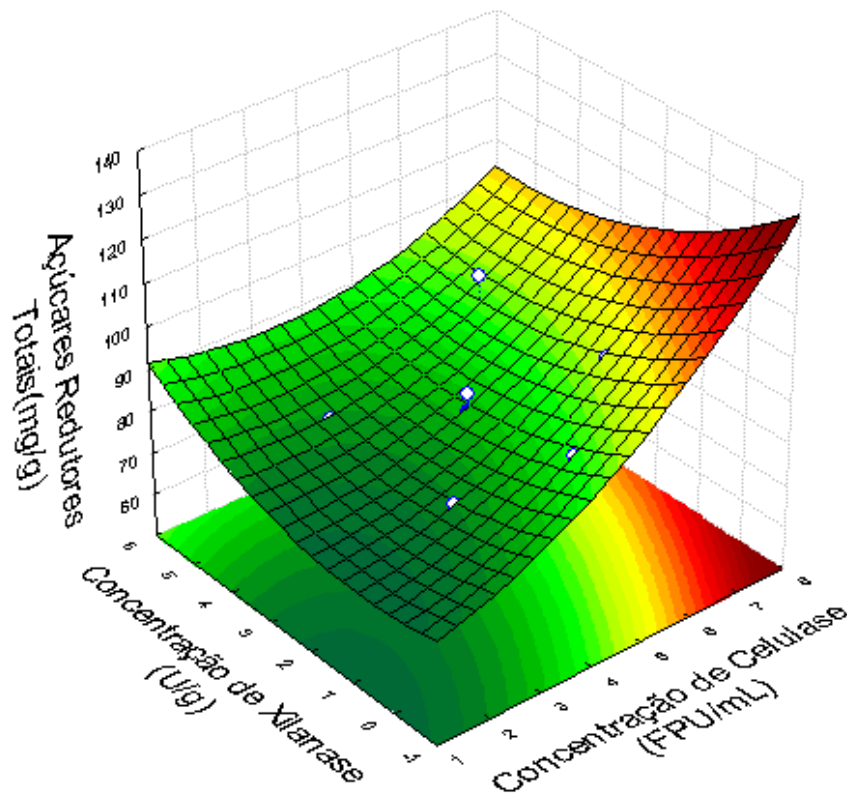
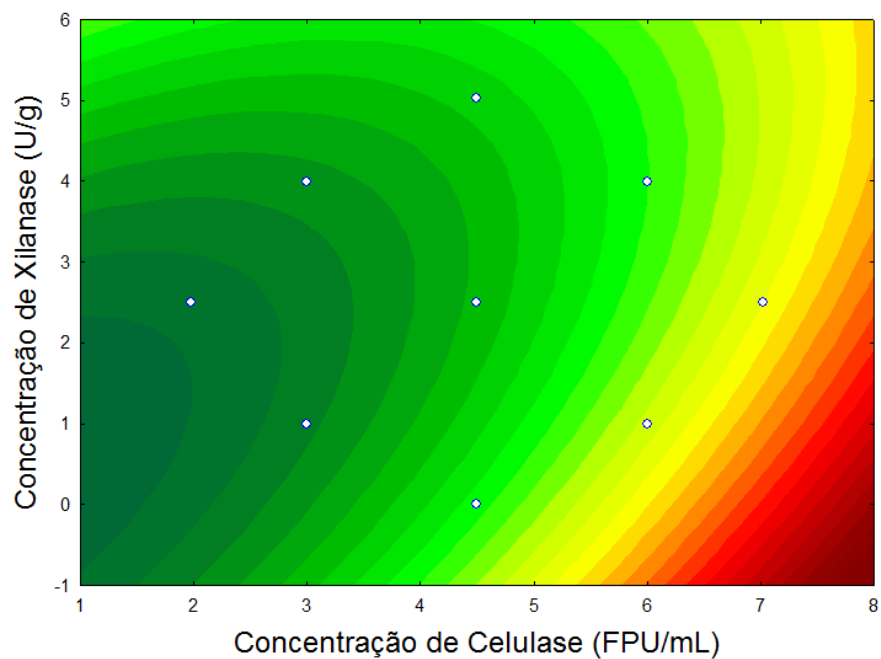


Figura 4.18: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Xilanase e a Concentração de Celulase na Geração de Açúcares Redutores Totais.



Quando se compara o efeito do tempo e da concentração de celulase na concentração de açúcares redutores totais observa-se que os níveis superiores das duas variáveis – 40 h e 7,02 FPU/mL – levaram às maiores concentrações de açúcares redutores, conforme ilustram as Figuras 4.19 e 4.20. Bura et al. (2009) estudando o efeito do tempo na hidrólise de caule e palha de milho e álamo por celulase encontraram que após tempos de 28 min havia uma tendência de estabilização na geração de açúcares, porém a conversão máxima ocorreu a 72 h, indicando que o tempo é um fator significativo para a liberação de açúcares, fato que se repetiu no presente trabalho. Lin et al. (2010) ao estudar o efeito do tempo na liberação de ART em palha de arroz e substrato artificial também encontraram a máxima conversão a 72 h, essa relação se mantinha com diferentes concentrações de enzima, com concentrações maiores liberando mais açúcares, similar ao encontrado no presente trabalho. Xin et al. (2015) também encontraram uma relação crescente para a geração de açúcares variado do tempo 0 até 24 h na hidrólise de palha de milho. Pode-se inferir ao avaliar os gráficos e comparar com o encontrado na literatura que os tempos e/ou concentrações de celulase estudados foram insuficientes para exaurir o substrato, e que ambos os fatores são significativos para conseguir concentrações superiores de açúcares redutores totais. Apesar dos trabalhos apresentados não haverem sido realizados com o bagaço de laranja, é possível traçar um paralelo de comparação, pelos resultados indicarem para a mesma direção. Normalmente os estudos de temperatura são realizados previamente e os experimentos são realizados com tempos iguais. Para a realização de estudos posteriores há a indicação de que são necessários tempos de pelo menos 45 h para maximizar a hidrólise enzimática. Os resultados possibilitam inferir que o tempo não deve ser um fator de estudo do planejamento fatorial, por ser um fator que, devido aos custos de produção, é, normalmente, limitado pela demanda industrial. Há a indicação de que concentrações maiores de celulase devam ser empregadas para garantir a maximização da hidrólise da biomassa, aumentando o rendimento e conseqüentemente, eficiência do processo.

Figura 4.19: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Celulase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.

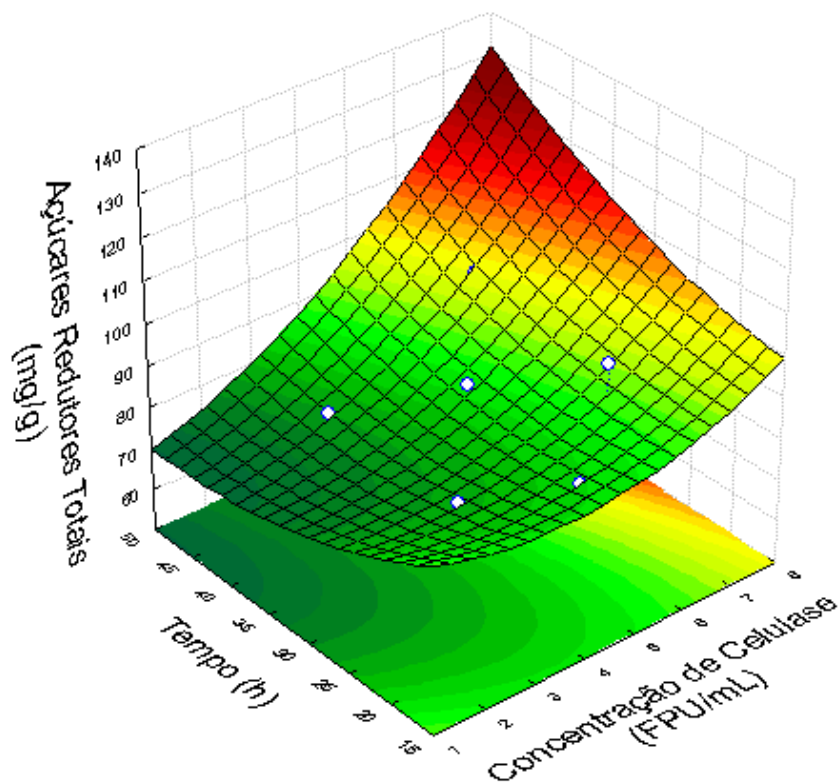
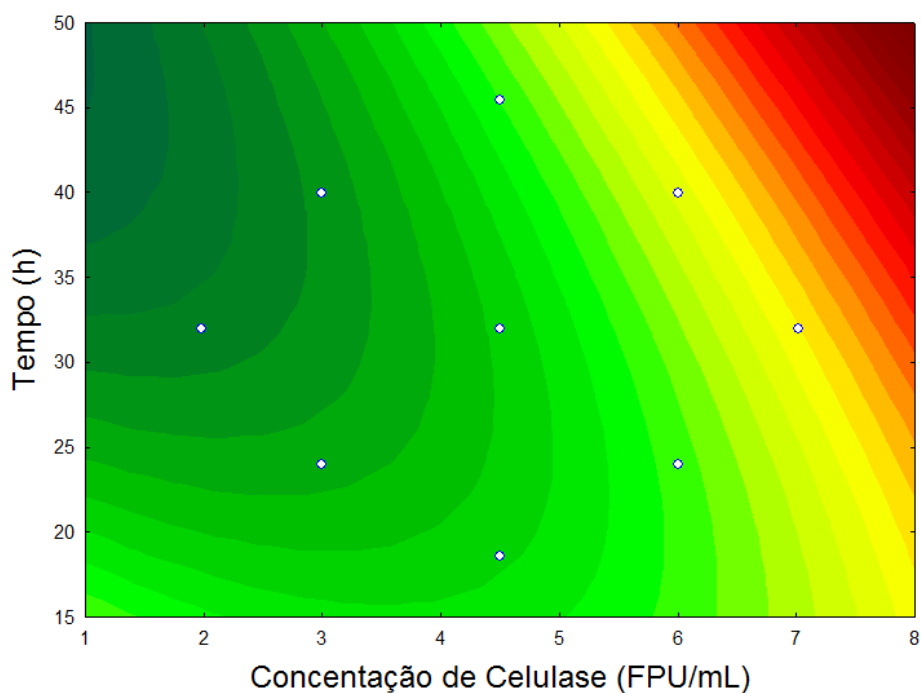


Figura 4.20: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Celulase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.



Na relação do tempo com a concentração de xilanase, foram encontradas duas regiões de máximo para a liberação de açúcares redutores totais, uma na combinação dos menores níveis – 0,0 U/g e 18,54 h – e a outra na combinação dos maiores níveis – 5,00 U/g e 45,45 h – (Figuras 4.21 e 4.22). Bura et al. (2009) ao estudar a hidrólise de palha de milho e álamo encontraram concentrações crescentes de açúcares para tempos variando de 0 a 72 h sem variar a concentração de xilanase. Lin et al. (2010) também encontraram concentrações crescentes de açúcares para tempos variando de 0 a 72 h e concentrações de xilanase variando entre 0,05 mL/g de substrato e 0,15 mL/g de substrato na hidrólise de substrato artificial e palha de milho. Ao comparar os resultados encontrados com os da literatura, pode-se observar que no presente trabalho os dados vão na contramão dos outros autores, não havendo uma tendência de crescimento com o aumento nem da concentração de xilanase, nem do tempo. Os resultados encontrados neste trabalho indicam que a combinação das enzimas não foi significativa para a geração de açúcares redutores totais, ao contrário do encontrado na literatura para outras biomassas. As figuras mostram que houve uma incoerência entre as concentrações de xilanase e a geração de açúcares redutores totais durante as hidrólises. Essa incoerência pode ser devido à baixa concentração de substrato, como citado anteriormente. Há a possibilidade, devido à variabilidade do material vegetal, que por variação na quantidade de hemicelulose na biomassa, de que em alguns frascos erlenmeyer não houvesse substrato para a atuação da enzima xilanase. É necessário reiterar que os trabalhos encontrados na literatura não foram realizados com bagaço de laranja, nem mesmo de frutas, tornando a comparação um pouco difícil. Para garantir a confiabilidade dos resultados é imperativa a realização de trabalhos subsequentes, com massas maiores de substrato, para comprovar se a xilanase realmente não favorece o processo de hidrólise do bagaço de laranja, ou se, por falta de homogeneidade no material, os resultados apresentaram esta incoerência.

Figura 4.21: Superfície de Resposta da Relação entre a Concentração de Xilanase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.

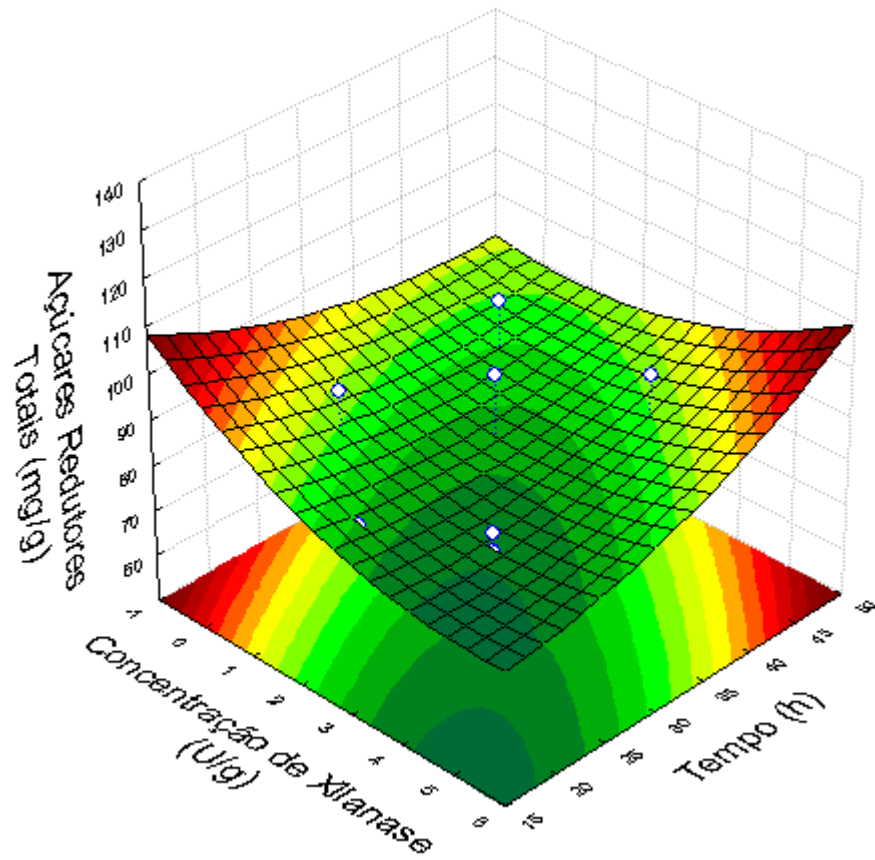
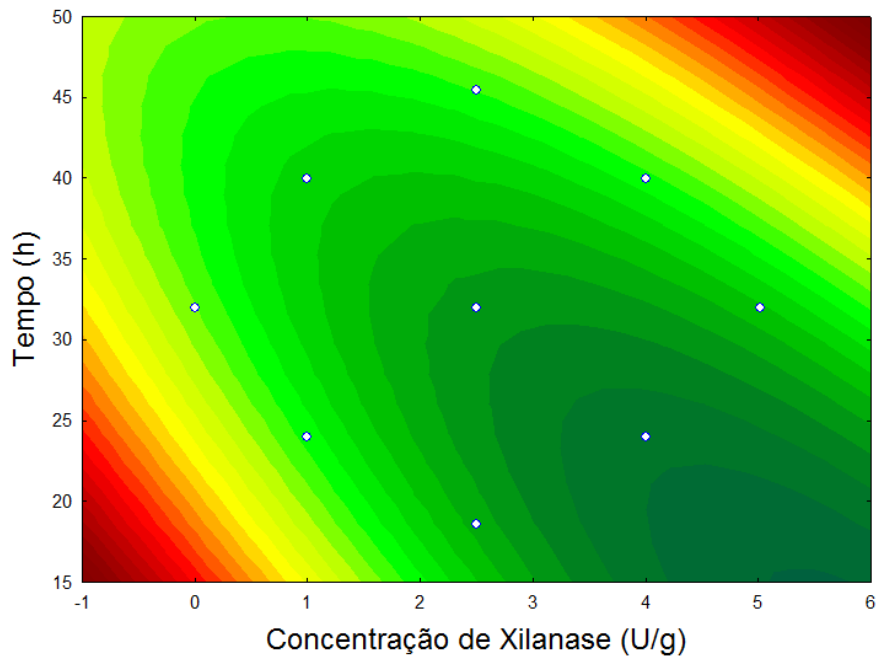


Figura 4.22: Superfície de Contorno da Relação entre a Concentração de Xilanase e o Tempo na Geração de Açúcares Redutores Totais.



Os gráficos gerados pela avaliação estatística dos resultados não apresentam um ponto de máximo central, ou seja, não houve uma região ótima. Estudos posteriores devem ser realizados para garantir a viabilidade do uso do bagaço de laranja para a produção de etanol de segunda geração. Há uma indicação, pelos resultados encontrados, de que o tempo de hidrólise deva ser padronizado, acima de 45 h, que concentrações maiores e enzima celulase sejam estudadas e de que massas maiores de biomassa sejam hidrolisadas, para garantir que não houve efeito sinérgico na combinação das enzimas celulase e xilanase.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

O estudo da viabilidade de obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja foi realizado com hidrólise ácida diluída com baixas temperaturas e com hidrólise enzimática com combinação de celulase e xilanase.

O bagaço de laranja foi coletado preparado e caracterizado. A caracterização lignocelulósica encontrou 22,9% de celulose valor semelhante ao encontrado na literatura, 3,39% de hemicelulose, inferior ao normalmente encontrado para bagaço de laranja, e 9,90% de lignina, quantidade superior ao citado na literatura.

Ao pré-tratar a biomassa houve uma perda de massa média de 30,03%.

O pré-teste indicou um efeito positivo na combinação das enzimas para geração de açúcares redutores.

Com os fatores estudados não foi possível encontrar a região ótima de geração de açúcares redutores. A hidrólise enzimática gerou maiores concentrações de açúcares redutores que a hidrólise ácida

O planejamento composto central da hidrólise ácida diluída liberou de $9,32 \pm 0,68$ mg ART por g de biomassa a $30,15 \pm 0,31$ mg ART por g biomassa, o fator mais significativo foi a temperatura e o menos o tempo, não foi possível encontrar a região ótima com os fatores estudados.

O planejamento composto central da hidrólise enzimática liberou de $75,33 \pm 3,82$ mg ART por g biomassa a $99,66 \pm 0,62$ mg ART por g biomassa, quase o triplo da hidrólise ácida. O fator mais significativo foi a concentração de celulase e o menos a concentração de xilanase. Não houve um efeito sinérgico para a geração de açúcares na combinação das enzimas. Os fatores estudados não possibilitaram encontrar a região ótima de geração de açúcares redutores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADNEY, B.; BAKER, J. Measurement of Cellulase Activities. Laboratory Analytical Procedure, **National Renewable Energy Laboratory**, 1996.
- ACKER, R. V. et al. Improved saccharification and ethanol yield from field grown transgenic poplar deficient in cinnamoyl-CoA reductase. **PNAS**, v. 111, n. 2, p. 845-850, jan. 2014.
- AWAN, A. T. **Orange Bagasse as Biomass for 2G-Ethanol Production**. 2013. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S. Multi-factor experimental designs for exploring response surfaces. **Annals of mathematical statistics**, v. 28, n. 1, p. 195-241, 1957.
- BROWNING, B. L. Methods of wood chemistry. New York: Interscience, 1967. 377 p.
- BURA, R.; CHANDRA, R.; SADDLER, J. Influence of xylan on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover and hybrid poplar. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 315-322, 2009.
- CANIZO, J. R. et al. Release of potentially fermentable sugars during dilute acid treatments of bermuda grass NK37 (*Cynodon dactylon*) for second-generation ethanol production. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 89, p. 1941-1947, 2014.
- CARVALHO, M. L. de. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- CHEN, H. G.; ZHANG, Y. H. P. New biorefineries and sustainable agriculture: Increased food, biofuels, and ecosystem security. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 117-132, 2015.
- CLEMENTE, E. et al. Características da farinha de resíduo do processamento da laranja. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 2, p. 257-269, 2012.
- COTANA, F. et al. Production of bioethanol in a second generation prototype from pinewood chips. **Energy Procedia**, v. 45, p. 42-51, 2014.
- da SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimolizada com *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- DUSSÁN, K. J.; et al. Dilute-acid hydrolysis of cellulose to glucose sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 433-438, 2014.

FONSECA, M. J. de O. **Estudo da hidrólise ácida com ácido clorídrico em água e etanol na qualidade da polpa de *Eucalyptus spp.* e *Pinus spp.* para aplicação na produção de papel de impressão e carboximetilcelulose (CMC)**. 2014. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) – Centro Universitário do Leste de Minas, Coronel Fabriciano.

GHOSE, T. K.; BISARIA, V. S. Measurement of hemicellulase activities part 1: Xylanases. Great Britain: **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 12, p. 1739-1752, 1987.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, 2015.

HAMES, B. et al. Preparation of samples for compositional analysis. Laboratory Analytical Procedure, **National Renewable Energy Laboratory**, 12 f, 2008

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, v.1 Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 2. Ed. 1976.

KOSINKOVA, J.; et al. Measuring the regional availability of biomass for biofuels and the potential for microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 49, p. 1271-1285, 2015.

KUMAR, C. S. C.; MYTHILY, R.; CHANDRAJU, S. Extraction of carbohydrate from sweet orange peels (*Citrus sinensis* L.) and their identification via LC/MS & thin layer chromatographic analysis. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 8(2), p. 709-715, dec. 2011.

LENIHAN, P. et al. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 395-403, 2010.

LIN, L. et al. In-depth investigation of enzymatic hydrolysis of biomass wastes based on three major components: Cellulose, hemicellulose and lignin. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8217-8223, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, mar. 1959.

PEREIRA, D. E. P. **Análise de celulases e xilanases por fungo isolado a partir do Bioma Cerrado**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

QUALIVIDROS. Altura: 545 pixels. Largura: 308 pixels. 24 dpi. 44,7 KB. Formato Arquivo PNG. Disponível em: <<http://www.qualividros.com/pages/produto.php?cod=200#nub/0/>>. 2016. Acesso em: 05 mar. 2016.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 2010. 447 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

RAÍZEN. Sobre a Raízen: Perfil da Empresa. Disponível em: <<http://www.raizen.com/perfil-da-empresa-0>>. 2014. Acesso em: 13 mai. 2016.

RETORE, M.; et al. Efeito da fibra de coprodutos agroindustriais e sua avaliação nutricional para coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 5, p. 1232-1240, 2010.

RIVAS, B; et al. Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 2380-2387, 2008.

RODRIGUES, J. A. R. Do Engenho à biorrefinaria. A Usina de açúcar como empreendimento industrial para a geração de produtos bioquímicos e biocombustíveis. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1242-1254, 2011.

SELIG, M. J. et al. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4997-5005, 2008.

SILVA, K. A. et al. Study of orange bagasse digestibility by chemical pretreatments. **Chemical Engineering Transactions**, v. 35, p. 1045-1050, 2013.

SILVA, C. E. F. **Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2 g**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

SILVA, C. E. F. et al. Citric waste saccharification under different chemical treatments. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 37, n. 4, p. 387-395, oct.-dec. 2015.

SU, Y.; ZHANG, P.; SU, Y. An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 991-1003, 2015.

XIN, D. et al. Role of hemicellulases in production of fermentable sugars from corn stover. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 209-217, 2015.

YU, M. et al. A cost-effective integrated process to convert solid-state fermented sweet sorghum bagasse into cellulosic ethanol. **Applied Energy**, v. 115, p. 331-336, 2014.

APÊNDICE A -TAMPÕES

Tampão Acetato de Sódio

Para fazer o tampão acetato de sódio é necessário preparar duas soluções “estoque”. Uma solução ácida (A) e uma solução básica (B).

A – Solução 0,2 M de ácido acético (11,55 mL em 1000 mL de água)

B – Solução 0,2 M de acetato de sódio (16,4 g em 1000 mL de água)

Para obter o tampão no pH desejado é necessário seguir a equação abaixo:

$$x \text{ mL de A} + y \text{ mL de B completando para } 100 \text{ mL}$$

Os termos x e y para diferentes pH estão apresentados no Quadro abaixo:

x (mL)	y (mL)	pH
46,3	3,7	3,6
44	6	3,8
41	9	4
36,8	13,2	4,2
30,5	19,5	4,4
25,5	24,5	4,6
20	30	4,8
14,8	35,2	5
10,5	39,5	5,2
8,8	41,2	5,4
4,8	45,2	5,6

Tampão Citrato Fosfato

Para fazer o tampão citrato fosfato são necessárias duas soluções “estoque” uma ácida (A) e uma básica (B):

A – Solução 0,1 M de ácido cítrico (19,21 g em 1000 mL)

B - Solução 0,2 M de fosfato de sódio dibásico heptahidratado (53,65 g em 1000 mL)

Para o obter o tampão no pH desejado é necessário seguir a equação abaixo:

$$x \text{ mL de A} + y \text{ mL de B completando para } 100 \text{ mL}$$

Os termos x e y para diferentes pH estão apresentados no Quadro abaixo:

x (mL)	y (mL)	pH
44,6	5,4	2,6
42,2	7,8	2,8
39,8	10,2	3
37,7	12,3	3,2
35,9	14,1	3,4
33,9	16,1	3,6
32,3	17,7	3,8
30,7	19,3	4
29,4	20,6	4,2
27,8	22,2	4,4
26,7	23,3	4,6
25,2	24,6	4,8
24,3	25,7	5
23,3	26,7	5,2
22,2	27,8	5,4
21	29	5,6
19,7	30,3	5,8
17,9	32,1	6
16,9	33,1	6,2
15,4	34,6	6,4
13,6	36,4	6,6
9,1	40,9	6,8
6,5	43,6	7

APÊNDICE B – REAGENTE DE DNS

Materiais

Para o preparo do reagente de DNS foram utilizados os seguintes reagentes:

- Hidróxido de Sódio, 16 g;
- Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico, 10 g;
- Tartarato de Sódio e Potássio, 300 g;

Métodos

O hidróxido de sódio foi diluído em em 200 mL de água destilada. Foram adicionados à solução de hidróxido de sódio o ácido 3,5-dinitrosalicílico e 500 mL de água. Após a completa diluição foi adicionado o tartarato de sódio e potássio, em banho maria a 40 °C, e o volume completado para 1000 mL com água destilada.

A curva de calibração da atividade enzimática de celulase foi elaborada com diluições de glicose variando de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL. Mediu-se 1,0 mL de cada concentração em um tubo de ensaio ao qual foram adicionados 2,0 mL do reagente de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Foi também elaborado um “branco” contendo 1,0 mL de água destilada e 2,0 mL de DNS. Todos os tubos foram incubados a 95 °C por 5 min e imediatamente após resfriados em banho de gelo fundente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm em cubetas de vidro.

A curva de calibração das hidrolises foi elaborada com concentrações de glicose variando de 1,0 mg/mL a 10,0 mg/mL. O procedimento seguido foi o mesmo descrito acima, porém antes da leitura da absorbância o volume dos tubos foi completado para 25 mL.

APÊNDICE C – CÁLCULOS PARA A HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Porcentagem de Sólidos

A porcentagem de sólidos para a hidrólise enzimática foi calculada considerando a porcentagem de celulose e hemicelulose da biomassa. Abaixo um exemplo do cálculo:

Considerando 22% de celulose e 4% de hemicelulose e 2 g de biomassa pré-tratada em base seca, para a hidrólise com as duas enzimas:

$$\begin{aligned} 2 \text{ g} &\rightarrow 100\% \\ x &\rightarrow 26\% \\ x &= 0,52 \text{ g} \end{aligned}$$

Portanto, considerando 1% de sólidos:

$$\begin{aligned} x &\rightarrow 100\% \\ 0,52 \text{ g} &\rightarrow 1\% \\ x &= 52 \text{ g} \end{aligned}$$

Portanto, para 2 g de biomassa pré-tratada em base seca, considerando celulose e hemicelulose como sólidos de interesse, são necessárias 52 g de solução tampão, descontando a umidade já presente na biomassa. Para este trabalho foi considerada a densidade de 1 g/mL para o tampão.

Quantidade de Enzima

Para o cálculo do volume de enzima celulase, considerando os mesmos 2 g acima, 3 FPU/mL por grama de substrato e atividade de 23 FPU/mL:

$$(0,22 \times 2 \text{ g}) \text{ g} \times 3 \text{ FPU/mLg} = 1,32 \text{ FPU/mL}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ mL} &\rightarrow 23 \text{ FPU/mL} \\ x &\rightarrow 1,32 \text{ FPU/mL} \\ x &= 0,057 \text{ mL} \end{aligned}$$

Portanto, são necessários 0,057 mL de enzima para a hidrólise de 2 g de biomassa, com 22% de celulose, em base seca, com 3 FPU/mL por grama de biomassa.

Para o cálculo da massa de enzima xilanase, considerando os mesmos 2 g acima, 4% de hemicelulose, atividade de 200 U/g, e 3 U/g por grama de substrato:

$$(0,04 \times 2 \text{ g}) \times 3 \text{ U/g} = 0,24 \text{ U/g}$$

$$\begin{aligned} 1 \text{ g} &\rightarrow 200 \text{ U/g} \\ x &\rightarrow 0,24 \text{ U/g} \\ x &= 0,0012 \text{ g} \end{aligned}$$

Portanto, são necessárias 0,0012 g de xilanase para a hidrólise de 2 g de biomassa, com 4% de hemicelulose, em base seca, com 3 U/g por grama de substrato.

APENDICE D – DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Método de Determinação da Atividade da Enzima Celulase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com as orientações da IUPAC (ADNEY e BAKER, 1996; RABELO, 2010), com o objetivo de determinar a atividade da celulase em papel de filtro expressa em FPU/mL de enzima original. Para determinar a atividade enzimática partiu-se de uma diluição 1:20 de enzima e foram realizadas 6 diluições subsequentes, em tampão acetato de sódio, pH 4,8 (Apêndice A). Em cada tubo de teste foram adicionados 1 mL de tampão e 50 mg de papel de filtro enrolado, tomando cuidado para que o papel fosse completamente embebido na solução. Foi feito um tubo de “branco”, para zerar o equipamento, contendo 1 mL de tampão e 1 mL de água. Foram feitos ainda padrões de substrato e enzima, para garantir que não houvesse superestimação dos ART. A montagem de cada tubo está representada na Tabela D.1.

Tabela D.1: Condições Analisadas para a Determinação da Atividade Enzimática da Celulase.

Tubo	Concentração de Enzima (v/v)	Volume de Enzima (mL)	Volume de Tampão (mL)	Substrato (mg)
Teste 1	0,00125	0,5	1,0	50
Teste 2	0,00250	0,5	1,0	50
Teste 3	0,00500	0,5	1,0	50
Teste 4	0,00750	0,5	1,0	50
Teste 5	0,01000	0,5	1,0	50
Teste 6	0,03000	0,5	1,0	50
Branco	0,00000	0,0	1,5	0
PS	0,00000	0,0	1,5	50
PE1	0,00125	0,5	1,0	0
PE2	0,00250	0,5	1,0	0
PE3	0,00500	0,5	1,0	0
PE4	0,00750	0,5	1,0	0
PE5	0,01000	0,5	1,0	0
PE6	0,03000	0,5	1,0	0

PS = padrão de substrato; PE = padrão de enzima.

Para o padrão de substrato foram adicionados 50 mg de papel de filtro enrolado e 1,5 mL de tampão. Aos padrões de enzima foram adicionados 1

mL de tampão. Todos os tubos foram incubados juntos em banho termostático a 50 °C. Após 10 min adicionou-se 0,5 mL de enzima nos tubos teste e padrão de enzima, considerando cada diluição, e a reação de hidrólise correu por 60 min.

Após a hidrólise foram adicionados 2 mL de reagente de DNS a cada tubo e estes foram colocados em banho termostático a 95°C por 5 min. A reação foi parada com banho de gelo fundente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Foram realizadas diluições quando necessário, para que a faixa de absorbância caísse dentro da curva padrão (Apêndice B).

A partir das absorbâncias calculou-se a concentração de glicose em cada um dos tubos, com curva padrão previamente realizada (Apêndice B). Para a celulase 1 FPU é a quantidade de enzima necessária para liberar 2 mg de glicose equivalente, ou seja, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 min de reação. Assim, foi montado um gráfico linear relacionando a concentração de glicose ao logaritmo da diluição de enzima, encontrando-se a concentração que libera exatamente 2 mg de glicose equivalente por mL. A atividade foi calculada com a Equação D.1:

$$FPU/mL = \frac{2,0}{0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \cdot [enzima\ diluída]} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$$
$$FPU/mL = \frac{0,37}{[enzima\ diluída]} \quad (D.1)$$

Estudo da Influência do pH na Atividade da Celulase

Para determinar o pH ótimo da enzima foi repetido o procedimento da atividade enzimática nos pHs 3,6, 4,0, 4,4, 4,6, 4,8, 5,0, 5,2 e 5,6 (tampão acetato de sódio) e 6,0 (tampão citrato fosfato) (Apêndice A) seguindo as condições testadas por Rabelo (2010). A diluição de enzima utilizada foi de 0,03 (v/v).

Estudo da Influência da Temperatura na Atividade da Celulase

Para determinar a temperatura ótima de atuação da enzima foi realizado o mesmo procedimento da atividade enzimática nas temperaturas

de 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C e 70°C seguindo as condições testadas por Rabelo (2010). A diluição de enzima utilizada foi de 0,03 (v/v).

Resultados da Determinação da Atividade da Enzima Celulase

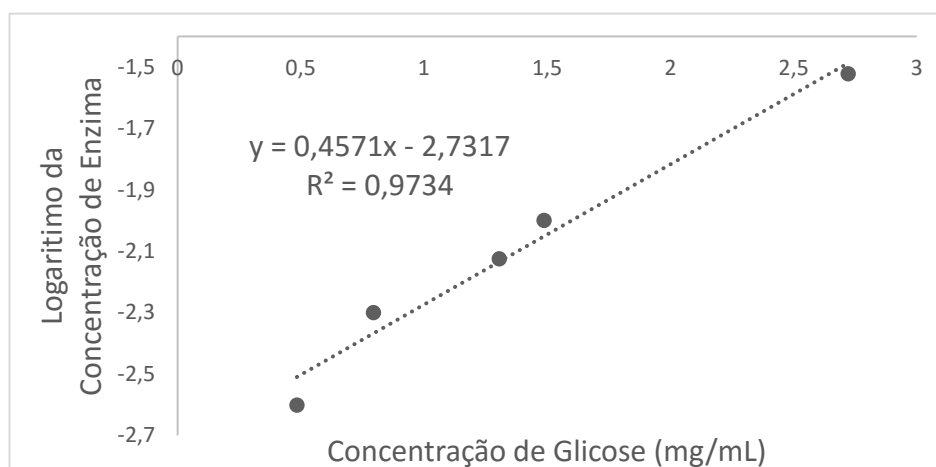
A Tabela D.2 apresenta as quantidades de glicose equivalente liberadas por cada diluição de enzima.

Tabela D.2: Concentração de Glicose Equivalente Liberada por Cada Diluição de Enzima.

Concentração de Enzima (v/v)	Absorbância	Concentração de Glicose (mg/mL)
0,00125	0,563	0,352
0,00250	0,803	0,485
0,00500	0,405	0,796
0,00750	0,714	1,306
0,01000	0,824	1,488
0,03000	0,912	2,723

Com o logaritmo da concentração de enzima e a concentração de glicose plotou-se um gráfico linear, que gerou uma equação para calcular qual valor de concentração de enzima libera exatamente 2 mg de glicose equivalente por mL, em 60 min de reação (Figura D.1).

Figura D.1: Gráfico da Concentração de Glicose Equivalente versus o Logaritmo da Concentração de Enzima Celulase.



Ao plotar o gráfico acima gerou-se a Equação D.2, usada para calcular a concentração de enzima que libera exatamente 2 mg/mL de glicose.

$$\begin{aligned} \log[\text{enzima}] &= (0,4571 \times \text{massa de glicose liberada}) - 2,7317 & \text{(D.2)} \\ \log[\text{enzima}] &= (0,4571 \times 2,0) - 2,7317 = -1,8175 \\ [\text{enzima}] &= 0,015223 \end{aligned}$$

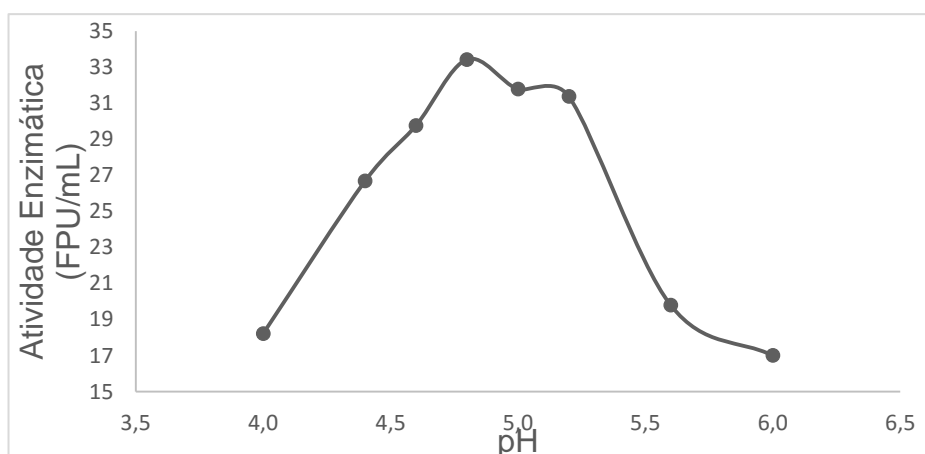
A concentração de enzima calculada foi de 0,015223 v/v, esse valor foi aplicado na Equação D.1 para encontrar a atividade enzimática.

A atividade enzimática foi calculada em 24,30 FPU/mL, Rabelo (2010) encontrou atividade de 68,68 FPU/mL para a mesma enzima. Awan (2013), trabalhando com outra marca de celulase encontrou atividade de 68 FPU/mL. Carvalho (2011) ao avaliar a atividade enzimática de um complexo enzimático de celulases encontrou atividade de 108 FPU/mL.

Resultados do Estudo da Influência do pH na Atividade da Celulase

Para verificar a influência do pH na atividade da celulase, plotou-se um gráfico com os valores de pH e suas respectivas atividades enzimáticas, com o objetivo de encontrar o valor que fornece a maior concentração de glicose, ou seja, ponto ótimo (Figura D.2).

Figura D.2: Gráfico da Atividade Enzimática da Celulase *versus* pH.



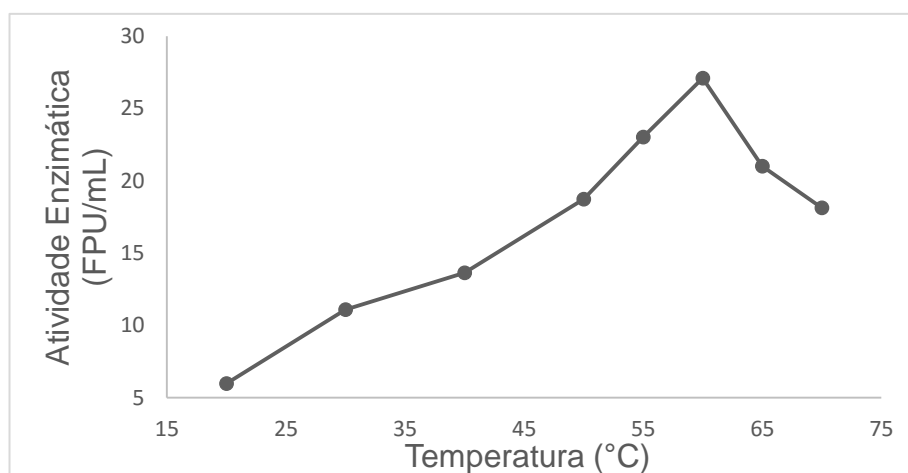
De todos os pHs testado o melhor foi o de 4,8. Porém, não houve diferença significativa entre os pHs 5,2 e 5,4, apresentando uma tendência de subida entre os valores. O mesmo valor ótimo foi encontrado Rabelo (2010)

para a mesma enzima. Pereira (2013) encontrou um valor ótimo de 5,5 para complexo de celulases produzido por *A. niger*.

Resultados do Estudo da influência da Temperatura na Atividade da Celulase

Assim como para o estudo do efeito do pH, realizou-se o estudo da influência da temperatura na atividade da celulase. A Figura D.3 apresenta a relação entre a atividade enzimática e cada uma das temperaturas.

Figura D.3: Gráfico da Atividade Enzimática *versus* Temperatura.



Observa-se pela figura que a temperatura de maior atividade enzimática foi a de 60°C. Rabelo (2010) obteve valor de 50°C para esta mesma enzima. Pereira (2013) encontrou para complexo de celulases de *A. niger* temperatura ótima de 60°C.

Método de Determinação da Atividade da Enzima Xilanase

A atividade enzimática da xilanase foi determinada de acordo com o procedimento da Universidade de New South Whales, Kensington, Austrália (GHOSE e BISARIA, 1987). Este procedimento se baseia na medida da xilose equivalente, pelo reagente de DNS, liberada pela ação da enzima na xilana no tempo de 60 min. Os resultados foram expressos em Unidades/g.

Para que haja uma linearidade nos resultados é preciso que as diluições de enzima liberem entre 100 e 800 µg de xilose equivalente/60 min, preferencialmente de 300 a 800 µg. Para isso foram feitas diluições da enzima. Utilizando-se tampão acetato de sódio, pH 4,8 (Apêndice A), realizou-se os testes a 50 °C, como determina a metodologia seguida. O substrato utilizado foi uma solução de xilana 1% (m/v). A Tabela D.3 apresenta as condições utilizadas em cada amostra analisada.

Tabela D.3: Condições Analisadas para a Determinação da Atividade Enzimática da Xilanase.

Código	Diluição Xilanase (1 mL) (mg/mL)	Solução Xilana 1%	Tampão
1	0,1	1 mL	1 mL
2	0,5	1 mL	1 mL
3	1,0	1 mL	1 mL
4	5,0	1 mL	1 mL
5	10,0	1 mL	1 mL

Para a quantificação da xilanase equivalente foi feita uma curva padrão, a partir de uma solução padrão de xilose de 10 mg/mL. Os componentes desta curva foram os seguintes (Tabela D.4):

Tabela D.4: Montagem da Curva Padrão de Xilose.

Diluição (mg/mL)	Solução Padrão (mL)	Água (mL)	Tampão (mL)
0,0	0,0	2,0	1,0
1,0	0,2	1,8	1,0
2,0	0,4	1,6	1,0
3,0	0,6	1,4	1,0
4,0	0,8	1,2	1,0
5,0	1,0	1,0	1,0

Além dos tubos teste e da curva padrão foram feitos dois padrões, um de enzima, com 1 mL de tampão e um de solução de enzima, em cada diluição, e um de xilana, com 1 mL de tampão. Todos foram incubados juntos e retirados após 60 min. Foram adicionados 3,0 mL de reagente de DNS em cada um dos tubos e incubados em banho termostático a 95°C por 15 min e em seguida colocados em banho de gelo fundente. O tubo sem xilose, da

curva padrão, foi usado como branco para zerar o espectrofotômetro. Todas as amostras foram lidas a 640 nm. Para calcular a atividade enzimática foi feita uma relação com a atividade padrão, em que 217 miliunidades/mL liberam 217 nmoles de xilose equivalente/mL/min.

Estudo da Influência do pH na Atividade da Xilanase

Para avaliar o efeito do pH na atividade enzimática da xilanase foi repetido o procedimento descrito no item 3.2.2.2 para os pHs 3,6, 4,2, 4,8, 5,2 e 5,6. Os valores de pH estudados se basearam nas especificações técnicas do fabricante que indica o pH ótimo entre. A temperatura de 50 °C foi utilizada por ser a indicada na metodologia seguida (GHOSE e BISARIA, 1987).

Estudo da Influência da Temperatura na Atividade da Xilanase

Para determinar o efeito da temperatura na atividade enzimática da xilanase foi repetido o procedimento descrito no item 3.2.2.2 nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, e 70°C, pois o fabricante especifica que a temperatura ótima está entre 50 e 65°C e decidiu-se abrir mais esta faixa para garantir o ponto encontrado. Para todas as temperaturas foi utilizado o pH 4,8 como especificado na metodologia seguida (GHOSE e BISARIA, 1987).

Resultados da Determinação da Atividade da Enzima Xilanase

Para a determinação da atividade enzimática da xilanase, utilizou-se as diluições listadas na Tabela D.3. Após o tempo de incubação dos tubos foi realizada a análise de DNS, com uma alíquota de 1 mL do meio reacional e 2 mL de reagente de DNS. Com os tubos do da curva padrão plotou-se o gráfico que gerou a Equação D.3, que foi utilizada para calcular as concentrações de xilose equivalente nos tubos teste.

$$XE = (5325,1 \times abs) + 141,4 \quad (D.3)$$

XE= xilose equivalente (µg/mL)
abs= absorvância lida na amostra

O cálculo das atividades encontradas para cada uma das diluições foi realizado através da relação que 217 mU/mL liberam 217 nmol de xilose equivalente/mLmin e a massa molecular da xilose é igual a 150,129 g/mol. Os passos seguidos para o cálculo da atividade estão na Tabela D.5.

Tabela D.5: Atividade Enzimática para cada Diluição de Xilanase.

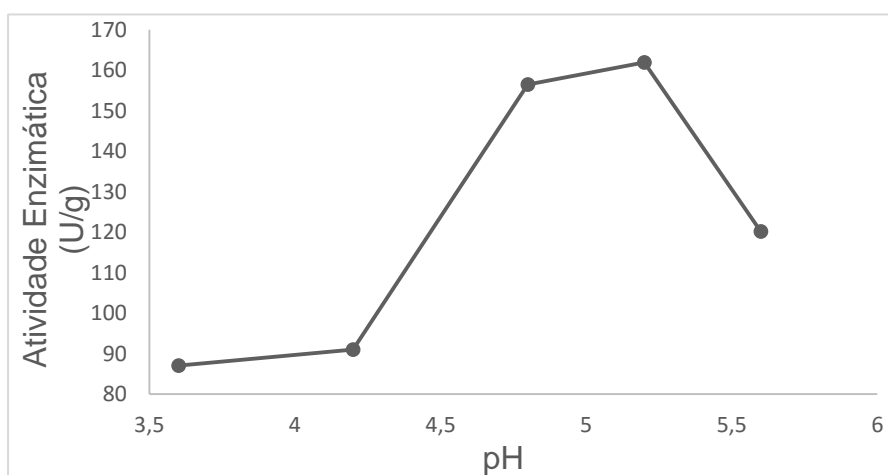
Diluição (mg/mL)	Xilose Equivalente (µg/ml)	Xilose Equivalente (µmol/mL)	Atividade (U/mL de diluição de enzima)	Atividade (U/g de enzima)
0,1	327,209	2,180	0,036	363,25
0,5	652,040	4,343	0,072	144,77
1,0	817,118	5,443	0,091	90,71
5,0	1354,953	9,025	0,150	30,08
10,0	1291,052	8,600	0,143	14,33

Como a metodologia descreve que entre as concentrações de 300 a 800 µg de xilose equivalente a enzima apresenta um comportamento mais linear a atividade enzimática foi calculada com a média aritmética das atividades encontradas para as diluições de enzima de 0,1 mg/mL a 1,0 mg/mL. A atividade enzimática da enzima xilanase foi de 199,58 U/g.

Resultados da Influência do pH na Atividade Enzimática da Xilanase

No estudo Da influência do pH na atividade enzimática verificou-se no pH de 5,2 um ponto de maior atividade dentre os valores estudados conforme ilustrado pela Figura D.4.

Figura D.4: Relação da Atividade Enzimática *versus* o pH.

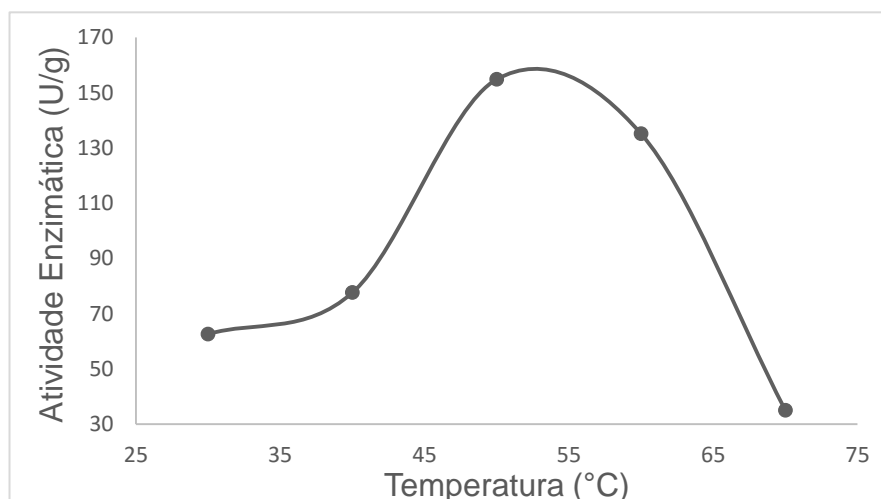


No entanto, pode-se perceber que os valores entre os pHs 4,8 e 5,2 apresentaram uma diferença de apenas 3,4%. Segundo a metodologia seguida o pH ótimo de atuação de enzimas hemicelulolíticas de fungos é de 4.8 (GHOSE e BISARIA, 1987). Como escolheu-se trabalhar com duas enzimas neste trabalho, e encontrou-se o pH ótimo de atuação para a celulase de 4.8, escolheu-se trabalhar com o pH de 4,8 para a hidrólise enzimática.

Resultados do Estudo da Influência da Temperatura na Atividade da Xilanase

Os resultados obtidos para o estudo da influência da temperatura na atividade enzimática da xilanase, estão ilustrados na Figura D.5.

Figura D.5: Gráfico da Atividade Enzimática da Xilanase *versus* a Temperatura.



Pode-se observar que a maior atividade enzimática foi a 50°C segundo a metodologia seguida esta é a temperatura ótima de atuação de xilanases fúngicas (GHOSE e BISARIA, 1987). Esta temperatura foi escolhida como limitante, por ser inferior à temperatura ótima encontrada para a celulase. Deve-se também levar em consideração que a realização de hidrólises na temperatura ótima, por longos períodos, pode levar a uma inativação da enzima (BAILEY e OLLIS, 1986). Portanto, escolheu-se adotar a temperatura de 45°C como temperatura operacional neste trabalho, para proteger a enzima da desnaturação.