



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo de Misturas de Enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, β -glucanase e xilanase, β -glucosidase e Glucoamilase) na Bioconversão do Bagaço da Cana-de-açúcar em Etanol

Rosiane Fernandes Moreira

BELÉM/PARÁ

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo de Misturas de Enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, β -glucanase e xilanase, β -glucosidase e Glucoamilase) na Bioconversão do Bagaço da Cana-de-açúcar em Etanol

Rosiane Fernandes Moreira

Orientador: Prof. Dr. Eng. Nélio Texeira Machado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração Desenvolvimento de Processos.

BELÉM/PARÁ

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFPA

MOREIRA, Rosiane Fernandes, 1973-

Estudo de misturas de enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, β -glucanase e xilanase, β -glucosidase e Glucoamilase) na Bioconversão do bagaço da cana-de-açúcar em etanol/ Rosiane Fernandes Moreira. – PARÁ: UFPA, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Eng. Nélio Texeira Machado

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2015.

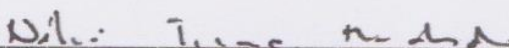
1. 1. Processos químicos. 2. Hidrólise. 3. Cinética enzimática. 4. Celulose. I. Título

CDD 22.ed. 660.2844

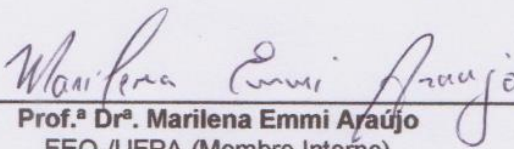
Membros da Banca Examinadora para a Avaliação do Exame de Defesa de Mestrado da candidata **Rosiane Fernandes Moreira** junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

Rosiane Fernandes Moreira

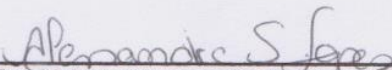
Estudo de Misturas de Enzimas (complexo celulásico, complexo enzimático, xilanase, β -glucanase e xilanase, β -glucosidase e Glucoamilase) na Bioconversão do Bagaço da Cana-de-açúcar em Etanol



Prof. Dr. Nélio Texeira Machado
(Orientador-FEQ/UFPA)



Prof.ª Dr.ª Marilena Emmi Araújo
FEQ-/UFPA (Membro Interno)



Prof.ª Dr.ª Alessandra Santos Lopes
PPGCTA/UFPA (Membro Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora por tudo que me proporcionou até este momento de minha vida.

Ao Prof. Dr. Eng. Nélio Texeira Machado, por aceitar em me orientar e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr.Eng. Químico, Ossalin de Almeida pela confiança, críticas, sugestões, paciência, pela amizade construída, compartilhamento de conhecimento, pelo apoio, espaço e fornecimentos dos reagentes para realização das análises necessárias para a produção deste trabalho.

Ao LPCN-UFPA pelo fornecimento do espectrofotômetro para a realização das análises necessárias para a produção deste trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, pelo desenvolvimento da análise MEV.

RESUMO

Neste trabalho, propôs-se avaliar misturas de enzimas comerciais fornecidas pela Novozymes A/S. As enzimas utilizadas neste trabalho foram: complexo celulásico, xilanase, β -glucosidase, na produção de glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar submetido a tratamento alcalino com solução de hidróxido de sódio na temperatura ambiente, 70°C, 90°C e 120°C. Os rendimentos do BCA em base seca após tratamento com solução de NaOH a 6% (m/v) foram de 30,64% \pm 1,395 (PACTA), 44,00% \pm 1,787 (PAC70), 65,91% \pm 1,096 (PAC90), e 95,25% \pm 1,461 (PAC120), respectivamente. Os teores de cinzas para o BCA foram de 2,05% \pm 0,027 (PACTA), 0,62% \pm 0,013 (PAC70), 0,48% \pm 0,007 (PAC90) e 0,18% \pm 0,008 (PAC120). Os teores de lignina foram de 20,67 \pm 0,603 (PACTA), 13,03 \pm 0,711 (PAC70), 6,05 \pm 0,196 (PAC90) e 5,49 \pm 0,151 (PAC120). Os rendimentos da fermentação alcoólica foram de 33,44(PACTA); 41,56(BCA70); 68,95 (BCA90) e 71,38 (BCA120). Os resultados obtidos sugerem que as taxas de conversão dos resíduos celulósicos em glicose são fortemente dependentes da temperatura no processo de polpação alcalina. Os parâmetros cinéticos obtido nos ajustes cinéticos da hidrólise enzimática do BCA para a PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foram: V_{max} (g/h) igual a 7,20; 5,12; 4,54 e 0,87 respectivamente; K_m (g) igual a 3,6; 2,56; 2,27 e 2,56 respectivamente; K_{cat} (h) igual a 1,44; 1,02; 0,91 e 0,17 respectivamente; K_m/V_{max} igual a 0,5 para todas as amostras e K_{cat}/K_m igual a 0,4 para todas as amostras.

Palavras-chave: celulose, hidrólise enzimática, lignina, polpação alcalina.

ABSTRACT

In this work, it was proposed to evaluate mixtures of commercial enzymes by supplier Novozymes A / S. The enzymes used in this work were: cellulase complex, xylanase, β -glucosidase, enzimático complex, xylanase and β -glucanase and glucoamylase in the glucose production from sugarcane bagasse subjected to treatment with alkali hydroxide solution sodium at room temperature, 70 ° C, 90 ° C and 120 ° C. The BCA yield on a dry basis after treatment with NaOH solution 6 (w / v) were 30.64% \pm 1.395 (PACTA), 44.00% \pm 1.787 (PAC70), 65.91% \pm 1.096 (PAC90), and 95.25% \pm 1.461 (CAP 120), respectively. The ash content for the BCA were 2.05% \pm 0.027 (PACTA), 0.62% \pm 0.013 (PAC70), 0.48% \pm 0.007 (PAC90) and 0.18% \pm 0.008 (PAC120). The lignin contents were 20.67 \pm 0.603 (PACTA), 13.03 \pm 0.711 (PAC70), 6.05 \pm 0.196 (PAC90) and 5.49 \pm 0.151 (PAC120). The results suggest that the conversion rates of cellulosic waste into glucose are strongly dependent on temperature in the alkaline pulping process. The kinetic parameters obtained in kinetic adjustments enzymatic hydrolysis of the BCA for PACTA, PAC70, PAC90 and PAC120 were: V_{max} (g/h) equal to 7.20; 5.12; 4.54 and 0.87 respectively; K_m (g) equal to 3.6; 2.56; 2.27 and 2.56 respectively; K_{cat} (h) equal to 1.44; 1.02; 0.91 and 0.17 respectively; K_m/V_{max} equal to 0.5 for all samples and K_{cat}/K_m of 0.4 for all samples.

Keyword: cellulose, enzymatic hydrolysis, lignin, alkaline pulping.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Esquema da parede celular vegetal..... | 23 |
| Figura 2 - Estrutura das pentoses, hexoses e ácidos urônicos da hemicelulose. | 25 |
| Figura 3 - Principais precursores da lignina. | 27 |
| Figura 4 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose para a obtenção de glicose. | 35 |
| Figura 5 - Velocidade inicial vs concentração do substrato para uma enzima. | 41 |
| Figura 6 - Representação gráfica de Lineweaver-Burk. | 44 |
| Figura 7 - Diagrama de energia adaptado para reações catalisadas e não catalisadas por enzima. | 47 |
| Figura 8 – Fluxograma simplificado do pré-tratamento do BCA. | 50 |
| Figura 9 - Fluxograma simplificado para a produção do etanol do BCA. | 59 |
| Figura 10 – Curva de secagem do BCA. | 61 |
| Figura 11- (A) BCA seco; (B) BCA polpado com NaOH e (C) BCA neutralizado. | 64 |
| Figura 12 – Polpas do BCA após Pré-tratamento Alcalino..... | 65 |
| Figura 13 – Micrografias das amostras: (A) BCA seco <i>in natura</i> e (B) PACTA. | 65 |
| Figura 14 – Micrografias das amostras: (A) PACTA e a (B) PAC70..... | 66 |
| Figura 15 - Micrografias (A) e (B) da amostra PAC90 | 67 |
| Figura 16 – Micrografias (A) e (B) da amostra PAC120. | 67 |
| Figura 17 - Licores do hidrolisado após fermentação alcóolica..... | 71 |
| Figura 18 - Concentração de glicose vs a velocidade..... | 74 |

| | |
|---|----|
| Figura 19 - Representação de Lineweaver-Burk PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120. | 75 |
| Figura 20 - Ordem de Reação das cinéticas enzimáticas da hidrólise do BCA..... | 77 |
| Figura 21 - Taxa Constante de Reação (k) vs Energia de Ativação (Ea). | 79 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição média das fibras do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> ... | 22 |
| Tabela 2 - Preparação das diluições da solução padrão de glicose..... | 55 |
| Tabela 3 - Combinações enzimáticas usadas nos ensaios de hidrólise do BCA, obtidos por tratamento com NaOH a 6% (m/v)..... | 57 |
| Tabela 4 - Teores de cinzas e de lignina do BCA. | 62 |
| Tabela 5 - Rendimento da Polpação do BCA Seco..... | 64 |
| Tabela 6 – Carga enzimática total usada na hidrólise do BCA..... | 68 |
| Tabela 7 – Hidrólise Enzimática (Massa Reduzida) do BCA..... | 69 |
| Tabela 8 – Hidrólise Enzimática (Massa = 10 g) do BCA..... | 70 |
| Tabela 9 – Rendimento do Etanol. | 71 |
| Tabela 10 - Parâmetros da Cinética Enzimática da Hidrólise do BCA. | 72 |
| Tabela 11 - Propriedades Termodinâmicas..... | 78 |

NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|------------------|---|
| ART | Açúcares redutores totais |
| BCA | Bagaço de cana-de-açúcar |
| DNS | Ácido 3,5-dinitrosalicílico |
| E | Enzima |
| ES | Enzima-substrato |
| FPU | Unidade de papel de filtro |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| M | Massa do cadinho |
| M _{AS} | Massa do cadinho contendo amostra seca |
| M _{AU} | Massa do cadinho contendo amostra úmida |
| M _{BS} | Massa do bagaço seco |
| M _C | Massa do cadinho contendo cinzas |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| M _{RS} | Massa do resíduo seco |
| M _{SAP} | Massa seca após polpação |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| nm | Nanometro |
| P | Produto da reação |
| PAC120 | Polpação alcalina 120 °C |
| PAC70 | Polpação alcalina 70 °C |
| PAC90 | Polpação alcalina 90 °C |
| PACTA | Polpação alcalina a temperatura ambiente |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| R | Relação de enzima |
| R ² | Coefficiente de determinação |

| | |
|----------------|----------------------------|
| t | Tempo |
| T | Temperatura em °C |
| V _C | Volume do caldo enzimático |
| V _T | Volume total |
| μm | Micrometro |

SUMÁRIO

| | |
|------------------------------------|------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | x |
| NOMENCLATURAS E SÍMBOLOS | xi |
| SUMÁRIO | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 18 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.2 OBJETIVOS | 19 |
| 1.2.1 Objetivo Geral | 19 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos | 19 |
| 2 REFERÊNCIAL TEÓRICO | 21 |
| 2.1 CANA-DE-AÇÚCAR | 21 |
| 2.2 BAGAÇO DA CANA-DE-AÇUCAR | 21 |
| 2.2.1 Celulose | 23 |
| 2.2.2 Hemicelulose | 24 |
| 2.2.3 Lignina | 26 |
| 2.2.4 Compostos Menores | 28 |
| 2.2.4.1 Extrativos | 28 |
| 2.3 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO | 29 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.4 | ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO..... | 30 |
| 2.5 | TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO..... | 31 |
| 2.6 | ENZIMAS..... | 33 |
| 2.7 | SACARIFICAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA..... | 36 |
| 2.7.1 | Sacarificação | 36 |
| 2.7.2 | Hidrólise Enzimática | 36 |
| 2.8 | FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA..... | 38 |
| 2.9 | CINÉTICA ENZIMÁTICA | 39 |
| 2.9.1 | Equação Michaelis-Menten | 40 |
| 2.9.2 | Representação Gráfica de Lineweaver-Burk | 43 |
| 2.9.3 | Efeito da Temperatura na Velocidade de Reação | 44 |
| 2.9.4 | Teoria do Estado de Transição | 45 |
| 2.9.5 | Ordem da Reação | 47 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.1 | MATERIAIS | 49 |
| 3.1.1 | Enzimas | 49 |
| 3.1.2 | Bagaço de Cana-de-Açúcar | 49 |
| 3.2 | MÉTODOS | 49 |
| 3.2.1 | Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-Açúcar | 49 |
| 3.2.1.1 | Lavagem | 49 |
| 3.2.1.2 | Secagem natural | 50 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.2.1.3 | Secagem forçada..... | 50 |
| 3.2.2 | Caracterização do Bagaço de Cana-de-Açúcar..... | 51 |
| 3.2.2.1 | Moagem..... | 51 |
| 3.2.2.2 | Umidade..... | 51 |
| 3.2.2.3 | Cinzas..... | 51 |
| 3.2.2.4 | Lignina..... | 51 |
| 3.2.3 | Polpação Alcalina..... | 52 |
| 3.2.4 | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)..... | 53 |
| 3.2.5 | Determinação do Potencial Hidrogeniônico..... | 53 |
| 3.2.6 | Determinação da Atividade Enzimática..... | 53 |
| 3.2.7 | Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART)..... | 55 |
| 3.2.7.1 | Solução tampão de citrato de sódio 0,05 mol.L ⁻¹ (pH = 4,8)..... | 55 |
| 3.2.7.2 | Solução de tartarato duplo de sódio e potássio..... | 56 |
| 3.2.7.3 | Reagente DNS..... | 56 |
| 3.2.7.4 | Solução de hidróxido de sódio 2 mol.L ⁻¹ | 56 |
| 3.2.7.5 | Solução padrão de glicose 1 g.L ⁻¹ | 56 |
| 3.2.8 | Hidrólise Enzimática do BCA..... | 57 |
| 3.2.8.1 | Ensaio preliminares de hidrólise do BCA..... | 57 |
| 3.2.9 | Fermentação Alcólica..... | 59 |
| 3.3 | AJUSTES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DO BCA..... | 60 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 61 |
| 4.1 | PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | 61 |
| 4.1.1 | Secagem Natural e Secagem Forçada | 61 |
| 4.2 | TAMANHO MÉDIO DAS FIBRAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | 62 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 62 |
| 4.3.1 | Umidade | 62 |
| 4.3.2 | Cinzas e Ligninas | 62 |
| 4.4 | POLPAÇÃO ALCALINA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 63 |
| 4.5 | MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)..... | 65 |
| 4.6 | ATIVIDADE ENZIMÁTICA | 68 |
| 4.7 | HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR..... | 69 |
| 4.8 | FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA..... | 71 |
| 4.9 | CINÉTICA DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS DO BCA. | 72 |
| 4.9.1 | Equação de Michaelis-Menten | 72 |
| 4.9.2 | Representação de Lineweaver-Burk | 75 |
| 4.9.3 | Ordem da Reação | 76 |
| 4.9.4 | Propriedades Termodinâmicas | 77 |
| 5 | CONSIDERAÇÕES | 81 |
| 6 | REFERÊNCIAS | 83 |
| | APENDICE I - Dados experimentais da curva de secagem do BCA. | 93 |
| | APENDICE II- Dados experimentais de cinzas e lignina total..... | 94 |

| | |
|--|----|
| APENDICE III- Taxas de conversão do processo de hidrólise enzimática do BCA. | 95 |
| APENDICE IV - Propriedades Termodinâmica da hidrólise enzimática do BCA. .. | 96 |
| APENDICE V – Curva de calibração de glicose I, resíduo e probabilidade. | 97 |
| APENDICE VI – Curva de calibração de glicose II, resíduo e probabilidade. | 98 |
| ANEXO I - Descrição de enzimas contidas em Novozymes no kit celulósico enzimático de etanol. | 99 |
| ANEXO II - Atividade da enzima, densidade, pH, temperatura e dosagem recomendada. | 99 |

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de cana-de-açúcar (BCA) que pode ser utilizado para produzir o açúcar, etanol e etc., gerando grandes quantidades de resíduos no setor sucroalcooleiro. Nas últimas décadas, a necessidade por fontes alternativas de energia se tornou uma grande preocupação incitando o crescimento e o desenvolvimento de pesquisas no segmento de energias sustentáveis (SOUZA, 2008).

O resíduo (bagaço de cana-de-açúcar) é uma biomassa lignocelulósica que pode ser transformada em polpa através de processos de pré-tratamento sem a necessidade de aumentar a área de plantio e reduzir os impactos ambientais (ALBARELLI, 2013). Neste sentido, a biomassa lignocelulósica tem grande potencial por ser abundante, ter caráter renovável, baixo custo e oferecer a perspectiva do uso de seus coprodutos (SANTOS & GOUVEIA, 2009). Este resíduo agroindustrial é passível de conversão em açúcares fermentáveis mediante o emprego de tecnologias que se encontram em franco desenvolvimento.

Neste trabalho foi escolhido o processo de hidrólise enzimática com objetivo de avaliar as misturas das enzimas comerciais (complexo celulásico, xilanase, β -glucosidase, complexo enzimático, β -glucanase e xilanase e glucoamilase) cedidas pelo laboratório Novozymes. Utilizando como matéria prima o bagaço de cana-de-açúcar na bioconversão de celulose em glicose para produzir etanol.

Neste trabalho foi realizado o pré-tratamento das amostras do bagaço de cana-de-açúcar que foram obtidas nas feiras livres de Belém-PA. O pré-tratamento consistiu na lavagem, secagem, moagem, armazenagem das amostras secas em sacos plásticos e a polpação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar na temperatura ambiente, a 70°C, 90°C e 120°C. Depois foi realizada a atividade das enzimas para saber a carga enzimática das mesmas para realizar as misturas enzimáticas para serem utilizadas no processo de hidrólise. Segundo GHOSE (1987), uma unidade da atividade enzimática total (FPU) é baseada na liberação de exatamente 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μ mol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação.

Após o processo de hidrólise enzimática foi realizada a fermentação alcóolica dos mostos e em seguida a destilação simples para obtenção do etanol.

Com os resultados dos açúcares redutores totais do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado o estudo cinético pela equação Michaelis-Menten e a representação de Lineweaver – Burk.

Com os resultados dos açúcares redutores totais foi realizado o estudo das propriedades termodinâmicas das reações enzimáticas do processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Os dados experimentais foram trabalhados na planilha Excel para obter os resultados da Energia de Ativação (E_a), Entalpia (ΔH), Entropia (ΔS), Energia livre de Gibbs (ΔG), a constante de equilíbrio (K_{eq}) e a constante (k) de velocidade da reação em cada tempo de reação.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- ◆ Avaliar misturas de enzimas comerciais (complexo celulásico, xilanase, β -glucosidase, β -glucanase e xilanase, complexo enzimático e glucoamilase) na bioconversão do bagaço de cana-de-açúcar para produzir etanol.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Realizar a atividade enzimática das enzimas: complexo cellulase, complexo enzimático, xilanase, β -glucosidase, β -glucanase-xilanase e glucoamilase;
- ◆ Realizar as misturas enzimáticas para serem utilizadas no processo de hidrólise enzimáticas;
- ◆ Realizar polpação alcalina do bagaço de cana-de-açúcar nas temperaturas 28,5 °C (ambiente), a 70 °C, 90 °C e 120 °C;

- ◆ Realizar hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar após polpação alcalina para avaliar a conversão de celulose em glicose;
- ◆ Estudar a cinética enzimática do melhor rendimento do processo de hidrólise pela equação Michaelis-Menten e a representação de Lineweaver - Burk.
- ◆ Realizar a fermentação alcóolica do melhor rendimento do processo de hidrólise.
- ◆ Realizar a destilação simples do melhor rendimento para a obtenção do etanol.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar é cultivada no Brasil desde 1532, trazida por Martim Afonso, o primeiro colonizador português (BNDES & CGEE, 2008). A cana-de-açúcar está classificada: Divisão Manoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Graminales, Família Poaceae, Gênero *Saccharum*, Espécies *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum* (CRONQUIST, 1981). A composição da cana-de-açúcar pode variar em função do tipo de cana, do solo, do clima, da disponibilidade de água e da época na safra, dentre outros aspectos (SOUZA, 2006).

A cana-de-açúcar é oriunda das regiões temperadas quentes e tropicais da Ásia, hoje é cultivada em vários países do mundo, como Brasil, Índia, China, Tailândia, Paquistão, México, Estados Unidos, Colômbia, Cuba, Gana outros países da África e do Caribe. (MATOS, 2011).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, de acordo com os dados do primeiro levantamento da safra 2015/2016, a produção é estimada em 654,6 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Desse total, 46,2% será destinado à produção de açúcar, o que deve gerar 38,7 milhões de toneladas do produto, enquanto 53,8% serão destinadas à produção de etanol, gerando um volume total de 27.669,55 milhões de litros (CONAB, 2015).

2.2 BAGAÇO DA CANA-DE-AÇUCAR

O bagaço de cana-de-açúcar é uma biomassa lignocelulósica que está disponível em grandes quantidades no setor sucroalcooleira e pode ser transformado em polpa por processos de pré-tratamento, onde se pode utilizar reagentes químicos ou por vapor, para abrir as fibras do bagaço de cana-de-açúcar ou de qualquer biomassa, ou processos de hidrólise por enzimas com objetivo de produzir etanol, sem necessidade de incrementos na área de plantio (ALBARELLI, 2013).

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo industrial mais estudado, porque tem sido utilizado durante décadas como combustível, geração de energia elétrica proveniente da combustão da biomassa, por meio de processos termoquímicos ou biológicos (CANDIDO, 2011; EMC, 2013). Cerca de 50% do total do bagaço produzido é utilizado para, geração de vapor, para a produção de energia, como matéria-prima para a fabricação de polpa e produtos de papel (SUN et al., 2004).

Com o avanço das tecnologias de conversão energética, o bagaço de cana-de-açúcar antes resíduo e agora coproduto, a produção de álcool de segunda geração, feito a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, com possibilidade de dobrar a produção de etanol (SILVA et. al., 2010).

Segundo Ribeiro (2013) as fibras do bagaço de cana-de-açúcar apresentam em sua composição média de 50% de umidade, 2% sólidos solúveis em água (Brix), 32 – 50% de celulose, 19 – 25% de hemicelulose, 23 - 32% de lignina e 2% de cinzas. A composição elementar do bagaço de cana-de-açúcar é 44,6% de carbono, 5,8% de hidrogênio, 44,5% de oxigênio, 0,6% de nitrogênio, 0,1% de enxofre e 4,4% de outros elementos (SIMÕES, 2005). Outros constituintes do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição média das fibras do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*

| Componentes | Composição [%] |
|----------------------|----------------|
| Celobiose | 3,34 |
| Glicose | 46,20 |
| Hidroximetilfurfural | 0,30 |
| Xilose | 24,21 |
| Arabinose | 1,70 |
| Furfural | 1,25 |
| Ácido glucurônico | 1,09 |
| Lignina solúvel | 2,61 |
| Lignina insolúvel | 23,66 |
| Cinzas | 1,61 |

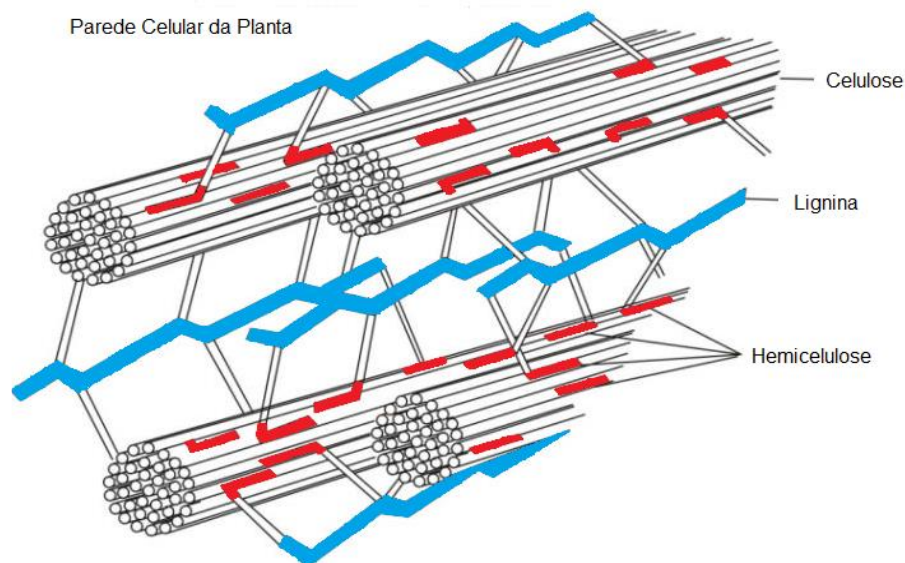
Fonte: CANILHA et al., 2007.

2.2.1 Celulose

A celulose é um dos mais importantes polímeros naturais existentes, a sua estrutura cristalina foi primeiramente descrita por Mark e Meyer, em 1928 (OGEDA & PETRI, 2010). Está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até organismos mais primitivos e seu conteúdo nestas espécies varia de 20 a 99% (RABELO, 2007).

A celulose é o principal componente da parede celular da planta, com estrutura linear e hidrofílica constituída por unidades de glicose as quais estão unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (REGINATTO, 1992). Devido às suas ligações hidrogênio intra e intermoleculares, a celulose apresenta em suas fibras regiões cristalinas e amorfas (MONTEIRO, 2007). A Figura 1 ilustra a parede celular e a distribuição do material lignocelulósico.

Figura 1- Esquema da parede celular vegetal.



Fonte. CORAL, 2009.

O alinhamento paralelo da estrutura cristalina da microfibrila é mantido por interações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de *van der Waals* (DUARTE, 2013) provocando a formação de fibras resistentes. A cristalinidade

juntamente com a presença de lignina são os maiores impedimentos na hidrólise enzimática da celulose (ROCHA et. al., 2012).

As estruturas da celulose podem ser definidas em três níveis organizacionais (ATALLA et al., 1993):

- Estrutura primária, que é definida pela sequência de ligações covalentes, correspondendo a um homopolímero de glicose com ligações β -D (1,4) que fornece certa rigidez as cadeias.
- Estrutura secundária, que descreve a conformação molecular, isto é, a organização espacial das unidades repetitivas, e é caracterizado pelas distâncias das ligações e respectivos ângulos, e pelas ligações de hidrogênio intermoleculares.
- Estrutura terciária, que define a associação das moléculas formando agregados com uma determinada estrutura cristalina.

A partir da estrutura terciária ocorre a formação das microfibrilas, as quais formam as fibrilas que, por sua vez, se ordena para a formação de sucessivas paredes celulares, com uma determinada estrutura cristalina de fibra (D. ALMEIDA, 1988).

Segundo U.S. DOE (2006) as microfibrilas da celulose em plantas superiores mede em torno de 3 a 6 nm de diâmetro, com várias cadeias lineares de celulose obtendo-se polímeros menores após a hidrólise, decompõem-se dando origem a celobiose (dissacarídeo redutor) e a glicose.

A celulose é reciclada de forma muito eficiente pela natureza devido à existência de microorganismos como fungos e bactérias desenvolvendo grupos de enzimas que permitem decompor as ligações glicosídicas e utilizar a glicose libertada contida na celulose, sustentando o equilíbrio de carbono na biosfera (INTECH, 2013).

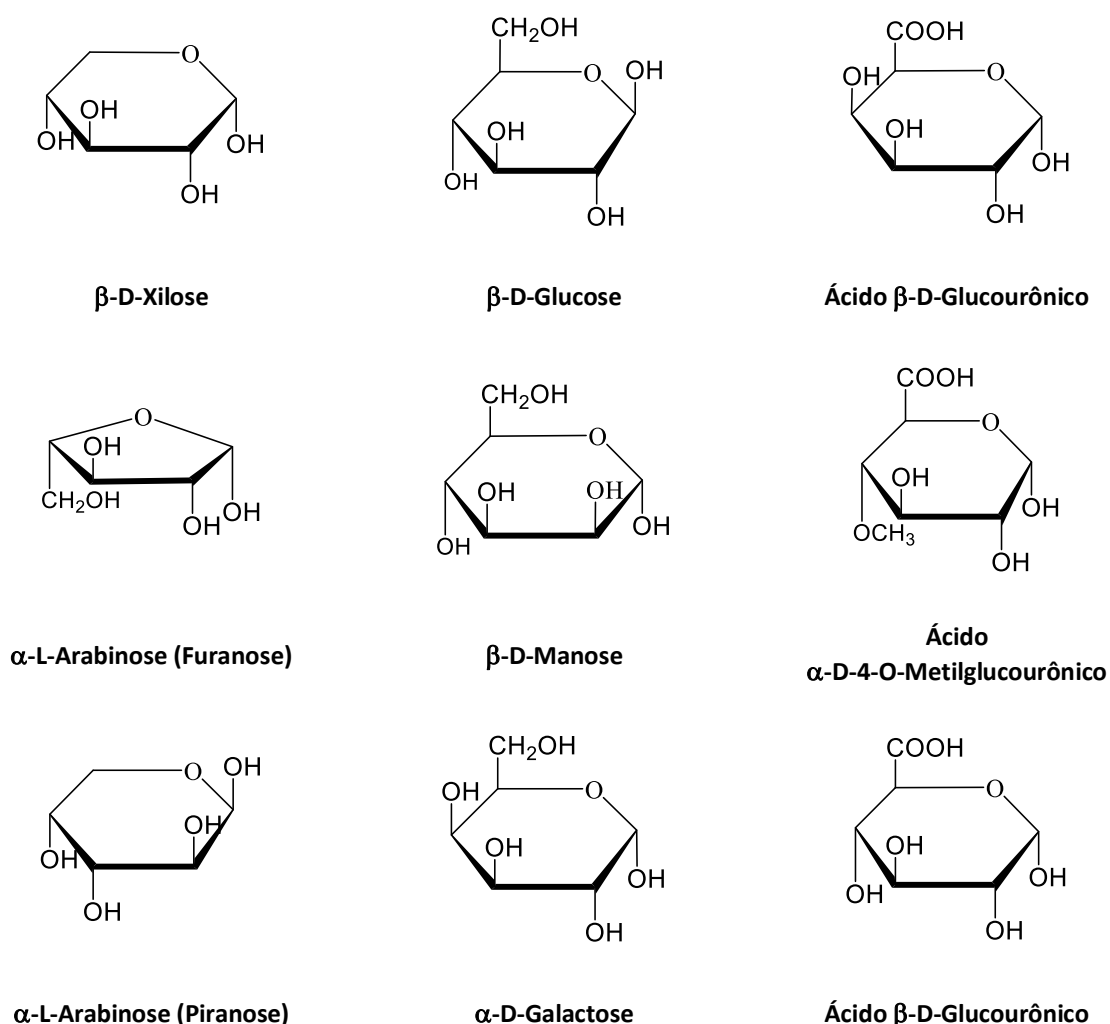
2.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses são polímeros heterogêneos com diferentes unidades de açúcares. Estas são compostas por β -D-glicose, β -D-manose e α -D-galactose; e as pentoses: β -D-xilose e α -L-arabinose (MOUTTA, 2009) e α -D-arabinose, podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos como o ácido β -D-glu-

corônico, β -D-galactourônico e ácido α -D-4-O-metilglucourônico (CARVALHO, 2011).

A hemicelulose pode ser extraída das plantas utilizando soluções diluídas de hidróxido de sódio e são rapidamente hidrolisadas em pentoses e hexoses (MONTEIRO, 2007). Ela é relativamente fácil de hidrolisar devido a sua natureza amorfa e ramificada. As estruturas químicas das pentoses, hexoses e ácidos urônicos são mostrados na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura das pentoses, hexoses e ácidos urônicos da hemicelulose.



Fonte. RIBEIRO, 2013.

Segundo Rosa (2003) as hemiceluloses são causadoras de efeitos superficiais de ligações interfibras e de providenciarem um auxílio nos processos de

inchamento das fibras e de refino da polpa. Ela atua fazendo ligações entre a lignina e as fibras de celulose conferindo rigidez e promovendo a integração da rede celulose-hemicelulose-lignina (CHEMMÉS et. al., 2013).

As hemicelulases são enzimas extracelulares produzidas por fungos, bactérias, leveduras e apresentam vasta aplicação industrial, em especial nas indústrias de celulose e papel, alimentícia, têxtil e, mais recentemente, na produção de etanol (SCHLITTLER, 2012).

2.2.3 Lignina

A lignina é substância complexa, macromoléculas tridimensionais de origem fenilpropanóica. A estrutura da lignina pode ser diferente, dependendo de sua localização no vegetal, são formadas a partir de três principais precursores básicos, que são os álcoois *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico que são comumente encontradas em gramíneas como a cana-de-açúcar (SANTOS, 2008).

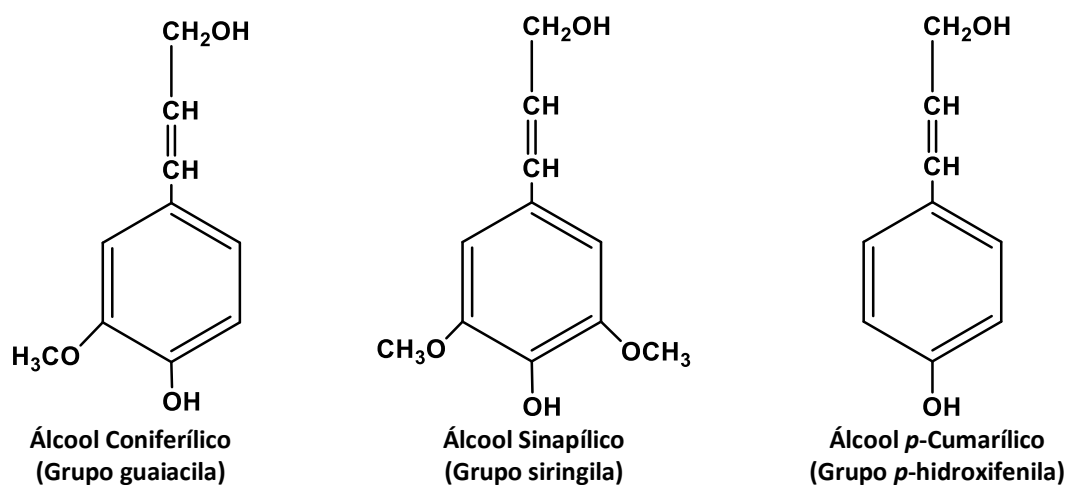
A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Nos vegetais ela tem um importante papel no transporte de água, nutrientes, metabólitos, e a função da lignina dar resistência às fibras de celulose e inibe a hidrólise enzimática dos carboidratos presentes na parede celular, estando intimamente ligada a celulose e a hemicelulose (SALIBA et. al., 2001).

A lignina, como a hemicelulose, normalmente começa a se dissolver em água em torno de 180 °C em condições neutras. A solubilidade da lignina em ambientes ácidos, soluções neutras ou alcalinas depende de seu precursor. A finalidade principal da lignina é dar à planta suporte estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo (ALEIXO, 2012).

A lignina constitui uma barreira significativa na conversão de biomassa em combustíveis através da inibição da enzima no acesso a polissacarídeos e pela liberação de toxinas durante a degradação que inibem o crescimento do organismo durante a fermentação de hidrolisados da parede celular ao etanol (U.S.DOE, 2006).

Os precursores da lignina (Figura 3, pág.27) diferem principalmente no grau de hidroxilação e metilação dos anéis de benzeno, com isso, permitindo várias reações covalentes entre moléculas, formando uma estrutura final muito complexa (INFABIC, 2015).

Figura 3 - Principais precursores da lignina.



Fonte. NAKANISHI, 2010.

A lignina pode ser classificada em (EMMEL, 1999):

- Lignina guaiacila (G): coníferas - que polimeriza o álcool coniferílico;
- Lignina guaiacila-siringila (G-S): folhosas - que copolimeriza o álcool coniferílico + álcool sinapílico;
- Lignina 4-hidroxifenil-guaiacila-siringila (H-G-S): gramíneas - que copolimeriza o álcool coniferílico + álcool sinapílico + álcool *p*-coumarílico;
- Lignina 4-hidroxifenila-guaiacila (H-G): madeira de compressão - polimeriza do álcool coniferílico + álcool *p*-coumarílico.

Nos processos industriais para a produção de bioetanol libera lignina como resíduo sólido do processo enzimático, que tem poder calorífero maior, ideal para gerar bioenergia elétrica (AGRO DBO, 2013). Segundo Coral (2009) a lignina é degradável por alguns microorganismos, com vistas à produção de produtos de alto valor, tais como: ácidos orgânicos, fenóis e vanilina. Mediante processos químicos podem ser produzidos aditivos valiosos para combustíveis.

A lignina pode formar derivados solúveis quando se utiliza solventes orgânicos e ou inorgânicos. Do ponto de vista econômico, a presença de altos teores de ligninas em vegetais representa maior custo de produção ou baixa produtividade.

A aplicação de reagentes inorgânicos tem sido a base para os principais processos industriais de deslignificação (MONTEIRO, 2007).

2.2.4 Compostos Menores

Os constituintes menores incluem compostos orgânicos de diversas funções químicas e inorgânicos. Os materiais lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Os dois primeiros constituintes predominam a região da parede celular enquanto que a lignina se distribui por toda a estrutura apresentando máxima concentração na lamela média (FENGEL & WEGENER, 1989).

No bagaço de cana-de-açúcar, o conteúdo de proteína é baixo, varia entre 1 e 2%. Os constituintes minerais compreendem principalmente potássio e cálcio, que constituem até 50% dos cátions presentes nas cinzas da planta; também são encontrados magnésio, manganês, sódio, fósforo e cloro, assim como sílica. Os ânions mais comuns são carbonatos, fosfatos, silicatos e sulfatos. Estes constituintes são retirados do solo e sua composição depende das condições ambientais sob as quais o vegetal cresce e da localização do mineral na planta (MONTE, 2009).

2.2.4.1 Extrativos

Os extrativos são compostos orgânicos da biomassa vegetal e podem ser extraídos em solvente orgânico ou em água (SANTOS, 2008). Dentre os extrativos mais comuns encontram-se ácidos graxos, ceras, terpenos, óleos essenciais, compostos aromáticos (aldeídos, ácidos, alcoóis, flavanóides, quinonas, taninos) e sacarose residual. Estes compostos existem na forma de monômeros, dímeros e polímeros podendo agir como inibidores nos processos de conversão de biomassa (WOLF, 2011).

2.2.4.2 Cinzas

As cinzas são componentes inorgânicos que exercem importante papel no metabolismo das plantas. São constituídos principalmente por potássio, cálcio, manganês, sulfatos, carbonatos e silicatos (WOLF, 2011). O conteúdo de cinzas no bagaço de cana-de-açúcar varia entre 1,5 e 5 % (MONTE, 2009).

2.3 ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO

Após a crise mundial do petróleo em 1973, o Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi criado pelo Decreto Lei nº 76.593, de 14 de novembro de 1975, para fazer frente aos sucessivos aumentos do preço do petróleo no mercado internacional com o objetivo de garantir o suprimento de etanol no processo de substituição da gasolina (MATOS, 2011).

Na primeira etapa os esforços concentraram-se na produção de álcool etílico anidro para ser acrescentado à gasolina e isso foi de 1975 a 1979. Os primeiros carros movidos totalmente a álcool etílico hidratado só começaram a circular em 1978, após modificações técnicas nos motores (BARROS, 2007).

Este programa, apesar de suas falhas, injetou considerável soma de capital no setor, auxiliando o início do desenvolvimento tecnológico em todos os segmentos econômicos relacionados com a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar (SOARES & ROSSELL, 2007).

Após um período de estagnação de cerca de 15 anos – motivada, essencialmente, pela queda dos preços do petróleo – a produção mundial de etanol voltou a crescer acentuadamente. Um dos fatores que explicam esse crescimento foi, a partir de 2003, a introdução dos veículos com motor flexível no Brasil (ROSA & GARCIA, 2009).

Entre os anos de 2000 e 2009, a produção mundial de etanol combustível cresceu de 16,9 bilhões de litros para mais de 74 bilhões de litros, com destaque para Estados Unidos (53%) e Brasil (33%), seguidos pela União Europeia (5%), China (3%), Tailândia (2%), Canadá (1%) e Índia (1%) (FAO, 2010).

A experiência adquirida pelo Brasil no cultivo de cana-de-açúcar e processamento industrial elevou fortemente os índices de produção pela ampliação da produtividade e otimização do uso da terra. Enquanto a área plantada cresceu

85% desde a safra 90/91, a produção de etanol aumentou em 130% e a de açúcar em 350% (VILLEN, 2009).

De acordo com o primeiro levantamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2015/2016 a produção de etanol total para este período foi estimada em 29,2 bilhões de litros, deste total, 12,73 bilhões de litros deverá ser de etanol anidro e 16,47 bilhões de litros de etanol hidratado (CONAB, 2015).

Segundo Bessa (2011) cada tonelada de cana-de-açúcar moída ou esmagada na unidade industrial se obtém em média 120 kg de açúcar e mais 14 litros de álcool, 100 a 400 kg de torta de filtro, 800 a 1000 litros de vinhaça e 260 kg de bagaço de cana-de-açúcar.

2.4 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

A produção e o uso de etanol como combustível veicular são praticados regularmente no Brasil desde 1931. A cana-de-açúcar representa atualmente a segunda mais importante fonte primária e a principal forma de energia renovável na matriz energética brasileira (BNDES & CGEE, 2008).

A disponibilidade de bagaço de cana-de-açúcar está atrelada a eficiência energética da usina, o excedente de bagaço disponível para hidrólise ou outros usos está entre 7% a 10% do bagaço total (280 kg.t^{-1} , base umida, com 50% de umidade) (CGEE, 2009).

De forma geral, a primeira etapa do processo consiste no pré-tratamento mecânico da matéria-prima, que visa à limpeza e à “quebra” do material, a fim de causar a destruição da sua estrutura celular e torná-la mais acessível aos tratamentos químicos ou biológicos posteriores. A segunda etapa consiste na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose. Para essa etapa, existem diversos tipos de processos com diferentes rendimentos e efeitos distintos sobre a biomassa e consequente impacto nas etapas subsequentes (BNDES & CGEE, 2008).

A biomassa lignocelulósica tem despertado interesse para a produção de etanol de segunda geração (INTECH, 2013), feito a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, com possibilidade de dobrar a produção de etanol. Com o avanço das tecnologias de conversão energética, o bagaço de cana-de-açúcar antes resíduo e agora coproduto (SILVA et. al., 2010).

A engenharia metabólica de *Saccharomyces cerevisiae* foi considerada como uma solução adequada para fermentar a xilose, arabinose e outros açúcares não convencionais (INTECH, 2013). A fermentação dos carbonos da biomassa precisa de uma levedura especial que são produzidas também pela Novozymes (BNDES & CGEE, 2008).

Para chegar ao etanol celulósico a Novozymes cultiva fungos e bactérias para a produção de enzimas. A empresa Novozymes, com a CTC e a Petrobrás produzem enzimas para o processo biológico da hidrólise da celulose (AGRO DBO, 2013) com intuito de aumentar a eficiência das misturas enzimáticas para produção de etanol, assim como a redução de custos para a geração de energia e passar para o estágio do etanol de segunda geração (ABENGOA BIOENERGIA, 2014).

2.5 TIPOS DE PRÉ-TRATAMENTO

Assim como os materiais lignocelulósicos, o bagaço de cana necessita de pré-tratamento visando melhorar sua digestibilidade e facilitar o acesso ao ataque microbiano (KIM et al., 2010). O pré-tratamento do bagaço de cana pode ser considerado a etapa mais crucial na produção de bioetanol, por promover grande impacto sobre todas as outras etapas do processo, influenciando na fermentação, recuperação de produto etc. (MOUTTA, 2009).

Novas alternativas tecnológicas foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos para reduzir o custo dos processos e aumentar a competitividade econômica. Em particular, pré-tratamentos utilizando explosão a vapor (auto-hidrólise), solvólise, liquefação, gaseificação, hidrogenólise, hidrogenação, com AFEX (*Ammonia fiber explosion*); pré-tratamentos oxidativos; ácido sulfúrico diluído e hidróxido de cálcio têm emergido dentre as opções mais promissoras (BAUDEL et al., 2007; ZHOU, 2011).

Os processos de pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos podem ser térmicos, químicos, físicos, biológicos ou uma combinação de todos esses, o que dependerá do grau de separação requerido e do fim proposto (WANDERLEY, 2012). Nos processos químicos temos uma diversidade de ácidos utilizados para o pré-

tratamento de materiais lignocelulósicos. Entre eles, o ácido fosfórico, o ácido sulfúrico, o ácido nítrico, o ácido clorídrico e o ácido fluorídrico (SANTOS, 2010).

Na explosão a vapor, a biomassa triturada é submetida à pressurização e temperatura elevada por tempos curtos de permanência. Em seguida, efetua-se uma descompressão instantânea do sistema, com a finalidade de causar a ruptura nas ligações do material (RIBEIRO, 2013), pois separa os principais componentes da lignina através do rompimento da matriz lignocelulósica, deixando esses compostos acessíveis à hidrólise e posteriormente o caldo será processado para a fermentação.

Atualmente, outros métodos de pré-tratamento para materiais lignocelulósicos estão sendo utilizados, como por exemplo, irradiação de microondas; pré-tratamento com fungos basidiomicetos; explosão a vapor catalisada por ácidos; solubilização com água quente; entre outros. Importante também salientar que cada pré-tratamento exerce o seu próprio efeito sobre as frações de celulose, hemicelulose e lignina do material lignocelulósico (SANTOS, 2010).

Outra técnica emergente para combustíveis é integrar a hidrólise, a liquefação ou pirólise com hidrogenação sobre catalisadores sólidos multifuncionais para converter biomassa lignocelulósica para química fina de valor agregado e bio-hidrocarbonetos (ZHOU, 2011).

O tratamento com dióxido de carbono supercrítico representa uma alternativa interessante, porque ele pode ser operado a temperaturas mais baixas em relação aos tratamentos térmicos (SANTOS et. al., 2011). O processo de extração com fluido supercrítico (SFE) é um processo industrial alternativo para a obtenção de óleos essenciais e outros compostos a partir de matérias-primas vegetais (MARTÍNEZ & MARTÍNEZ, 2008).

Os fluidos supercríticos são substâncias que estejam a temperatura crítica, onde o gás pode ser convertido em líquido (condensação) pelo aumento da pressão e pressão crítica onde o líquido pode ser convertido em gás (vaporização) pelo aumento da temperatura (ALMEIDA, 2014).

O fluido supercrítico tem como principal característica a densidade que pode ser facilmente mudada por variações de pressão e temperatura, sendo possível aperfeiçoar a seletividade da extração (ALMEIDA, 2014). Para compreender melhor os efeitos do processo e os fenômenos que ocorre na extração de fluido supercrítico

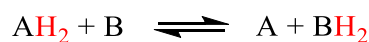
(SFE), devem ser vistos em estudos de equilíbrio de fases termodinâmico (BRUNNER, 2014).

2.6 ENZIMAS

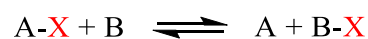
Enzimas são proteínas, polímeros de cadeia longa com aminoácidos sucessivamente ligados uns aos outros através de ligações peptídicas em uma sequência determinada geneticamente, que apresentam atividade catalítica. As enzimas são catalisadores das reações bioquímicas, isto é, atuam tornando possível uma nova reação com energia de ativação menor (NC-IUBMB, 2015).

A eficiência das enzimas como catalisadores é medida pelo número de transformações moleculares, que é explicada pelo número de moléculas de substrato que uma enzima converte por unidade de tempo. As enzimas podem ser classificadas de acordo com vários critérios. O mais importante foi estabelecido pela União Internacional de Bioquímica Biologia Molecular (NC-IUBMB, 2015) em seis classes:

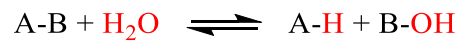
- **Classe 1** - Oxido-redutases, nome genérico para enzimas que catalisam reações em que uma molécula é oxidada enquanto a outra é reduzida (desidrogenases, redutases, oxidases e peroxidases).



- **Classe 2** - Transferases, enzimas que catalisam reações de transferência de grupamentos funcionais como grupos amina, fosfato, acil, carboxil, etc (quinases, transcarboxilases e aminotransferases).



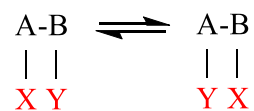
- **Classe 3** - Hidrolases, enzimas que catalisam reações de hidrólise de ligação covalente (amilase, urease, pepsina, tripsina, quimotripsina e várias peptidases e esterases).



- **Classe 4** - Liases, enzimas que catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico (dehidratases, descarboxilases e fumarases).



- **Classe 5** - Isomerases, enzimas que catalisam reações de interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos (epimerases).



- **Classe 6** - Ligases, enzimas que catalisam reações de formação e novas moléculas a partir da ligação entre duas já existentes, sempre à custa de energia (ATP) (sintetases).



Celulases são enzimas responsáveis pela degradação da celulose, principal composto presente nas células vegetais. No caso das celulases, três enzimas fazem parte desse grupo, elas recebem os nomes de endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases (PHILIPPINI, 2012). As celulases são um complexo enzimático, cujas enzimas atuam sinergicamente (WOOD, 1979).

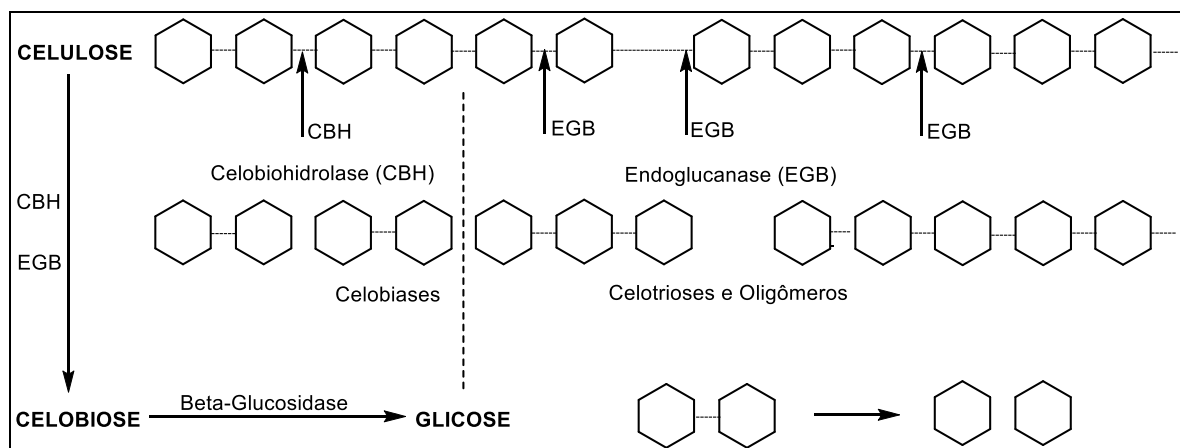
As endoglucanases agem na região interna da fibra de celulose e liberam compostos menores formados por poucas unidades de glicose, os chamados oligossacarídeos (açúcares pequenos). As exoglucanases agem nas extremidades das fibras de celulose e liberam unidades de glicose (livres) ou celobiose, que permite a hidrólise da celulose na região cristalina, formados por duas unidades de glicose (WOOLEY et. al., 1999).

As β -glucosidase quebram a ligação química existente entre as duas unidades de glicose que formam a celbiose permitindo a hidrólise da celodextrina solúvel, liberando unidades de glicose (livres) (DROGUETT, 2012). A glicose é um precursor versátil, capaz de suprir uma gama de intermediários metabólicos que são os materiais primários para as reações biossintéticas (NELSON & COX, 2002).

As endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) clivam as cadeias de celulose em posições aleatórias dentro das próprias cadeias, atuando majoritariamente em porções amorfas; exoglucanases ou celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91), degradam eficazmente as regiões cristalinas da celulose mediante a clivagem de dímeros de celbiose nas extremidades (reduzora ou não-reduzora) das cadeias celulósicas de forma contínua (LEE & MOON., 2003).

A celbiose é posteriormente convertida à glicose pela β -glucosidase (E.C. 3.2.1.21) minimizando a ação inibitória que a presença de celbiose exerce sobre as atividades endo e exo (HENRISSAT, 1994; LYND et al., 2002). A Figura 4 ilustra a ação catalítica das celulases sobre a celulose.

Figura 4 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose para a obtenção de glicose.



Fonte. HENRISSAT, 1994.

Segundo Castro & Pereira Jr. (2010), enzimas celulolíticas podem ser influenciadas por outras moléculas, especialmente metais, seja sofrendo efeitos inibitórios ou indutores das celulases. Dentre os íons que inibem mais frequentemente as celulases são Hg^{+2} , Cu^{+2} , Ag^{+} e Zn^{2+} , chegando a provocar até a

perda total da atividade catalítica em concentrações baixas (2 mM). A maioria das enzimas necessita de moléculas, essenciais à sua atividade que são denominadas coenzimas e cofatores (MOTTA, 2011).

2.7 SACARIFICAÇÃO E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

2.7.1 Sacarificação

A sacarificação é a fase em que as moléculas de celulose são quebradas em unidades básicas de glicose através dos processos de hidrólise ácida ou hidrólise enzimática. Os processos com ácidos apresentam bons rendimentos em baixas temperaturas, mas apresenta desvantagens devido à corrosão do equipamento e da utilização de energia na recuperação de ácidos (DROGUETT, 2012).

No processo de sacarificação, os polissacarídeos são quebrados em moléculas de monossacarídeos, mediante a adição de água (CORAL, 2009). As fibras se achatam, desfibrilam e se rompem, aumentando os seus pontos de contato e as áreas superficiais, o que favorece a ligação por coesão (ROSA, 2003).

2.7.2 Hidrólise Enzimática

Para produzir etanol a partir da biomassa lignocelulósica faz-se necessário um processo de hidrólise para transformar as cadeias de celulose e hemiceluloses, em hexoses e pentoses, respectivamente (NETO, 2008).

Comparativamente à rota química, a rota enzimática se apresenta como uma alternativa mais adequada à produção de etanol a partir do bagaço de cana, em virtude da maior possibilidade em se obter elevados rendimentos glicosídicos (SILVA & GOUVEIA, 2008), reduzindo subprodutos indesejáveis obtidos na reação, conseqüentemente, diminuindo os custos de separação dos produtos (SEGEL, 1975).

A hidrólise enzimática da celulose consiste em algumas etapas como a adsorção da celulase para a superfície da celulose, a biodegradação da celulose para açúcares fermentáveis (CONVERSE et al., 1988). A hidrólise enzimática da celulose para obtenção de monossacarídeos onde se tem altos rendimentos fermentáveis sem formação de inibidores e a não degradação da glicose que é

realizada a temperaturas brandas, em torno de 50 °C e pH de 4,8 para disponibilizar a celulose ao ataque enzimático; a fermentação e destilação.

Diversas características da biomassa são consideradas importantes para efetuar a hidrólise enzimática: quantidade de lignina, presença de grupos acetil, cristalinidade da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial/poros da fibra de celulose, e tamanho de partícula (SEWALT et al., 1997). Para as características das enzimas, temos desativação, inibição, obstrução, acúmulo e processabilidade imperfeita as quais são frequentemente associadas com desaceleração da hidrólise (ZHANG, 2004; XU, 2007).

A celulose é composta por partes cristalinas e amorfas. A parte amorfa, é mais suscetível à hidrólise enzimática, devido a sua maior área superficial, do que a forma ordenada ou cristalina. A celulose cristalina, por apresentar uma região bastante organizada, possui grandes quantidades de ligações de hidrogênio, o que dificulta o processo de hidrólise. Cada tipo de celulase ataca preferencialmente uma região específica da celulose (O'DWYER et al., 2007).

Em estudos com celulose pura, as regiões amorfas apresentaram degradação por enzimas fúngicas, de 5 a 10 vezes mais rápida do que as celulosas altamente cristalinas. Isto sugere que as altas velocidades iniciais são devidas à hidrólise preferencial das regiões amorfas, mais facilmente degradadas, e essa velocidade diminui assim que essas enzimas encontram regiões cristalinas mais recalcitrantes (O'DWYER et al., 2007).

Outro critério importante relacionado com a velocidade de hidrólise envolve a capacidade de adsorção de celulasas sobre a superfície da celulose. A velocidade mostrou-se proporcional à quantidade de enzimas adsorvidas (MEDVE, 1984; FAN & LEE 1980) até um valor crítico de saturação, o qual depende do índice de cristalinidade (HALL et al., 2010). A diferença de reatividade entre a celulose cristalina e amorfa pode ser relacionado à capacidade de adsorção de endoglucanases em ambos os tipos de substrato (KLYOSOV, 1986).

O grau de cristalinidade da celulose influencia a adsorção a uma dada concentração de proteína, sendo que a constante de adsorção máxima se mostrou elevada em índices de baixa cristalinidade (LEE et al., 1982). O mesmo estudo concluiu que a ligação eficaz foi o parâmetro limitante com relação à taxa de

hidrólise no caso da celulose com baixo grau de cristalinidade, apesar de uma alta constante de adsorção.

Hidrólise de celulose requer ações de sinergismo de várias celulasas em um sistema de reação heterogênea, e esse fato determina que o mecanismo dessa reação seja altamente complexo. Sinergismo, geralmente, é definido como o aumento da atividade de uma mistura de enzimas comparada com a soma das atividades das enzimas individuais (GAN et al., 2003; ZHANG & LYND, 2004).

2.8 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

A fermentação alcoólica é um processo biológico no qual, açúcares como a glicose, frutose e sacarose são convertidas em energia celular com produção de etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos. Louis Pasteur (1857) atribuiu a seres vivos (leveduras) como agentes causais da fermentação alcoólica. De acordo com Pasteur, 100 partes de sacarose proporcionam 105,4 partes de açúcar invertido, que, por sua vez, produzem 51,1 partes de etanol, 49,4 partes de gás carbônico, 3,2 partes de glicerol, 0,7 parte de ácido succínico e uma parte de outras substâncias (RACKER, 1974).

Em 1897, Eduard Buchner provou que a fermentação era promovida por moléculas que continuavam funcionando mesmo quando removidas das células e Frederick W. Kühne denominou tais moléculas de enzimas (NELSON & COX, 2002).

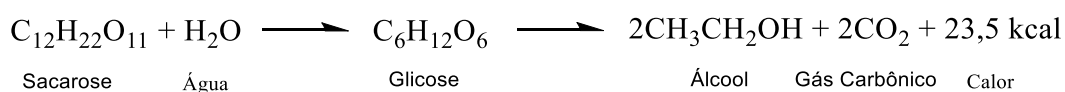
A grande descoberta de Chaim Weizmann em 1910 foi que impulsionou o campo das fermentações industriais, pois ele descobriu a bactéria *Clostridium acetobutyricum* que fermenta o amido em butanol e acetona, ricos em carboidratos e de obtenção fácil e baixo custo, são fornecidos a uma cultura pura de um microorganismo específico, o qual fermenta a referida matéria prima em um produto de grande valor comercial (NELSON & COX, 2002).

Para ser eficaz a conversão do substrato deve minimizar a formação de subprodutos durante a fermentação que depende de uma série de fatores como o tipo de matéria-prima, a linhagem de levedura empregada e o processo de fabricação de etanol (ROSSELL et al., 1988). A temperatura baixa utilizada no processo de fermentação é extremamente importante, pois permite obter bom

rendimento do produto formado e também minimiza a perda por evaporação (BACH, 2012).

O processo de fermentação do mosto ocorre em tanques denominados dornas de fermentação pelo processo de Melle-Boinot, cuja característica principal é a recuperação das leveduras do vinho mediante sua centrifugação, que envolve a recuperação das leveduras e seu reuso no processo, após tratamento e depois de passar por outros processos a obtenção do álcool hidratado (MATOS, 2011).

O processo fermentativo segue a reação de Gay-Lussac:



O caldo da cana, é a principal matéria-prima utilizada em escala industrial para a produção do etanol no Brasil, apresenta rendimento perto de 80 L de etanol por tonelada de cana-de-açúcar (ANDRIETTA et al., 2006). Para produzir um quilograma de etanol são necessários 30,1 kg de cana-de-açúcar (LUO et al., 2008).

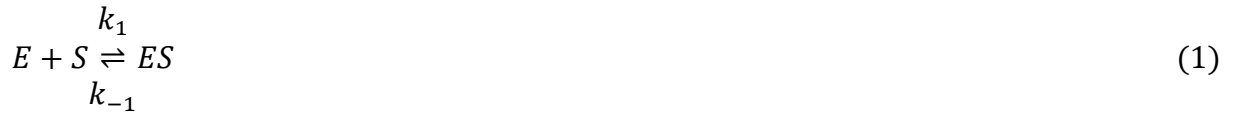
Para cada 100 g de glicose, são produzidos (estequiometricamente), 51,11 g de álcool ou 64 mL. Na prática, para cada 100 g de glicose, são obtidos aproximadamente 48,5 g de etanol (61 mL de etanol a 15 °C). Isto porque 5% do açúcar são reservados para o crescimento celular e para a formação dos subprodutos da fermentação, como glicerol, ácido succínico, etc. (MENEZES, 1980).

O etanol representa o produto principal da fermentação alcoólica e pode alcançar concentrações de 12 a 14% v/v em fermentação normal. O gás carbônico, segundo produto da fermentação alcoólica, tem um rendimento de 0,4 a 0,5 gramas de CO₂ por grama de açúcar degradado (consumido) (BARRE et al., 2004).

2.9 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Em 1913 a teoria geral da ação das enzimas foi expandida por Leonor Michaelis e Maud Menten. Eles postularam que inicialmente a enzima se combina reversivelmente com o substrato para formar o complexo enzima-substrato (ES), em uma etapa relativamente rápida (Equação 1) e uma etapa mais lenta (Equação 2)

que limita a velocidade da reação enzimática, o complexo se quebra liberando a enzima livre (E) e o produto da reação (P) (NELSON & COX, 2002):



Onde, k_1 , k_{-1} , k_2 e k_{-2} são as constantes cinéticas das reações.

Os parâmetros cinéticos são usados para comparar as atividades das enzimas através do aumento ou redução da velocidade da reação (NELSON & COX, 2002). A velocidade de uma reação enzimática é influenciada por diversos fatores, tais como pH, temperatura, pressão, concentração de substrato, concentração de produto, concentração de enzimas, entre outros (GAMBARATO, 2010).

É importante distinguir entre a equação de Michaelis-Menten e o mecanismo cinético específico em que se baseia. À medida que a concentração aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumenta de uma forma hiperbólica, aproximando-se de uma velocidade máxima (V_{max}) característica, na qual praticamente toda enzima está na forma do complexo ES (NELSON & COX, 2002).

2.9.1 Equação Michaelis-Menten

A concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis-Menten (K_m), ou seja, a concentração do substrato em que a metade dos sítios ativos da enzima está preenchida por moléculas do substrato. (CHANG, 2008).

A equação de Michaelis-Menten (Equação 3) relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração de substrato e a V_{max} pela constante K_m é conhecida como a constante de Michaelis-Menten para a reação. Em condições de saturação, a velocidade limite de uma reação catalisada

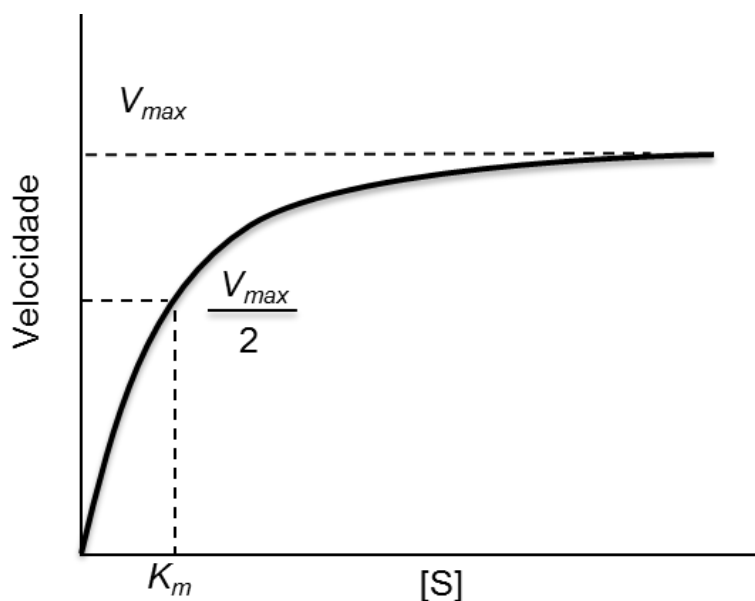
enzimaticamente é descrita pela constante K_{cat} também chamada número de renovação (NELSON & COX, 2002).

O K_{cat} é o número de moléculas de substrato que é convertido a produto por unidade de tempo quando a enzima está totalmente saturada com o substrato, variando entre 1 e 10^5 s^{-1} , sob condições fisiológicas (CHANG, 2008).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

O valor de K_m é muito variável, para a maioria das enzimas, ela depende do tipo de substrato e em condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica, e de outras condições da reação. No entanto, ele situa-se geralmente entre 10^{-1} M e 10^{-7} M (VANNICE, 2005). A Figura 5 ilustra a velocidade inicial *versus* concentração do substrato para uma enzima.

Figura 5 - Velocidade inicial vs concentração do substrato para uma enzima.



Fonte. MARANGONI, 2003.

A constante de dissociação de equilíbrio para o complexo ES (K_s) é uma medida da afinidade de enzima para o substrato que corresponde ao substrato de concentração de $\frac{1}{2} V_{max}$. É importante lembrar que K_m é igual K_s apenas quando a

ruptura do complexo ES ocorre muito mais lentamente do que a ligação do substrato para a enzima, ou seja, quando $k_{-1} \gg k_2$ (MARANGONI, 2003).

A cinética foi introduzida para estudar as etapas de uma reação enzimática e os parâmetros experimentais mais importantes fornecidos pela cinética de estado estacionário que são o K_{cat} e o K_{cat}/K_m (NELSON & COX, 2002). O conhecimento da concentração de enzima permite uma boa medida de eficiência catalítica da relação k_{cat}/K_m e de V_{max}/K_m (MARANGONI, 2003). O parâmetro de k_{cat}/K_m é a constante de velocidade de segunda ordem para a reação de um substrato com uma enzima para produzir o produto (FREY & HEGEMAN, 2007).

O limite sobre o valor de k_{cat}/K_m é ditada por k_1 . Este é controlado unicamente pela taxa de difusão do substrato ao sitio ativo da enzima. Esta, por sua vez, está relacionada com a viscosidade do solvente. Isso limita o valor de k_1 de $10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (MARANGONI, 2003).

No modelo de equilíbrio de Michaelis-Menten, o passo de ligação ao substrato é assumido para ser rápido em relação à taxa de decomposição do complexo ES. Portanto, a reação de ligação de substrato é considerada no equilíbrio (MARANGONI, 2003).

O principal pressuposto na aproximação do estado estacionário é de que a concentração do complexo ES se mantém constante no tempo, isto é, $d[ES]/dt = 0$. Assim, as equações diferenciais (Equação 4 - 7) descrevem as mudanças na concentração do complexo ES no tempo igual a zero (MARANGONI, 2003):

$$\frac{dES}{dt} = k_1[E][S] - [ES](k_{-1} + k_2) = 0 \quad (4)$$

$$\frac{dS}{dt} = k_1[ES] - k_{-1}[E][S] = 0 \quad (5)$$

$$\frac{dE}{dt} = [ES](k_{-1} + k_2) - k_1[E][S] = 0 \quad (6)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2[ES] = 0 \quad (7)$$

Rearranjo da Equação 4, obtemos uma expressão para a constante de Michaelis (K_m):

$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (8)$$

A constante de Michaelis K_m corresponde à concentração do substrato:

$$\text{Para } [S] = K_m: v = \frac{V_{max}}{2} \quad (9)$$

$$\text{Para } [S] \ll K_m: v = \frac{V_{max}}{K_m} S \quad (10)$$

$$\text{Para } [S] \gg K_m: v = V_{max} = k_2 S \quad (11)$$

Como afirmado anteriormente, o passo limitante da velocidade de uma reação catalisada por enzima é a quebra do complexo ES. A velocidade de uma reação catalisada por enzima pode assim ser expressa como (MARANGONI, 2003):

$$v = k_{cat}[ES] \quad (12)$$

2.9.2 Representação Gráfica de Lineweaver-Burk

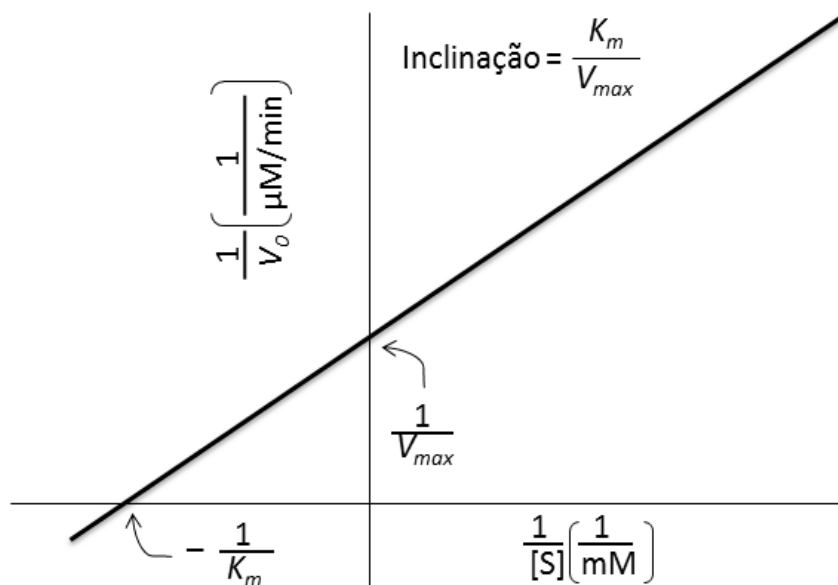
A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em equações que são mais uteis no tratamento gráfico dos dados cinéticos experimentais. A linearização da equação de Michaelis-Menten é uma representação dos duplos recíprocos, também chamada representação de Lineweaver–Burk (Equação 13) (MARANGONI, 2003).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (13)$$

A representação gráfica da recíproca da velocidade inicial ($1/V_0$) *versus* a recíproca da concentração inicial ($1/[S]$), fornece uma linha reta com inclinação K_m/V_{max} (coeficiente angular) em um gráfico duplo recíproco de Lineweaver–Burk. O ponto onde essa linha intercepta a ordenada é igual a $1/V_{max}$ (coeficiente linear), o ponto de intersecção na abscissa é igual a $-1/K_m$ (Figura 6, pág.44).

O método gráfico permite calcular V_{max} e K_m pela medida da inclinação e do intercepto. O valor do ponto de intercepção entre a reta e o eixo x é uma extrapolação de dados experimentais obtidos em laboratório (MARANGONI, 2003; FREY & HEGEMAN, 2007; SCHMIDELL et. al., 2001).

Figura 6 - Representação gráfica de Lineweaver-Burk.



Fonte. NELSON & COX, 2002.

2.9.3 Efeito da Temperatura na Velocidade de Reação

Em reações catalisadas por enzimas, a molécula de enzima deve estar em uma conformação específica para reagir com a molécula de substrato. Quando a enzima está no estado inativo, a velocidade é aumentada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima na qual a enzima opera com a máxima eficiência (CHANG, 2008).

“Em 1889, Arrhenius descobriu que a dependência com a temperatura de muitas reações poderia ser explicada pela seguinte equação” (CHANG, 2008):

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (14)$$

Onde, k é a constante de velocidade, A é o fator de frequência de colisões entre as moléculas de reagentes, E_a é a energia de ativação ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta (SAURO, 2011).

Energia de ativação é a quantidade de energia mínima necessária para começar a reação química. O fator $\exp(-E_a/RT)$ representa a fração de colisões moleculares que têm energia igual ou maior que a energia de ativação. A variação predominante da temperatura é abrangida pelo termo exponencial. Tornando-se o logaritmo natural da Equação 15 (SAURO, 2011), obtemos:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (15)$$

2.9.4 Teoria do Estado de Transição

A teoria do estado de transição ou teoria do complexo ativado foi desenvolvida pelo químico americano Henry Eyring com o propósito de proporcionar maior discernimento dos detalhes de uma reação na escala molecular. Essa teoria permite calcular a constante de velocidade (k) (CHANG, 2008).

A constante de velocidade pode ser relacionada às propriedades termodinâmicas de uma reação. Da termodinâmica sabemos que (CHANG, 2008).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln k \quad (16)$$

Onde, ΔG° é a energia de Gibbs molar-padrão de ativação.

A variação de energia livre no estado padrão molar de uma reação (ΔG°) é uma função da constante de equilíbrio (k_{eq}) e está relacionada com alterações na entalpia molar padrão de estado (ΔH°) e entropia (ΔS°), tal como descrito pela Equação 17 de Gibbs-Helmholtz (MARANGONI, 2003).

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (17)$$

A entalpia molar padrão de estado (ΔH°), está intimamente relacionada à facilidade de quebra e formação de ligação na geração do complexo ativado. Quanto mais baixo o valor de ΔH° , mais rápida a velocidade (CHANG, 2008).

A equação de van't Hoff (Equação 18) é utilizada para a determinação do ΔH° de uma reação através da representação gráfica $\ln k$ contra $1/T$. O declive da linha resultante corresponde a $-\Delta H^\circ/R$. Também é possível determinar a ΔS° da reação da intercepção-y, o que corresponde a $\Delta S^\circ/R$. É importante salientar que este tratamento só se aplica nos casos em que as capacidades de calor dos reagentes e produtos são iguais e independentes da temperatura (MARANGONI, 2003).

$$\frac{d(\ln k)}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad (18)$$

As enzimas não afetam a energia livre de Gibbs (ΔG°) ou a constante de equilíbrio (K_{eq}) de uma reação. Elas simplesmente aceleram a velocidade com a qual a reação alcança o equilíbrio. Na Figura 7 ilustra as comparações dos perfis energéticos das reações catalisadas e não catalisadas por enzimas para a reação (MOTTA, 2011):

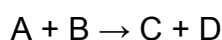
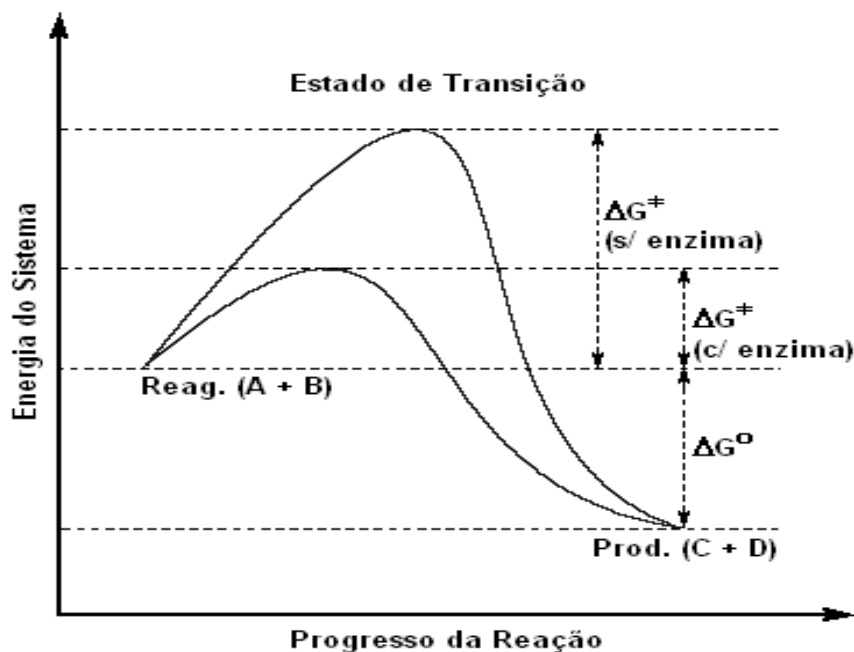


Figura 7 - Diagrama de energia adaptado para reações catalisadas e não catalisadas por enzima.



Fonte. MOTTA, 2011.

2.9.5 Ordem da Reação

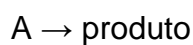
“A ordem de uma reação é definida como sendo a soma dos expoentes dos termos de concentração que aparecem na equação cinética de uma reação química” que serve para determinar a lei da velocidade que melhor se ajusta aos dados experimentais (FOGLER, 2009).

A velocidade de uma reação química depende da temperatura, da pressão e da composição do sistema selecionado para o estudo-(FOGLER, 2009).

$$v = f(\text{temperatura, pressão, composição})$$

A constante específica de velocidade de reação (k) é definida como sendo “a variação da concentração de um reagente ou produto na unidade de tempo, em uma reação na qual todos os reagentes se encontram em concentração unitária” (FOGLER, 2009).

A lei de velocidade para uma reação de ordem zero (CHANG, 2008) do tipo:



é dada por

$$\text{velocidade} = \frac{d[A]}{dt} = k[H]^0 = k \quad (19)$$

A quantidade $k(\text{Ms}^{-1})$ é a constante de velocidade de ordem zero. Rearranjando a equação (19), temos:

$$d[A] = -kdt \quad (20)$$

A integração entre $t = 0$ e $t = t$ com concentrações $[A]_0$ e $[A]$ fornece

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d[A] = [A] - [A]_0 = - \int_0^t kdt = -kt \quad (21)$$

Ou

$$[A] = [A]_0 - kt \quad (22)$$

Onde, $[A]$ é a concentração de reagente A no tempo t e $[A]_0$ é a concentração inicial de reagente A em $t = 0$. Para uma reação de ordem zero, um plote de $[A]$ versus tempo produz uma linha reta com inclinação negativa $-k$ (CHANG, 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Enzimas

As enzimas utilizadas neste estudo corresponderam às preparações comerciais (Cellulosic Ethanol Enzyme Kit): (E1) complexo celulásico (NS22086), (E2) xilanase (NS22083); (E3) β -glucosidase (NS22118); (E4) complexo enzimático (NS22119); (E5) β -glucanase e xilanase (NS22002) e (E6) glucoamilase (NS22035), cedidas pela Novozymes S/A (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária-PR, Brasil). As especificações técnicas sobre o produto encontram-se nos Anexos I e II.

3.1.2 Bagaço de Cana-de-Açúcar.

As amostras do bagaço de cana-de-açúcar, 10 kg *in natura*, foram coletadas nas bancas de vendas de caldo de cana de profissionais autônomos (feirantes) das feiras livres na área metropolitana de Belém-PA no mês de Outubro de 2013.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Pré-Tratamento do Bagaço de Cana-de-Açúcar.

3.2.1.1 Lavagem

A preparação da amostra (bagaço de cana-de-açúcar) consistiu de lavagem com água corrente para a retirada do melaço e outras impurezas.

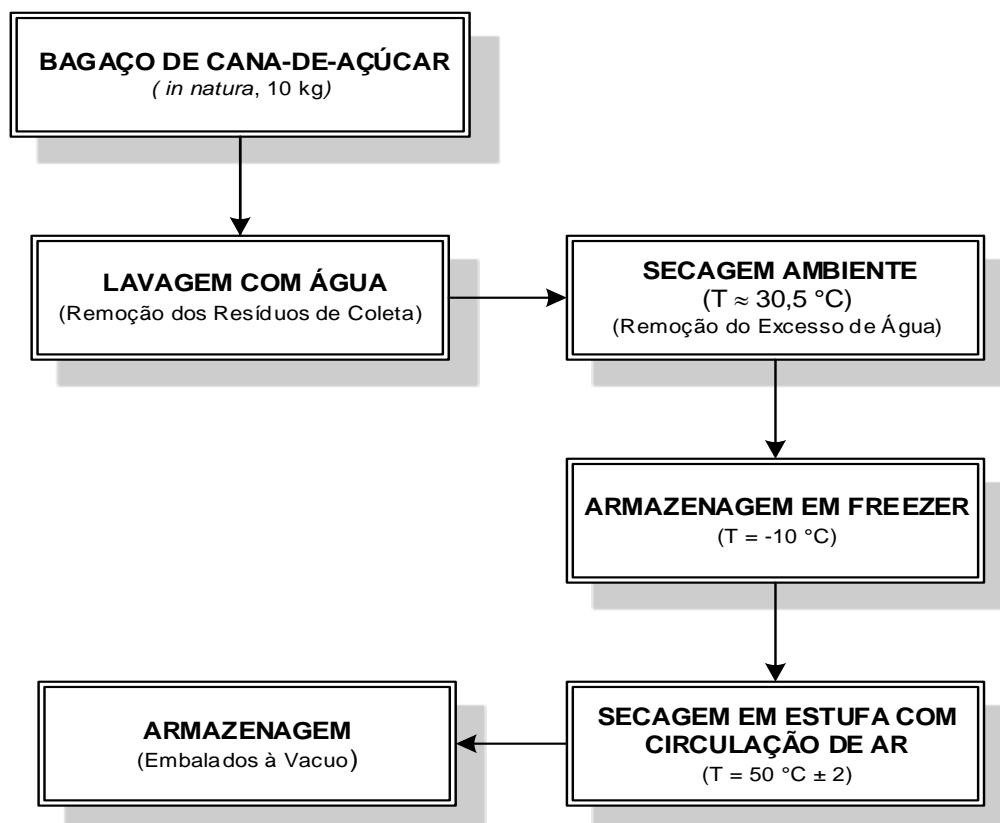
3.2.1.2 Secagem natural

Antes da armazenagem, o bagaço foi seco à temperatura ambiente, durante 72 h para a remoção do excesso de umidade. Após este período, o bagaço foi transferido para sacos plásticos hermeticamente fechados e armazenado em freezer horizontal (ELETROLUX, Cooler H-300) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.1.3 Secagem forçada

Após a secagem a temperatura ambiente e armazenagem em freezer, o bagaço foi submetido a secagem em estufa com circulação de ar (MARCONI-035) a $50 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 7 (sete) dias, com pesagens a cada 24 horas até atingir peso constante e acondicionado em sacos plásticos. A Figura 8 ilustra o fluxograma do pré-tratamento do BCA.

Figura 8 – Fluxograma simplificado do pré-tratamento do BCA.



3.2.2 Caracterização do Bagaço de Cana-de-Açúcar.

3.2.2.1 Moagem

O BCA seco foi triturado em moinho de facas (WILLEY, WILLEY-BT 602) e acondicionado em sacos plásticos para posterior utilização no processo de polpação alcalina.

3.2.2.2 Umidade

O teor de umidade foi determinado conforme o método da *Association of Official Analytical Chemists*, método nº 940.26 (1984) (Equação 23).

$$\% \text{ Umidade} = \frac{M_{AU} - M_{AS}}{M_{AS} - M} \times 100 \quad (23)$$

Onde, M_{AU} é a massa do cadinho contendo amostra úmida (g) e M_{AS} é a massa do cadinho contendo amostra seca (g) e M é a massa do cadinho (g).

3.2.2.3 Cinzas

As cinzas foram determinadas conforme o método da *Association of Official Analytical Chemists*, método nº 964.22 (2000) (Equação 24).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C - M}{M_{AU} - M} \times 100 \quad (24)$$

Onde, M_C é a massa do cadinho contendo cinzas (g).

3.2.2.4 Lignina

Neste trabalho, adotou-se o método de Klason modificado (GOMIDE & DEMUNER, 1986). O método se baseia na extração de polissacarídeos com ácidos

fortes, permanecendo um resíduo que, após lavagem, é determinado gravimetricamente como lignina total (GLASSER & KELLY, 1987; REYES et al., 1997).

O BCA seco e moído (5 g) foi tratado com ácido sulfúrico (10 mL a 72%, v/v), durante 1 h, sob agitação constante. Após este período, a mistura foi diluída para uma concentração de 3% (250 mL). A suspensão resultante foi aquecida a 100 °C sob refluxo durante 3 h. Posteriormente, foi filtrada em cadinho de Gooch previamente tarado. O resíduo foi lavado com água quente 50 mL (5 lavagens), depois foi seco em estufa a 105 °C até peso constante, a percentagem de lignina foi determinada conforme a Equação 25. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\% \text{ Lignina} = \frac{M_{RS}}{M_{BS}} \times 100 \quad (25)$$

Onde, M_{RS} é a massa de resíduo seco (g), M_{BS} é a massa bagaço de cana-de-açúcar seco (g).

3.2.3 Polpação Alcalina

O processo de polpação foi realizado em um Erlenmeyer (3L), contendo 150 g do BCA seco e moído, seguido da adição de 2L de solução de hidróxido de sódio a 6% (m/v). Foram preparados quatro tipos de polpas do BCA, a primeira (PACTA), foi realizada em temperatura ambiente, a segunda e a terceira foram submetidas a aquecimento em estufa a 70 °C (PAC70) e 90 °C (PAC90), durante 24 (vinte e quatro horas), a quarta (PAC120) foi realizada em autoclave na temperatura de 120 °C (explosão a vapor) e pressão de aproximadamente 1,2 - 1,6 atm, durante 1 hora.

Após a reação, as misturas resultantes foram filtradas em funil de placa sinterizada, os resíduos lavados com água corrente e neutralizados com ácido sulfúrico 1:8 (v/v), posteriormente, submetidos à secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

O rendimento foi calculado conforme a Equação (26).

$$Rend. = \frac{M_{SAP}}{M_{BS}} \times 100 \quad (26)$$

Onde, M_{SAP} é a massa de seca após polpação (g), M_{BS} é a massa do bagaço de cana-de-açúcar seco (g).

3.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise das amostras foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade de Engenharia Química do Instituto de Tecnologia da Universidade Federal do Pará, em um Microscópio Eletrônico de Varredura de bancada (HITACHI, TM 3000), operando a 15 kV com sistema acoplado para análise química semi-quantitativa por EDS, com software para análise *line scan* (análise química ao longo de uma linha dentro de uma região selecionada), operando sempre no modo elétrons retroespalhados (BSE – *backscattered secondary electrons*).

3.2.5 Determinação do Potencial Hidrogeniônico

O pH foi determinado por leitura direta em um titulador automático Titroline Plus (SCHOTT, D-85719, Germany), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0.

3.2.6 Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática total das preparações comerciais (Item 3.1.1) foi determinada de acordo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (1996). Segundo Ghose (1987), unidade de atividade enzimática libera 1 μmol de açúcar redutor por 1 mL de caldo por minuto ($UI = \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), sendo expressa em unidades de papel filtro (FPU, *Filter Paper Unit*) ou atividade em papel filtro, por mililitro ($\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$).

A quantidade absoluta de glicose utilizada para os cálculos é 2,0 mg (GHOSE, 1987):

$$2,0 \text{ mg glicose} = \frac{2,0}{0,18016 \mu\text{mol}} \quad (27)$$

Esta quantidade de glicose foi produzida por 0,5 mL de enzima em 60 minutos, isto é, na reação de FPU (GHOSE, 1987):

$$2,0 \text{ mg glicose} = \frac{2,0}{(0,18016 \cdot 0,5 \cdot 60 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})} \quad (28)$$

$$2,0 \text{ mg glicose} = 0,37 \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (29)$$

$$\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{0,37}{\text{Conc. de enzima referente a } 2,0 \text{ mg glicose}} (\text{UI} \cdot \text{mL}^{-1}) \quad (30)$$

1 UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de substrato convertido

1 UI = $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ de "glicose" (açúcar redutor como glicose) convertido

1 UI = 0,18016 mg $\cdot \text{min}^{-1}$ (quando o produto é glicose)

$$\text{FPU} \cdot \text{mL}^{-1} = \frac{2,0}{0,18016 \cdot V_C \cdot t \cdot [\text{Enzima diluída}]} \quad (31)$$

Onde, V_C é o volume do caldo enzimático utilizado na hidrólise (mL), t é o tempo de hidrólise (min) e 0,18016 é igual a 1 μmol de glicose (mg).

Em tubos de ensaio, contendo uma tira de papel Whatman nº 1 (1,0 cm x 6,0 cm), pesando aproximadamente 50 mg, foram transferidos 0,5 mL do complexo enzimático e 1 mL de solução tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8).

Durante as reações, parte da concentração da glicose pode vir da própria enzima e/ou do substrato, uma vez que o complexo enzimático pode conter açúcares nutrientes. Por esta razão, foi realizada a prova em branco substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (5 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 50 ± 2 °C durante 60 minutos. Após o tempo de incubação, foram adicionados 3 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), posteriormente, os tubos foram colocados em banho maria até ebulição ($T \approx 100$ °C) durante 5 minutos, depois foram adicionados 20 mL de água destilada, e seguida, os tubos foram levemente agitados para a completa homogeneização da mistura.

3.2.7 Determinação da Concentração dos Açúcares Redutores Totais (ART)

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) foram determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose (Tabela 2) nas concentrações de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹. A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (Thermo Scientific, Modelo Genesys 10S UV-Vis) a 540 nm. A atividade enzimática foi calculada conforme a Equação (27).

Fazer diluições da solução padrão de glicose (1 g.L⁻¹) com água destilada em tubos de ensaio, de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 - Preparação das diluições da solução padrão de glicose.

| $V_{C_6H_{12}O_6}$ [mL] | V_{H_2O} [mL] | $C_{C_6H_{12}O_6}$ [g.L ⁻¹] |
|-------------------------|-----------------|---|
| 1 | 9 | 0,1 |
| 2 | 8 | 0,2 |
| 3 | 7 | 0,3 |
| 4 | 6 | 0,4 |
| 5 | 5 | 0,5 |
| 6 | 4 | 0,6 |
| 7 | 3 | 0,7 |
| 8 | 2 | 0,8 |
| 9 | 1 | 0,9 |
| 10 | 0 | 1,0 |

3.2.7.1 Solução tampão de citrato de sódio 0,05 mol.L⁻¹ (pH = 4,8)

Pesar 10,5 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, PA, Merck) e dissolver em 37,5 mL de água destilada. Em seguida, adicionar 2,5 g hidróxido de sódio (NaOH, 99%, Sigma-Aldrich), ajustar o volume para 50 mL, em balão volumétrico ($1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$, pH = 4,5). Para obter a concentração de $0,05 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ (pH = 4,8), a solução (50 mL) deve ser diluída para 1000 mL, em balão volumétrico.

3.2.7.2 Solução de tartarato duplo de sódio e potássio

Pesar 15,1 g de tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$, PA, Vetec) e dissolver em 1 L de água destilada. Armazenar a solução em frasco âmbar em temperatura ambiente até 30 dias.

3.2.7.3 Reagente DNS

Pesar 10,6 g de ácido 3,5 dinitrossalicílico ($C_7H_4N_2O_7$, 99%, Sigma-Aldrich) e 19,8 g de hidróxido de sódio (NaOH, 99%, Sigma-Aldrich) e dissolver em 1416 mL de água destilada. Em seguida adicionar 7,6 mL de fenol (C_6H_6O , 99%, Sigma-Aldrich), fundido à 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio ($Na_2O_5S_2$, PA, Vetec). Agitar e armazenar a solução em frasco âmbar em refrigerador, por no máximo 30 dias.

3.2.7.4 Solução de hidróxido de sódio $2 \text{ mol} \cdot L^{-1}$

Pesar 40 g de hidróxido de sódio anidro (NaOH, 99%, Sigma-Aldrich) diluir em água destilada e ajustar o volume para 500 mL, em balão volumétrico.

3.2.7.5 Solução padrão de glicose $1 \text{ g} \cdot L^{-1}$

Pesar em balança analítica 0,1000 g de glicose ($C_6H_{12}O_6$, 99,8%, Synth) e dissolver em aproximadamente 20 mL de água destilada sob agitação constante, transferir analiticamente para um balão volumétrico de 100 mL, completar o volume com água destilada e homogeneizar vigorosamente. Esta solução deve ser preparada e utilizada no dia da análise.

3.2.8 Hidrólise Enzimática do BCA

3.2.8.1 Ensaios preliminares de hidrólise do BCA

Estes ensaios objetivaram avaliar a melhor combinação de enzimas comerciais (complexo celulásico, xilanase, β -glucosidase, complexo enzimático, β -glucanase e xilanase e glucoamilase) no processo de hidrólise do BCA com massa reduzida. Foram realizados vinte e quatro ensaios, divididos em seis condições experimentais (C1, C2, C3, C4, C5 e C6). A concentração média inicial do BCA correspondeu a $34,5 \text{ g.L}^{-1}$.

A carga enzimática (total) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato (m/m). As combinações enzimáticas (misturas) usadas para a avaliação da conversão de celulose em glicose para os diferentes tratamentos do BCA (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) são ilustradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Combinações enzimáticas usadas nos ensaios de hidrólise do BCA, obtidos por tratamento com NaOH a 6% (m/v).

| Combinação | Enzima | PACTA [g] | PAC70 [g] | PAC90 [g] | PAC120 [g] |
|------------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|
| C1 | E1: E3: E4 | 1,032 | 1,014 | 1,020 | 1,070 |
| | | 1,031 | 1,013 | 1,021 | 1,077 |
| C2 | E1: E2: E3 | 1,038 | 1,020 | 1,010 | 1,047 |
| | | 1,040 | 1,022 | 1,009 | 1,048 |
| C3 | E1: E3: E6 | 1,038 | 1,015 | 1,014 | 1,049 |
| | | 1,036 | 1,021 | 1,018 | 1,050 |
| C4 | E1: E2: E4 | 1,043 | 1,017 | 1,013 | 1,025 |
| | | 1,045 | 1,016 | 1,013 | 1,025 |
| C5 | E2: E5: E6 | 1,027 | 1,042 | 1,010 | 1,050 |
| | | 1,030 | 1,042 | 1,011 | 1,047 |
| C6 | E4: E5: E6 | 1,024 | 1,012 | 1,012 | 1,047 |
| | | 1,029 | 1,012 | 1,014 | 1,044 |

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio de 100 mL, contendo o BCA pré-tratado, 25 mL de água destilada e 5 mL de solução tampão de citrato (pH =

4,8). A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 50 ± 2 °C, foram realizadas coletas para os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. A inativação enzimática foi realizada em água fervente ($T \approx 100$ °C) durante 5 minutos.

Para separar o hidrolisado da polpa, a mistura foi filtrada em cadinho de placa sinterizada (N° 1). As concentrações de ART's foram determinadas, conforme descrito no item 3.2.7.

Em paralelo, foi realizada a prova em branco para cada ensaio, substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (30 mL, pH 4,8). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

3.2.8.2 Ensaio de hidrólise enzimática do BCA

Mediante a análise preliminar dos resultados de hidrólise do BCA com massa reduzida (Item 3.2.8.1), novos ensaios foram realizados usando a combinação de enzimas que apresentou a melhor conversão do material celulósico em glicose.

O BCA pré-tratado (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) foi submetido à hidrólise enzimática em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo, cerca de 10 g BCA, 200 mL de água, o pH foi ajustado com solução tampão de citrato para 4,8. A concentração média inicial do BCA foi de $50,17 \text{ g.L}^{-1}$ (PACTA), $50,42 \text{ g.L}^{-1}$ (PAC70), $50,25 \text{ g.L}^{-1}$ (PAC90) e de $50,28 \text{ g.L}^{-1}$ (PAC120). A carga enzimática (total, condição C2) usada para cada ensaio foi de 10% em massa com relação a massa do substrato. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A incubação foi realizada em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 50 ± 3 °C com agitação periódica com pH ajustado para 4,8. Após o tempo de incubação (5 dias) foi realizada a inativação enzimática com o aumento da temperatura para 90 °C por 1 h. As concentrações de ART foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose nas concentrações de 0,1 a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (BIOSPECTRO, Faixa de 340-1000 nm, Modelo SP-12) a 540 nm. Em paralelo, para cada ensaio, foi realizada a prova em branco substituindo-se o complexo enzimático pela solução tampão acetato de sódio (200 mL, pH 4,8).

3.2.9 Fermentação Alcóolica

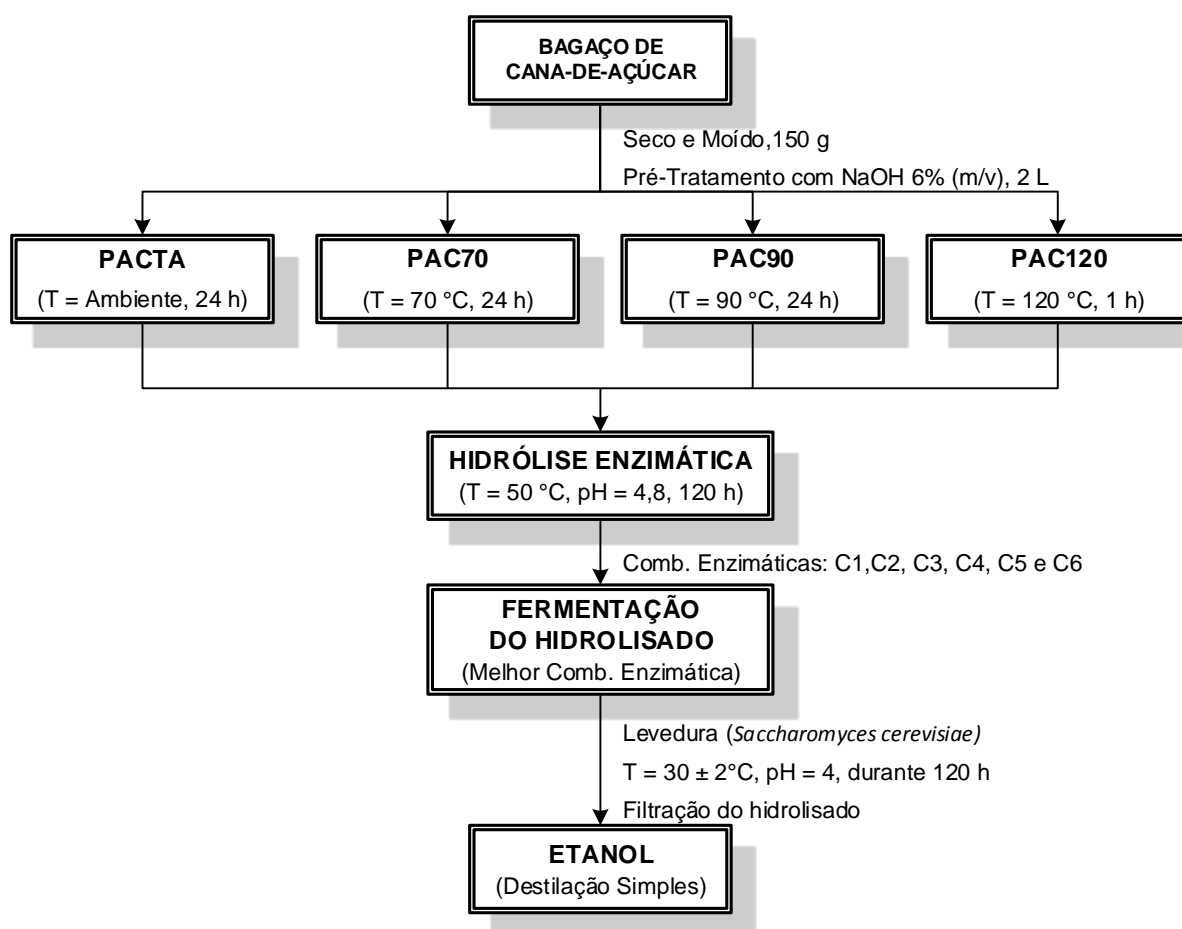
Nesta etapa, somente os hidrolisados do BCA (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), obtidos no tempo de 120 horas (Item 3.2.8.2), foram submetidos ao processo de fermentação alcóolica. Antes do início da fermentação, foi necessário fazer a inativação enzimática e a filtração dos hidrolisados, conforme descrito no Item 3.2.8.2.

As fermentações alcóolicas foram realizadas em Erlenmeyers de 500 mL, contendo, 200 mL do hidrolisado com o pH ajustado para 4 com ácido sulfúrico 1:1 (v/v), a inoculação do mosto foi feita com a adição de 2 g de fermento comercial seco (*Saccharomyces cerevisiae*), correspondendo a uma concentração inicial da levedura de 1% (m/v).

A mistura foi submetida à incubação em estufa microbiológica (MEDICATE, MD-1.6) a 30 ± 2 °C, durante 24 horas. As concentrações de glicose obtidos na fermentação alcóolica foram determinadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959), mediante a construção da curva padrão de glicose nas concentrações de 0,1 a 1,0 g.L⁻¹.

A concentração de glicose foi determinada em um espectrofotômetro digital (BIOSPECTRO, Faixa de 340-1000 nm, Modelo SP-12) a 540 nm. O etanol produzido foi obtido por destilação simples. As etapas para a obtenção do etanol são mostradas na Figura 9 pág.60.

Figura 9 - Fluxograma simplificado para a produção do etanol do BCA.



3.3 AJUSTES DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISES ENZIMÁTICAS DO BCA

A modelagem cinética a partir dos dados experimentais da hidrólise enzimática do BCA, obtidos por diferentes tratamentos (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), foram ajustados aos modelos de Michaelis-Menten e representação de Lineweaver-Burk. Os parâmetros cinéticos das reações enzimáticas foram ajustados pelo aplicativo SOLVER na planilha eletrônica EXCEL 2013 (15.0.4727.1001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

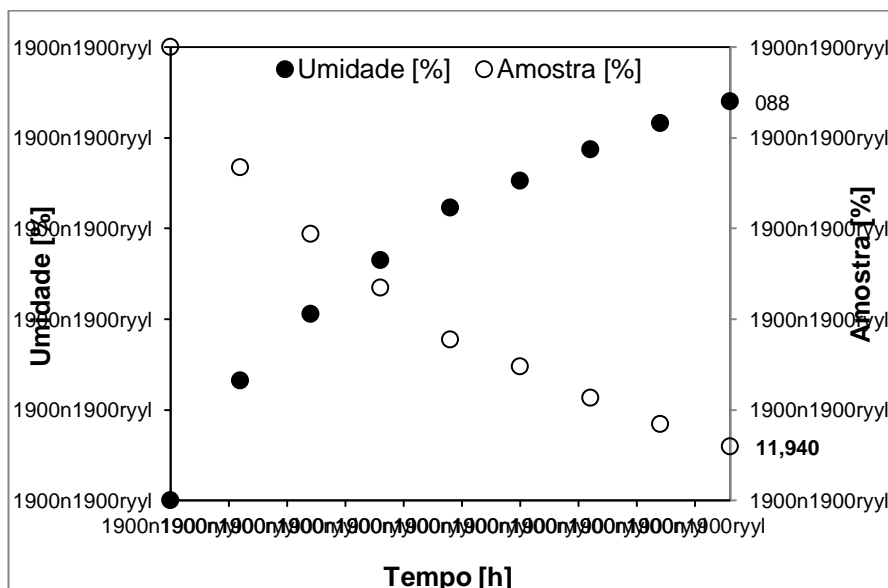
4.1 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.1.1 Secagem Natural e Secagem Forçada

Para a remoção das impurezas contidas no BCA, foi realizada a lavagem com água corrente, o excesso de umidade foi retirado mediante a secagem natural, durante 72 horas. A temperatura ambiente média foi de 30,5 °C, e a umidade relativa do ar (média) foi de 53%.

A secagem do BCA foi realizada em estufa com circulação de ar na temperatura de 50 ± 2 °C, a velocidade do ar foi mantida constante em $0,5 \text{ m.s}^{-1}$. O processo de secagem teve como objetivo, minimizar a degradação de constituintes químicos, proliferação de microrganismos responsáveis pela fermentação e o desenvolvimento de fungos na armazenagem. O comportamento da curva de secagem do BCA em função do tempo é ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Curva de secagem do BCA.



Os teores de umidade e o rendimento do BCA em base seca foram 88,06% e 11,94%, respectivamente. A retirada de água do processo de hidrólise proporciona

melhor ação sinérgica das enzimas à celulose. Os dados (massas) da curva de secagem encontram-se no Apêndice I.

4.2 TAMANHO MÉDIO DAS FIBRAS DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O tamanho médio das partículas do BCA utilizado no processo de polpação, variou entre 6 a 50 mm de comprimento e 0,3 mm de diâmetro de um filamento único e de 3 mm o diâmetro do aglomerado. Essas medidas foram realizadas utilizando um paquímetro Mitutoyo (0 a 250 mm).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.3.1 Umidade

O teor de umidade do BCA (*in natura*), foi de 56,45%, este parâmetro está acima dos valores médios citados na literatura (50%) (CANILHA et al., 2007; RIBEIRO, 2013), isto sugere a presença de substâncias solúveis e não voláteis (açúcar residual do caldo de cana) nas fibras do bagaço de cana.

4.3.2 Cinzas e Ligninas

Os teores de cinzas e lignina total (solúvel + insolúvel) nas amostras do BCA (*in natura*) e após o tratamento alcalino (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), são mostrados na Tabela 4. Os dados experimentais de cinza e lignina estão no Apêndice II.

Tabela 4 - Teores de cinzas e de lignina do BCA.

| Amostra | Cinzas (%) | Lignina (%) |
|--------------------------|-------------|---------------|
| BCA (<i>in natura</i>) | 5,20 ± 0,15 | 22,30 ± 0,320 |
| PACTA | 2,05 ± 0,03 | 20,44 ± 0,005 |
| PAC70 | 0,62 ± 0,01 | 13,18 ± 0,007 |
| PAC90 | 0,48 ± 0,01 | 5,95 ± 0,002 |
| PAC120 | 0,18 ± 0,01 | 5,49 ± 0,002 |

Para o BCA (*in natura*, $T_{\text{Média}} = 28,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$), os resultados apresentam pequenas variações quando comparados aos da literatura, cinzas (1,5-5%, MONTE, 2009) e lignina (26,27%, CANILHA et al., 2007), que pode ocorrer em função da variedade da cana e da localização geográfica dos locais de cultivo.

Para as amostras do BCA obtidas por diferentes tratamentos (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), ficou evidenciado, que a temperatura influenciou na solubilidade da lignina, que pode ser atribuída ao pré-tratamento com o hidróxido de sódio proporcionando o aumento da área superficial interna da celulose e diminuindo o grau de polimerização. A maior remoção ocorreu nas temperaturas de $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (75,38%, PAC120) e 90°C (73,32%, PAC90), considerando o total de lignina na amostra inicial (22,30%, BCA).

Uma hipótese para este comportamento se refere à ocorrência de reações de condensação que podem ocorrer na estrutura molecular da lignina, entre seus grupos fenólicos e fragmentos fenólicos de outros compostos presentes no BCA, o que sugere um aumento na sua massa molecular, provocado pelo rearranjo estrutural da lignina segundo alguns autores (FENGEL & WEGENER, 1989; CHEN et al., 2008).

4.4 POLPAÇÃO ALCALINA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Na Figura 11 são ilustradas as características físicas do BCA após polpação alcalina. A Figura 11- A ilustra o BCA seco. Esse bagaço foi submetido à ação da solução de hidróxido de sódio a 6% (m/v) que apresentou uma cor amarela (Figura 11- B) e BCA neutralizado (Figura 11- C) com ácido sulfúrico 1:8 (v/v) apresentando as características físicas das fibras do BCA mais clara, devido ao processo de neutralização.

Figura 11- (A) BCA seco; (B) BCA polpado com NaOH e (C) BCA neutralizado.



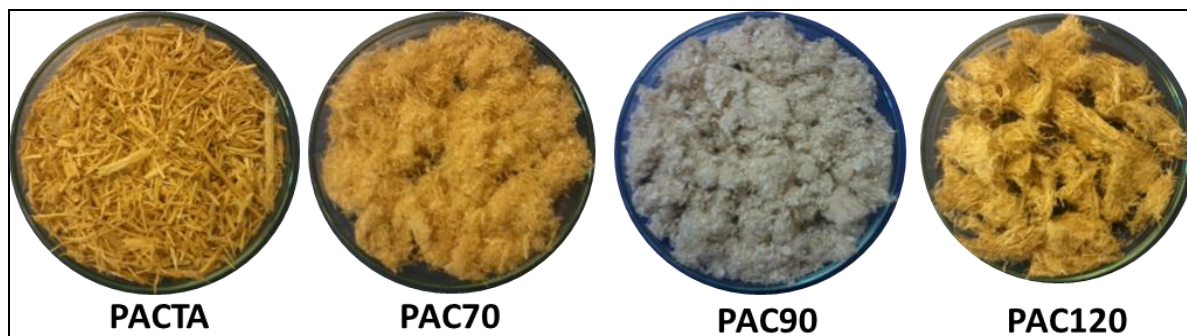
Os rendimentos médios (Tabela 5) em base seca das polpas do BCA, obtidas após o processo de deslignificação está diretamente relacionado com a temperatura, conforme o aumento da temperatura se obteve um maior rendimento, devido à ação do hidróxido de sódio que abre a estrutura do BCA para o ataque de celulose pela celulase, sendo a melhor condição de tratamento obtida na PAC120.

Tabela 5 - Rendimento da Polpação do BCA Seco.

| Amostra | BCA (%) |
|---------|--------------|
| PACTA | 30,64 ± 1,80 |
| PAC70 | 44,00 ± 2,37 |
| PAC90 | 65,91 ± 1,45 |
| PAC120 | 94,35 ± 2,06 |

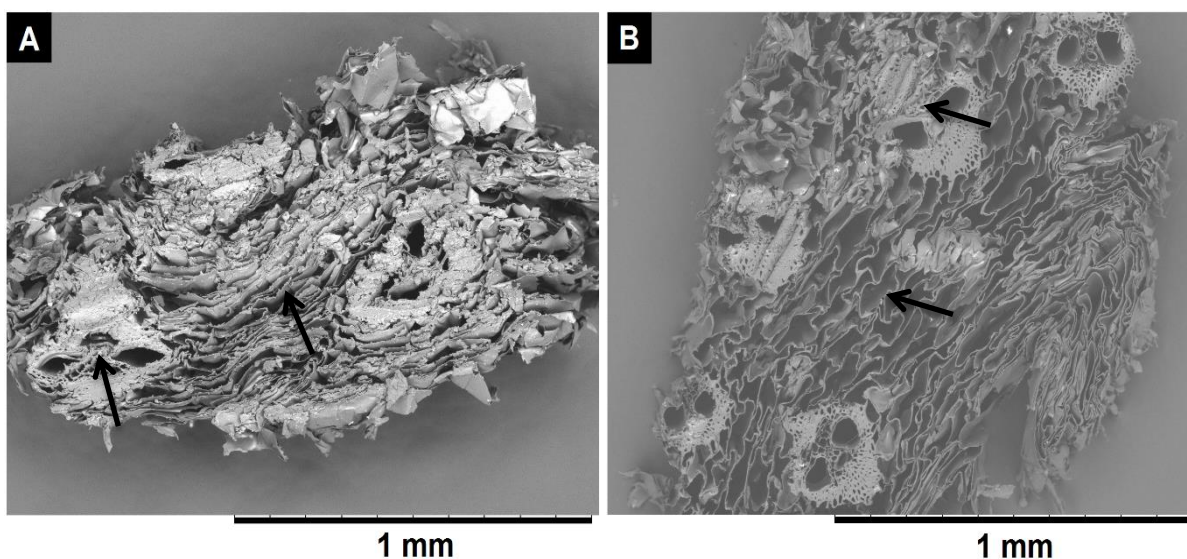
Na Figura 12, são ilustrados os BCA secos após a polpação alcalina nas diferentes temperaturas (Ambiente, 70°C, 90°C e 120°C) e observa-se fisicamente que a estrutura do BCA seco sofreu modificações após o pré-tratamento alcalino, sendo que a temperatura foi o principal fator, já que todas as amostras foram submetidas à ação da solução de hidróxido de sódio a 6% (m/v).

Figura 12 – Polpas do BCA após Pré-tratamento Alcalino.



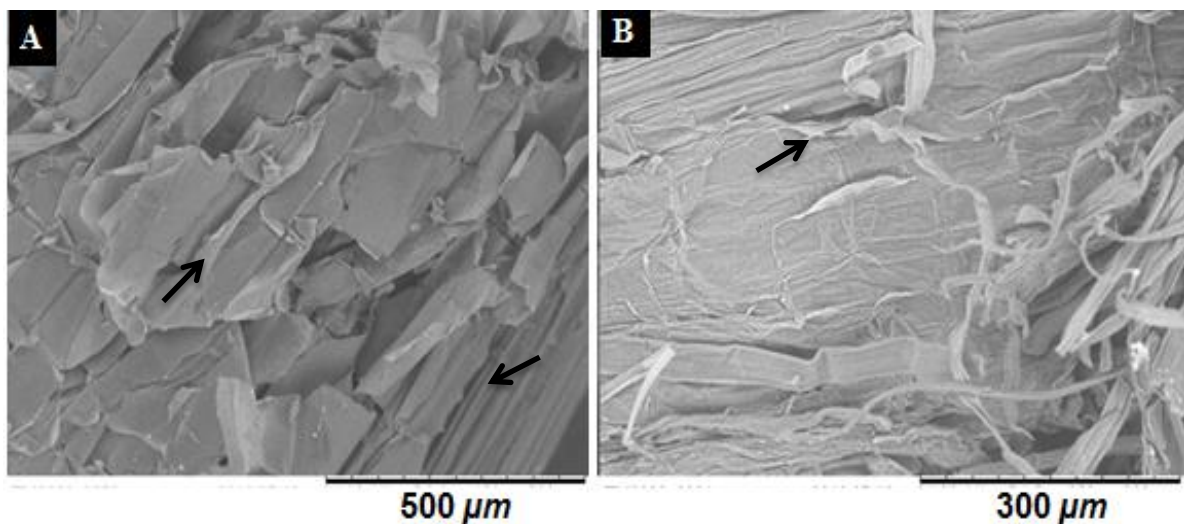
4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Nos detalhes apresentados (setas), é ilustrada a presença de flocos de medula, bem como uma estrutura compacta Figura 13-A, com fibras unidas pela presença de hemicelulose e lignina, e Figura 13-B, ilustra-se que o pré-tratamento utilizado na amostra proporcionou em parte a deslignificação e com isso abrindo as fibras da estrutura do PACTA e tornando-as mais acessíveis à ação enzimática. Na Figura 13, são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do BCA seco *in natura* e do PACTA com aumento de 100x.

Figura 13 – Micrografias das amostras: (A) BCA seco *in natura* e (B) PACTA.

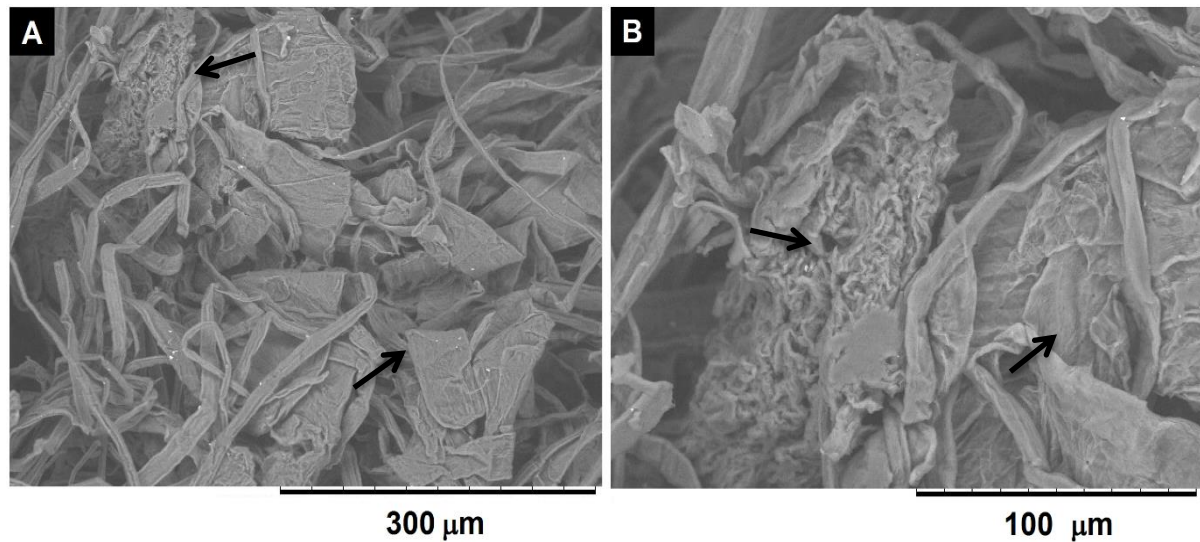
Nos detalhes apresentados (setas) na Figura 14-A são ilustrados a presença de flocos de medula e fibras da estrutura da PACTA, Figura 14-B ilustra-se que o efeito do pré-tratamento proporcionou a fragmentação da estrutura morfológica do material lignocelulósico, preservando uma grande parte do material, e proporcionou também a abertura na estrutura morfológica do bagaço, que ainda contém uma boa parte do material unido. Na Figura 14, são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PACTA (A) com aumento de 150 x e PAC70 (B) com aumento de 250x.

Figura 14 – Micrografias das amostras: (A) PACTA e a (B) PAC70.



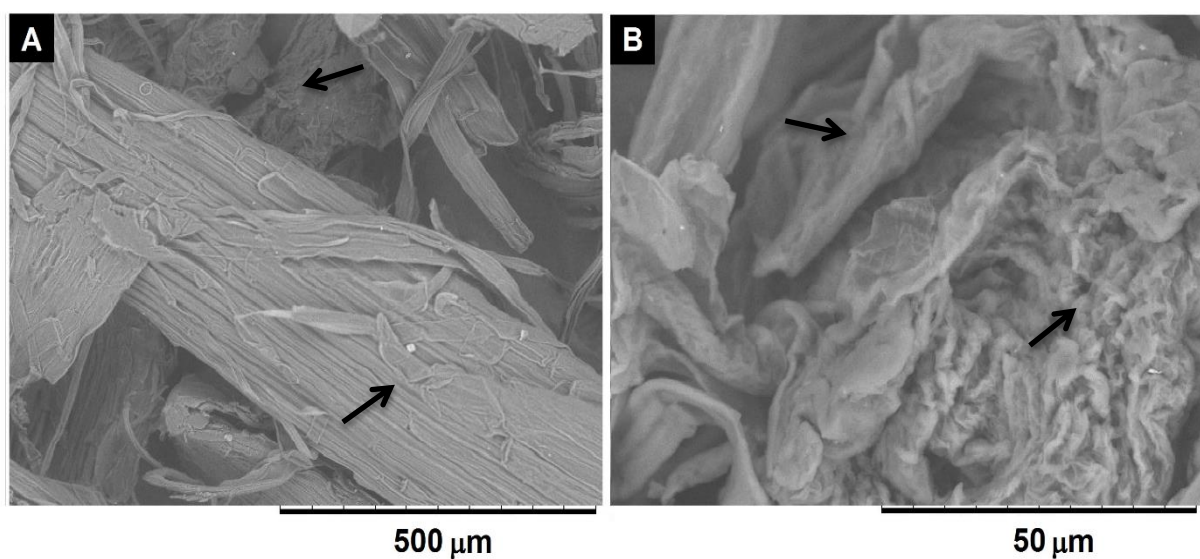
Nos detalhes apresentados (setas), Figura 15-A pág. 67 é ilustrada a presença de uma estrutura compactada, fibras unidas pela presença de hemicelulose e lignina, devido à deslignificação alcalina proporcionando maior fragmentação da medula e a Figura 15-B pág. 67 é ilustrada a presença de flocos de medula. Na Figura 15 pág. 67 são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PAC90 com ampliação de 300x (A) e 800x (B).

Figura 15 - Micrografias (A) e (B) da amostra PAC90.



Nos detalhes apresentados (setas), Figura 16-A é ilustrada a presença de fibras da estrutura mais nítidas da PAC120, devido à deslignificação alcalina proporcionando maior fragmentação da medula. Figura 16-B é ilustrada a presença de flocos de medula mais finos do que a Figura 14-A pág.66, que são ilustrados laminas de flocos de medula. Na Figura 16 são ilustradas as micrografias eletrônicas de varredura do PAC120 com ampliação de 180x (A) e em (B) ampliação de 1.8k.

Figura 16 – Micrografias (A) e (B) da amostra PAC120.



Comparando as micrografias do BCA seco do pré-tratamento em diferentes temperaturas (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120), evidencia uma maior abertura e fragmentação dos tecidos vegetais quando comparado ao bagaço de cana-de-açúcar *in natura* e observa-se que as fibras estão mais nítidas devido à fragmentação da medula, deixando a estrutura da celulose mais exposta ao ataque enzimático. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu verificar as diferenças morfológicas entre a matriz no estado *in natura* e após deslignificação alcalina das amostras em estudo.

4.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Com os dados obtidos da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. A atividade enzimática do complexo celulásico (E1) foi de 22,12 FPU.mL⁻¹, xilanase (E2) foi de 8,13 FPU.mL⁻¹, β-glucosidase (E3) foi de 14,84 FPU.mL⁻¹, complexo enzimático (E4) foi de 13,93 FPU.mL⁻¹, β-glucanase e Xilanase (E6) foi de 4,60 FPU.mL⁻¹ e glucoamilase (E6) foi de 5,31 FPU.mL⁻¹.

Com os resultados da atividade enzimática obtidos pelo método do papel de filtro, foram definidas as cargas enzimáticas necessárias para adicionar a proporção de cada enzima, formando as combinações enzimáticas (Tabela 6) utilizadas nos ensaios de hidrólise do BCA.

Tabela 6 – Carga enzimática total usada na hidrólise do BCA.

| Enzima | Nome | Combinação Enzimas | M1 [g] | M2 [g] | ¹ FPU.mL ⁻¹ |
|--------|----------------------|--------------------|--------|--------|-----------------------------------|
| E1 | Complexo Celulásico | C1 (E1:E3:E4) | 0,35 | 1,05 | 70,92 |
| E2 | Xilanase | C2 (E1:E2:E3) | 0,35 | 1,05 | 62,83 |
| E3 | β-glucosidase | C3 (E1:E3:E6) | 0,35 | 1,05 | 58,9 |
| E4 | Complexo Enzimático | C4 (E1:E2:E4) | 0,35 | 1,05 | 61,56 |
| E5 | β-glucanase-Xilanase | C5 (E2:E5:E6) | 0,35 | 1,05 | 25,14 |
| E6 | Glucoamilase | C6 (E4:E5:E6) | 0,35 | 1,05 | 33,23 |

Nota: (M1 e M2) massas do complexo enzimático (individual).

4.7 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Os testes preliminares foram realizados para se comparar os métodos analíticos a serem utilizados, eliminar possíveis causas de erros sistemáticos e definir um tempo ideal de análise das respostas para as hidrólises. De acordo com os resultados das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática (massa reduzida), observa-se uma variação significativa dos teores de ART's, no final do processo de hidrólise enzimática.

A C2 (Tabela 7) foi que se obteve maior taxa de conversão de celulose em glicose. O aumento da temperatura no pré-tratamento da polpação alcalina no BCA influenciou no processo de hidrólise enzimática proporcionando uma melhor ruptura das ligações de hidrogênio que une as fibrilas de celulose e melhor solubilização da hemicelulose favorecendo maior taxa de conversão de celulose em glicose para PAC120. O pH inicial foi de 4,8 e no final do processo variou entre 4,8 - 4,9 permanecendo dentro da faixa de trabalho (Tabela 7). No Apêndice III estão as massas obtidas de celulose e glicose do processo de hidrólise enzimática do BCA.

Tabela 7 – Hidrólise Enzimática (Massa Reduzida) do BCA.

| Amostra | Combinação Enzimática | | | | | | |
|---------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | |
| PACTA | Glicose [g.L ⁻¹] | 0,25 | 0,32 | 0,17 | 0,17 | 0,17 | 0,27 |
| | Rend. [%] | 24,15 | 30,71 | 16,73 | 16,42 | 16,56 | 26,63 |
| | pH Final | 4,90 | 4,92 | 4,94 | 4,92 | 4,92 | 4,86 |
| PAC70 | Glicose [g.L ⁻¹] | 0,15 | 0,23 | 0,15 | 0,17 | 0,12 | 0,12 |
| | Rend. [%] | 14,6 | 22,41 | 14,78 | 16,27 | 11,35 | 11,73 |
| | pH Final | 4,93 | 4,90 | 4,92 | 4,91 | 4,93 | 4,89 |
| PAC90 | Glicose [g.L ⁻¹] | 0,27 | 0,38 | 0,27 | 0,32 | 0,25 | 0,18 |
| | Rend. [%] | 26,83 | 37,58 | 26,34 | 31,91 | 24,71 | 17,48 |
| | pH Final | 4,92 | 4,88 | 4,89 | 4,87 | 4,9 | 4,89 |
| PAC120 | Glicose [g.L ⁻¹] | 0,29 | 0,48 | 0,31 | 0,35 | 0,33 | 0,18 |
| | Rend. [%] | 26,77 | 45,41 | 29,52 | 34,28 | 31,88 | 17,5 |
| | pH Final | 4,90 | 4,92 | 4,94 | 4,92 | 4,92 | 4,86 |

De acordo com os resultados das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática (Massa = 10 g), observa-se uma variação significativa dos teores de ART's, no final do processo de hidrólise enzimática. Os teores médios de ART's para as amostras PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 conforme ilustrado na Tabela 8. Estes resultados são compatíveis com as massas médias residuais de 7,6 g (PACTA), 5,4 g (PAC70), 4,8 (PAC90) e 0,9 g (PAC120), obtidas por filtração e submetidas à secagem em estufa a 105 °C, durante 24 horas. A melhor taxa de conversão de celulose em glicose foi obtida em 120 h de reação, correspondente a relação C2.

A massa teórica calculada de glicose foi de 9,44 g.mol⁻¹. Os cálculos referem-se a 10 g da amostra usadas na hidrólise. O tempo de 120 h horas foi escolhido para realizar a modelagem da cinética enzimática das hidrólises, sendo coletadas a cada 24 h. As curvas de calibração para a determinações das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática encontram-se no Apendice V e VI.

Tabela 8 – Hidrólise Enzimática (Massa = 10 g) do BCA.

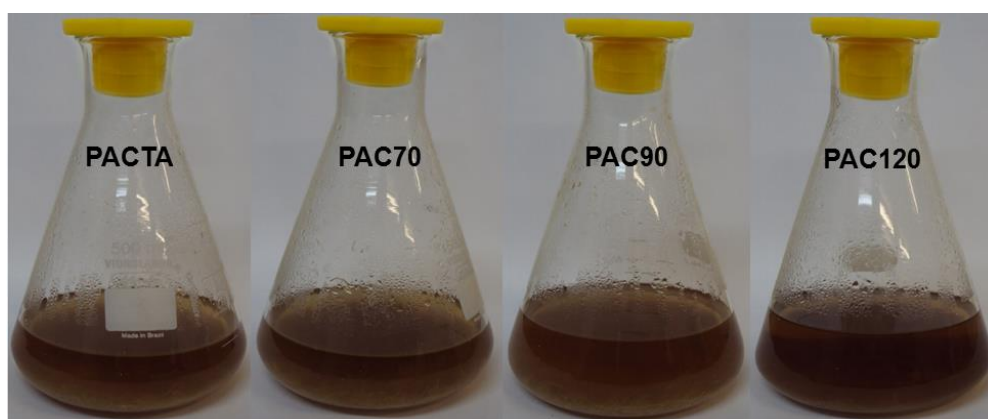
| Amostra | Tempo [h] | | | | | | |
|---------|-----------------------------|----|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | |
| PACTA | Glicose[g.L ⁻¹] | 0 | 0,816 | 1,219 | 1,393 | 1,804 | 2,386 |
| | Rend. [%] | 0 | 8,15 | 12,15 | 13,84 | 17,98 | 23,82 |
| | U.mL ⁻¹ | - | 2462,96 | 1839,11 | 1400,41 | 1360,17 | 1439,75 |
| PAC70 | Glicose[g.L ⁻¹] | 0 | 1,178 | 2,842 | 3,393 | 3,882 | 4,572 |
| | Rend. [%] | 0 | 11,72 | 28,22 | 33,45 | 38,4 | 45,6 |
| | U.mL ⁻¹ | - | 3552,96 | 4286,11 | 3411,93 | 2927,59 | 2758,29 |
| PAC90 | Glicose[g.L ⁻¹] | 0 | 1,657 | 2,517 | 3,595 | 4,728 | 5,186 |
| | Rend. [%] | 0 | 16,52 | 25,1 | 35,76 | 47,09 | 51,48 |
| | U.mL ⁻¹ | - | 4998,96 | 3797,15 | 3614,84 | 3565,43 | 3128,8 |
| PAC120 | Glicose[g.L ⁻¹] | 0 | 1,581 | 3,348 | 5,919 | 8,318 | 9,089 |
| | Rend. [%] | 0 | 15,81 | 33,3 | 58,81 | 82,69 | 90,23 |
| | U.mL ⁻¹ | - | 4770,41 | 5049,77 | 5951,59 | 6273,4 | 5483,72 |

As curvas de calibração para a determinações das concentrações de glicose obtidas na hidrólise enzimática encontram-se no Apendice V e VI.

4.8 FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Na Figura 17 são ilustrados os licores das amostras (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) obtidos da fermentação alcóolica após 24 h de incubação. O mosto fermentado foi destilado para obtenção do etanol.

Figura 17 - Licores do hidrolisado após fermentação alcóolica.



Analisando a Tabela 9 as amostras obtiveram um aumento de rendimento conforme foi o aumento do período de incubação e a amostra que obteve um resultado mais expressivo foi a PAC120.

Tabela 9 – Rendimento do Etanol.

| Amostra | EtOH _M [mL] | EtOH _M [g] | Rend. _{Médio} [%] | |
|---------|------------------------|-----------------------|----------------------------|--------|
| | | | Glicose | Etanol |
| PACTA | 2,05 | 1,62 | 23,82 | 16,17 |
| PAC70 | 2,55 | 2,02 | 45,60 | 20,09 |
| PAC90 | 4,25 | 3,36 | 51,48 | 33,33 |
| PAC120 | 4,40 | 3,48 | 90,23 | 34,51 |

4.9 CINÉTICA DAS REAÇÕES ENZIMÁTICAS DO BCA.

4.9.1 Equação de Michaelis-Menten

Analisando os parâmetros obtidos nos ajustes cinéticos da hidrólise enzimática do BCA (Tabela 10) as velocidades foram influenciadas pelo aumento da temperatura no pré-tratamento do BCA. A V_{max} obtida na PAC120 é mais rápida aproximadamente 8, 6 e 5 vezes em relação à PACTA, PAC70 e PAC90 respectivamente, o pré-tratamento proporcionou uma abertura na estrutura morfológica do bagaço como podemos observar nas micrografias eletrônicas de varredura do BCA e diminuindo o teor de lignina. Com isso, facilitou o ataque enzimático no substrato apresentando maior eficiência catalítica da enzima para a PAC120.

Tabela 10 - Parâmetros da Cinética Enzimática da Hidrólise do BCA.

| Parâmetros | | PACTA | PAC70 | PAC90 | PAC120 |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|--------|
| V_{max} (g/h) | Calc. | 7,20 | 5,12 | 4,54 | 0,87 |
| | Exp. | 7,19 | 5,12 | 4,54 | 0,87 |
| K_m (g) | Calc. | 3,60 | 2,56 | 2,27 | 0,43 |
| | Exp. | 3,60 | 2,56 | 2,27 | 0,43 |
| K_{cat} (h) | Calc. | 1,44 | 1,02 | 0,91 | 0,17 |
| | Exp. | 1,44 | 1,02 | 0,91 | 0,17 |
| K_m/V_{max} (g/h) | Calc. | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| | Exp. | 0,50 | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| K_{cat}/K_m (h/g) | Calc. | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| | Exp. | 0,40 | 0,40 | 0,40 | 0,40 |
| R^2 | Calc. | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| | Exp. | 0,96 | 0,98 | 0,91 | 0,99 |

Os valores obtidos de K_m (Tabela 10) é metade da velocidade máxima para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120. Então, segundo a literatura as concentrações dos substratos em estudo são iguais a constante de Michaelis-Menten das respectivas amostras. Conforme foi aumentando a temperatura do pré-tratamento

das amostras (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) em estudo foi diminuindo a constante de Michaelis-Menten. Logo, quanto menor o K_m , a mistura de enzima apresentou maior afinidade ao substrato e a eficiência catalítica da enzima ao sítio ativo.

O valor obtido de K_{cat} (Tabela 10 pág.72) é aproximadamente 2,5 vezes menor que a constante de Michaelis-Menten (K_m) para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120. O K_{cat} serve para descrever a velocidade limitante de qualquer reação catalisada por uma enzima em condições de saturação, pois K_{cat} está relacionado ao número de moléculas do substrato convertidas em produto por uma única molécula de enzima em uma dada unidade de tempo por cada sítio ativo.

Os valores obtidos (Tabela 10 pág. 72) da inclinação (K_m/V_{max}) para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 não foi influenciada pelas condições de trabalho, pois apresentaram a mesma eficiência catalítica da enzima.

Neste trabalho os valores K_{cat}/K_m (Tabela 10 pág. 72) para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foram os mesmos, pois a velocidade impôs um limite para com que a enzima e o substrato se difundissem em uma solução aquosa, influenciando na eficiência catalítica da enzima para formação do produto.

Considerando o coeficiente de correlação (R^2) obtidos (Tabela 10 pág.72) nos ajustes do modelo cinético dos resultados experimentais foi possível constatar que o modelo proposto (Michaelis-Menten) foi adequado para representar a cinética de hidrólise enzimática das amostras empregada neste trabalho.

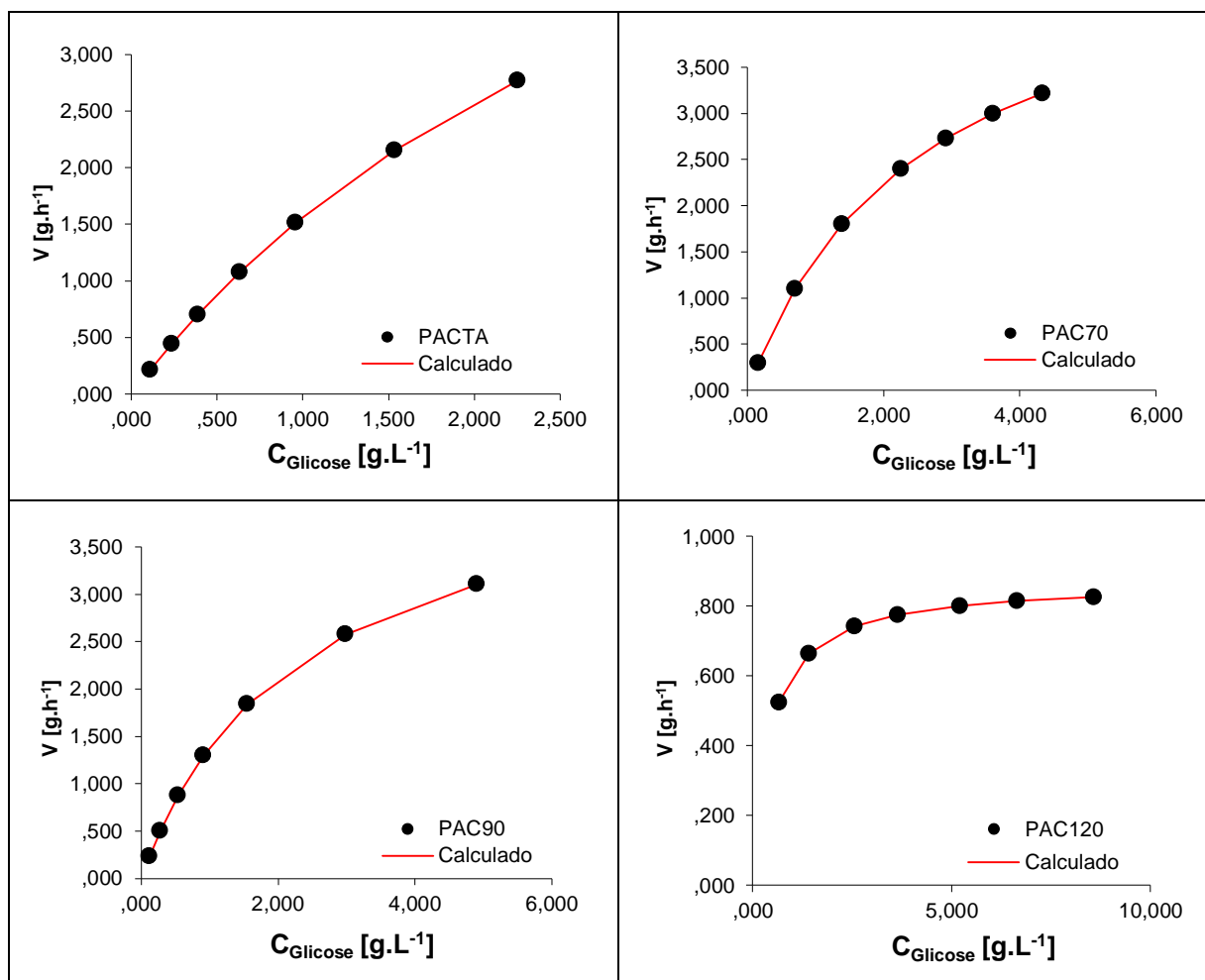
A cinética enzimática da equação de Michaelis-Menten (Figura 18 pág.74) para PACTA a velocidade da reação foi aumentando conforme as enzimas foram promovendo a hidrólise interna da cadeia de celulose e aumentando a eficiência catalítica, a reação cinética para a PACTA, PAC70 e PAC90 precisariam de mais tempo de reação para chegar ao valor obtido da V_{max} que foram de 7,20 h; 5,12 h e 4,54 h respectivamente. O tempo de 120 h de reação da cinética enzimática da equação de Michaelis-Menten para PAC120 (Figura 18 pág. 74) e a temperatura empregada no pré- tratamento tiveram efeito significativo para obter a V_{max} que foi de 0,87 h.

Na Figura 18 pág.74 descrevem o comportamento cinético das amostras (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) da equação de Michaelis-Menten que é empregado na maioria das enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0

em relação à concentração do substrato em excesso, com uma das assintotas em V_{max} .

A Figura 18 ilustra o plote da curva hiperbólica da concentração de glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) produzida vs a velocidade ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$) para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120.

Figura 18 - Concentração de glicose vs a velocidade.

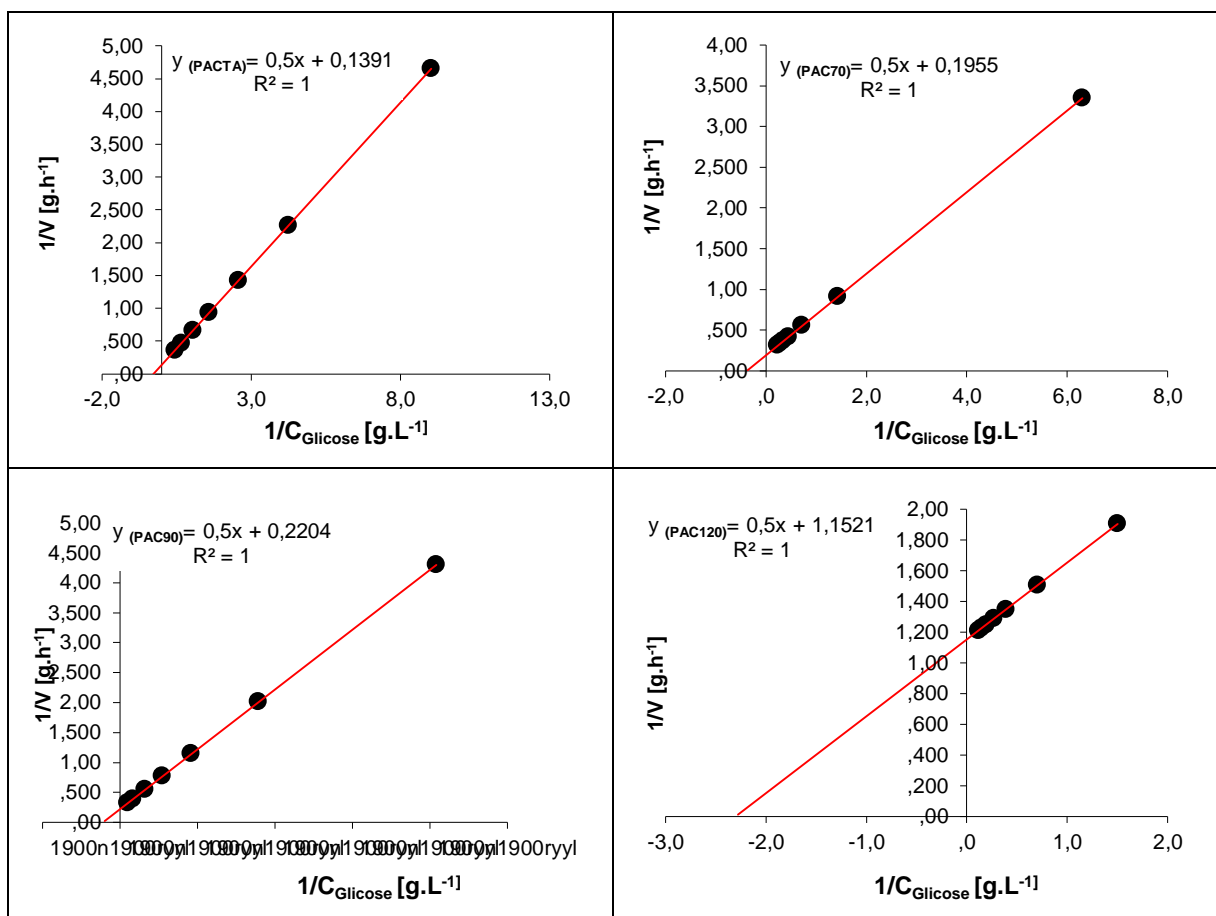


As combinações enzimáticas em estudo obedeceram à equação de Michaelis-Menten permitindo estimar os parâmetros cinéticos K_m , V_{max} , K_{cat} e K_{cat}/K_m . Por meio destas reações catalisadas enzimaticamente foi determinada a V_{max} e a concentração de substrato em que a V_0 é a metade da V_{max} . Esta é a constante de Michaelis-Menten (K_m).

4.9.2 Representação de Lineweaver-Burk

A representação de Lineweaver-Burk da PACTA obdeceu à linearização da equação de Michaelis-Menten permitindo estimar a inclinação da reta ($K_m/V_{max} = 0,5$), o valor do ponto de intercepção no eixo y ($1/V_{max} = 0,1391$) que pode ser observado na equação da reta (Figura 19) e a extrapolação de dados experimentais ($-1/K_m = -0,2781$).

Figura 19 - Representação de Lineweaver-Burk PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120.



A representação de Lineweaver-Burk da PAC70 obdeceu à linearização da equação de Michaelis-Menten permitindo estimar a inclinação da reta ($K_m/V_{max} = 0,5$), o valor do ponto de intercepção no eixo y ($1/V_{max} = 0,1955$) que pode ser observado na equação da reta (Figuras 19) e a extrapolação de dados experimentais ($-1/K_m = -0,3909$).

A representação de Lineweaver-Burk da PAC90 obdeceu à linearização da equação de Michaelis-Menten permitindo estimar a inclinação da reta ($K_m/V_{max} = 0,5$),

o valor do ponto de intercepção no eixo y ($1/V_{max} = 0,2204$) que pode ser observado na equação da reta (Figuras 19 pág.75) e a extrapolação de dados experimentais ($-1/K_m = - 0,4409$).

A representação de Lineweaver-Burk da PAC120 obedeceu à linearização da equação de Michaelis-Menten permitindo estimar a inclinação da reta ($K_m/V_{max} = 0,5$), o valor do ponto de intercepção no eixo y ($1/V_{max} = 1,1521$) que pode ser observado na equação da reta (Figuras 19 pág.75) e a extrapolação de dados experimentais ($-1/K_m = - 2,3043$).

A partir dos resultados de hidrólise enzimática do BCA, as combinações enzimáticas em estudo obedeceram à linearização da equação de Michaelis-Menten também chamada representação de Lineweaver–Burk permitindo estimar os parâmetros cinéticos: K_m/V_{max} , $1/V_{max}$, $-1/K_m$. Observa-se que a extrapolação ($-1/K_m$) corresponde o dobro de $1/V_{max}$ para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120.

Esses parâmetros obtidos pode permitir uma determinação mais precisa da V_{max} , para a diferenciação de diferentes mecanismos de reações enzimáticas e na análise de inibidores de enzimas.

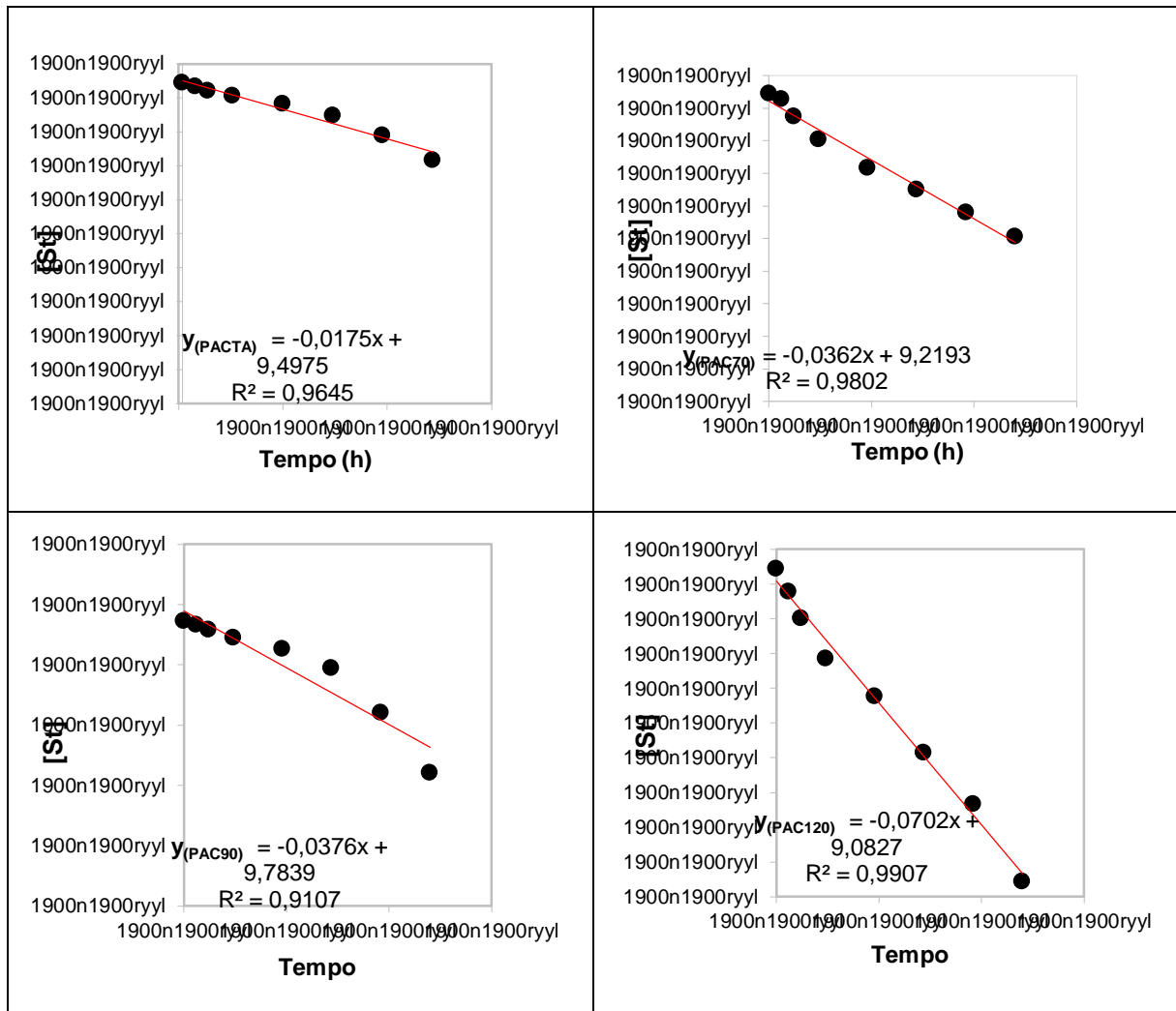
4.9.3 Ordem da Reação

A ordem de reação das cinéticas enzimáticas da hidrólise do BCA (Figura 20 pág. 77) foi determinada segundo a literatura estimando a inclinação da reta à curva do gráfico concentração substrato $[S_t]$ em instante t vs o tempo que serve para determinar a lei da velocidade que melhor se ajusta aos dados experimentais. A ordem que melhor se ajustou aos dados experimentais foi de ordem zero, pois a inclinação da reta obteve-se k negativo, conforme descrito na literatura.

O coeficiente angular da reta (k) pode ser observado nas equações das retas para:

- ◆ PACTA – $y = - 0,0175x + 9,4975$, $R^2 = 0,9645$;
- ◆ PAC70 – $y = - 0,0362x + 9,2193$, $R^2 = 0,9802$;
- ◆ PAC90 – $y = - 0,0376x + 9,7839$, $R^2 = 0,9107$;
- ◆ PAC120 ($y = - 0,0702x + 9,0827$, $R^2 = 0,9907$).

Figura 20 - Ordem de Reação das cinéticas enzimáticas da hidrólise do BCA.



Segundo a literatura (MARAGONI, 2003) podemos concluir que a concentração inicial de substrato $[S_0]$ é muito maior que a constante de Michaelis (K_m) quando temos a ordem zero ($n = 0$) e a taxa de reação é independente da concentração do reagente. Com base no coeficiente de correlação (R^2) a melhor foi para a PAC120.

4.9.4 Propriedades Termodinâmicas

Os valores obtidos da entalpia (ΔH) da reação das amostras (Tabela 11 pág.78) em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) no tempo de 6 h foram maiores e com o passar do tempo (120 h) a ΔH foi diminuindo facilitando a quebra e

formação de ligação na geração do complexo ativado e a diminuição do valor de ΔH proporciona uma velocidade mais rápida.

Tabela 11 - Propriedades Termodinâmicas.

| Parâmetros | Tempo (h) | PACTA | PAC70 | PAC90 | PAC120 |
|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|
| ΔH | 6 | 27855,64 | 27064,67 | 27843,84 | 28375,46 |
| | 120 | 22238,92 | 21553,06 | 18986,31 | 20927,03 |
| ΔS | 6 | -123,07 | -117,60 | -11638,95 | -109,27 |
| | 120 | -78,47 | -68,09 | 211,27 | -45,71 |
| ΔG | 6 | -11913,98 | -10936,94 | -122,18 | -109,27 |
| | 120 | -3117,30 | -449,23 | -58,10 | -45,71 |
| E_a | 6 | 30542,47 | 29751,50 | 30530,67 | 31062,29 |
| | 120 | 24925,75 | 24239,89 | 21673,14 | 23613,86 |
| k_{eq} | 6 | 0,0119 | 0,0171 | 0,0131 | 0,0757 |
| | 120 | 0,3134 | 0,8460 | 1,0818 | 9,8812 |
| K | 6 | 3,65E-05 | 5,24E-05 | 4,04E-05 | 2,26E-04 |
| | 120 | 2,95E-04 | 4,07E-04 | 1,09E-03 | 3,61E-03 |

Nota: E_a , ΔH , ΔG , ΔS em [kJ.mol⁻¹], k em [mol.L⁻¹.h⁻¹]

Os valores obtidos da entropia (ΔS) da reação (Tabela 11) das amostras em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) obtiveram um aumento da entropia proporcionando uma melhor eficiência catalítica das enzimas e o sistema apresentou uma mudança na entropia permitindo prever que o processo é espontâneo.

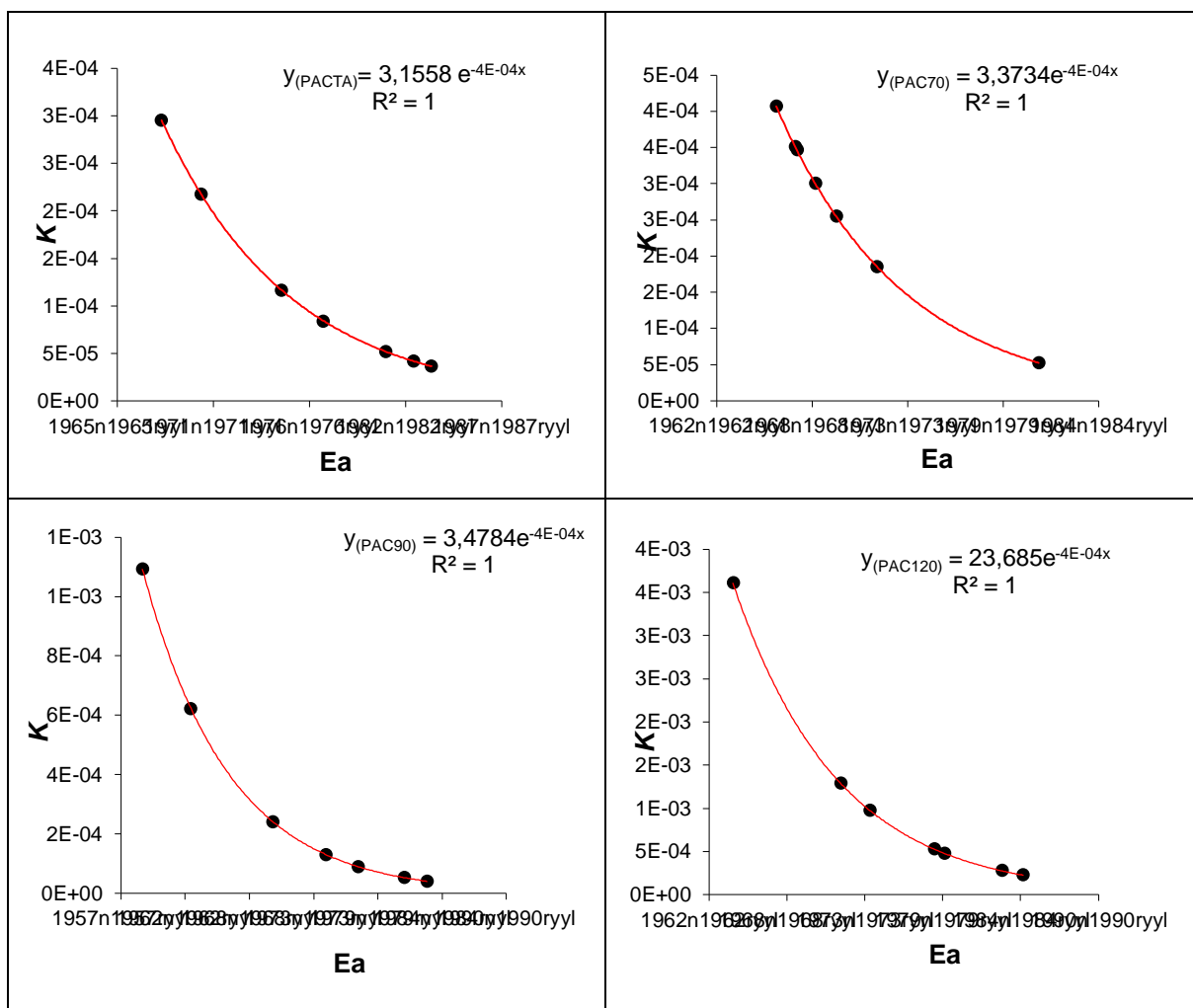
A variação de energia livre de Gibbs (ΔG) (Tabela 11) para as amostras em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) com o passar do tempo foram diminuindo. Com base na literatura (MARANGONI, 2003; NELSON & COX, 2002) pode-se dizer que ΔG é uma função da constante de equilíbrio (K_{eq}), quando a K_{eq} aumenta a ΔG diminui, influenciando as mudanças na ΔH e ΔS , tal como descrito pela equação de Gibbs-Helmholtz.

Os valores obtidos da constante (k) de velocidade da reação das amostras (Tabela 11) em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) no tempo de 6 h foram menores e com o passar do tempo (120 h) k foi aumentando, logo a temperatura do sistema diminuiu. Observa-se que quanto maior a k menor a E_a , no entanto as combinações enzimáticas seguem a equação de Arrhenius segundo a literatura.

Os valores obtidos da constante de equilíbrio (K_{eq}) das amostras (Tabela 11 pág. 78) em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) no tempo de 6 h foram menores e com o passar do tempo (120 h) K_{eq} foi aumentando quanto menor a K_{eq} maior é a ΔG .

A energia de ativação (E_a) necessária para que a reação das amostras em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) ocorrerem no tempo de 6 h (Tabela 11 pág. 78) e com o passar do tempo a E_a foi diminuindo devido o fator $\exp(-E_a/RT)$ que representa as colisões entre as moléculas para formar o produto favorecendo na eficiencia catalitica das enzimas em estudo. A Figura 21 ilustra o comportamento da taxa constate de Reação (k) vs a Energia de Ativação (E_a). A Figura 21 ilustra as equações do gráfico obtidas pela linha de tendência em vermelho.

Figura 21 - Taxa Constante de Reação (k) vs Energia de Ativação (E_a).



As amostras em estudo (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) apresentaram mudanças de energia livre que ocorreram durante a reação enzimática. As combinações enzimáticas em estudo apresentaram energia suficiente para superar a barreira de energia do estado de transição e proporcionaram a diminuição da energia de ativação da reação orientando as moléculas em uma posição mais favorável para acelerar uma reação em direção ao seu ponto de equilíbrio.

Os valores obtidos das propriedades termodinâmica da hidrólise enzimática do BCA (E_a , ΔH , ΔG , ΔS , k_{eq} , k) para cada tempo de reação da PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 estão expressos no Apendice IV pág.96.

5 CONSIDERAÇÕES

Os teores de umidade e o rendimento do BCA em base seca foram 88,06% e 11,94%, respectivamente. Os teores médios de cinzas para BCA (*in natura*), PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foram de $5,20 \pm 0,15$; $2,05 \pm 0,03$; $0,62 \pm 0,0$; $0,48 \pm 0,01$ e $0,18 \pm 0,01$ respectivamente. Os teores médios de lignina para BCA (*in natura*), PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foram de $22,30 \pm 0,320$; $20,44 \pm 0,005$; $13,18 \pm 0,007$; $5,95 \pm 0,002$ e $5,49 \pm 0,002$ respectivamente. O pré-tratamento alcalino nas amostras influenciou nos teores médios em base seca, por extrair uma boa parte dos componentes menores e diminuir o teor de lignina, com isso, aumentando a área superficial da estrutura da celulose e facilitando o ataque enzimático.

As análises de MEV ilustraram que o pré-tratamento proporcionou uma abertura na estrutura morfológica do bagaço, tornando a celulose mais expostas para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120, sendo que a melhor foi para a PAC120.

O pré-tratamento alcalino em diferentes temperaturas (PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120) influenciou na conversão de celulose em glicose a partir do bagaço de cana-de-açúcar e as combinações enzimáticas (R1, R2, R3, R4, R5 e R6) utilizadas na hidrólise do BCA também influenciaram nos rendimentos médios obtidos em base seca.

A combinação enzimática que obteve melhor rendimento foi a R2 que foram de 30,64, 44,00, 65,91 e 95,25% para PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 respectivamente. A R2 é a mistura das enzimas (E1) complexo celulásico, (E2) xilanase, (E3) β -glucosidase, sendo que E1 e E3 obtiveram maior atividade enzimática, apesar da E2 apresentar atividade média, não interferiu muito no rendimento.

Os parâmetros cinéticos (V_{max} (g/h), K_m (g), K_{cat} (h), K_m/V_{max} e K_{cat}/K_m) obtido nos ajustes cinéticos da hidrólise enzimática do BCA para a PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foram: V_{max} (g/h) igual a 7,20; 5,12; 4,54 e 0,87 respectivamente; K_m (g) igual a 3,6; 2,56; 2,27 e 2,56 respectivamente; K_{cat} (h) igual a 1,44; 1,02; 0,91 e 0,17 respectivamente; K_m/V_{max} igual a 0,5 para todas as amostras e K_{cat}/K_m igual a 0,4 para todas as amostras.

Os ajustes das cinéticas das reações enzimáticas para os resultados experimentais da PACTA, PAC70, PAC90 e PAC120 foi possível constatar que a

equação Michaelis-Menten e a representação de Lineweaver–Burk foram adequadas para representar a cinética de hidrólise enzimática do BCA.

Analisando todos os resultados apresentados neste trabalho, o pré-tratamento da biomassa em estudo proporcionou um melhor rendimento em todos os processos para a PAC120.

6 REFERÊNCIAS

A.O.A.C - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (**method 926.12**) Arlington: A.O.A.C., chapter 33. p. 5, 1996.

A.O.A.C - Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (**method 900.02**). Arlington: A.O.A.C., chapter 44. p.3, 1996.

A.O.A.C - Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (**method 964.22**) Arlington: A.O.A.C., p. 5, 1984.

A.O.A.C - Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (**method 940.26**). Arlington: 1984.

ABENGOA BIOENERGIA – **The global biotech etanol company**. Disponível em: (<http://www.abengoabioenergy.com/>). Acesso Em 03/08/2014.

AGRO DBO (Tecnologia, produção & Mercado Agro DBO) - **O desafio da Cana** - Ano 10. n. 47, agosto 2013.

ALBARELLI, Juliana Queiroz -**Produção de Açúcar e Etanol de Primeira e Segunda Geração: Simulação, Integração Energética e Análise Econômica**- (Tese de Doutorado) – Campinas, 2013, p. 244.

ALEIXO, Thales Ricardo Teixeira - **Aproveitamento da biomassa de cana para produção de bioetanol** - Araçatuba, SP: Fatec, 2012. (Manografia) - p.63.

ALMEIDA, Ossalin de - **Concentração e Bioensaios Alelopáticos e Antifúngicos de Princípios Ativos da Raiz de Timbó via Extração com CO₂ Supercrítico, Extração com Solventes e Adsorção de Soluções Diluídas em Leito Fixo** - (Tese de Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, 2014, p. 220.

ANDRIETTA, S. R., STECKELBERG, C., ANDRIETTA, M. G. S. **Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda**. MultiCiência, Universidade de Campinas, 2006.

ATALLA, R. H., HACKNEY, J. M., UHLIN I., THOMPSON, N. S. - **Hemicellulose as structure regulators in the aggregation of native cellulose**. International Journal Biological Macromolecules. v.15, p.109-112, 1993.

BACH, Fabiane - **Avaliação das Condições de Produção de Fermentado Acético de Soro de Leite**- Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Dissertação- “Stricto Sensu” em Engenharia Química) Toledo/PR, 2012, p.136.

BARRE, P., BLONDIN, B., DEQUIN, S., FEUILLAT, M., SABLAYROLLES, J. M., ASSO, L. C. **Fisiologia e ecologia microbiana**, I Workshop Tecnológico sobre

Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BARROS, R. **Energia para um novo mundo**. Rio de Janeiro: Monte Castelo Ideias, 2007. 160p.

BAUDEL, Henrique Macedo - **III Workshop Tecnológico sobre: Hidrólise para Produção de Etanol-Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas-Sessão 2: Pré- Tratamento e Hidrólise**, 2007.

BESSA, Sofia Araújo Lima - **Utilização da Cinza do Bagaço da Cana-de-açúcar como Agregado Miúdo em Concretos para Artefatos de Infraestrutura Urbana - (Tese de Doutorado) - São Carlos: UFSCar, 2011, p.182.**

BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico) e CGEE (Social e Centro de Gestão e Estudos Estratégicos). **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2008, p.316. ISBN: 978-85-87545-24-4

BRUNNER, Gerd - **Supercritical process technology related to energy and future directions – An introduction-** The Journal of Supercritical Fluids – Vol. 96, 2014, p. 11–20.

CANDIDO, Rafael Garcia - **Utilização da celulose de resíduos lignocelulósicos para obtenção de produtos de alto valor agregado** (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena 2011, p.141.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. **Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol**. In: 47º Congresso Brasileiro de Química - CBQ, 2007. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/11/11-570-713.htm>. Acessado em 21/outubro/ 2015.

CARVALHO, Mirella Lucas de - **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-açúcar – (Dissertação de Mestrado) – 2011, p.102 - São Carlos: UFSCar.**

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA Jr., Nei - **Produção, Propriedades e Aplicação de Celulases na Hidrólise de Resíduos Agroindustriais** - Quim. Nova, Vol. 33, n. 1, p.181-188, 2010.

CGEE (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos)- **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil**. Brasília-DF, 2009, 536p. ISBN - 978-85-60755-15-8

CHANG, Raymond - **Físico-Química: para as ciências químicas e biológicas;** [tradução técnica] Elizabeth P. G. Arêas, Fernando R. Ornellas - São Paulo: Editora: McGraw-Hill, Vol.1, 3ª Edição, 2008 - ISBN 978-85-7726-062-1.

CHEMMÉS, Camila Sobrinho; SILVA, Fábio Cirqueira da; SOUZA, Lucas Silva; AZEVEDO JUNIOR, Ricardo Almeida de; CAMPOS, Leila Maria Aguilera - **Estudo de Métodos Físico-Químicos no Pré Tratamento de Resíduos Lignocelulósicos para Produção de Etanol de Segunda Geração**. XII SEPA - Seminário Estudantil de Produção Acadêmica, UNIFACS, 2013.

CHEN, H., HAN, Y., XU, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded wheat straw pretreated with alkaline peroxide. *Process Biochemistry*. v.5-9, 2008.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO)- **Acompanhamento da Safra Brasileira – 1º Levantamento cana-de-açúcar abr/2015**. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: 30 Jun. 2015.

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

CORAL, Doris del Socorro Obando - **Indicadores Técnicos - Econômicos das Rotas Termoquímica e Bioquímica para a Obtenção de Biocombustíveis Utilizando Bagaço de Cana para as Condições Brasileiras – (Dissertação de Mestrado) – Itajubá - MG, Março de 2009, p.136.**

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 126p.

D. ALMEIDA, M. L. O. **Celulose e papel. Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**, SENAI, Departamento Regional de São Paulo, Escola Theobaldo De Nigris, 2ªed, v.1, 1988.

DROGUETT, Cristian Eduardo Rodríguez - **Efecto del Uso de Mezclas de Lignocelulosas sobre la Producción de Etanol de Segunda Generación-** (Monografía)- Universidad de Chile Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas - Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología - Santiago de Chile, Mayo 2012, p.79.

DUARTE, Gilvan Caetano - **Holocelulases produzidas por *Aspergillus oryzae*: purificação, caracterização e degradação de biomassa lignocelulósica** - (Tese doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós - Graduação em Biologia Molecular, 2013, p. 223.

EMC (Estudo Municípios Canavieiros) – **Energia das Plantas – Bioeletricidade** - Caderno do Professor, Capítulo 4, 2013. Disponível em: (<http://www.municipios-canavieiros.com.br>). Acesso em: 05/08/2014.

EMMEL, Alexandre - **Caracterização do Efeito da Explosão a Vapor sobre as Propriedades Físico-químicas da Lignina de *Eucalyptus grandis*** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal do Paraná- CURITIBA, 1999, p141.

FAN, L. T., LEE, Y. H. -**Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis**. Adv. Biochem. Eng., v.14, p.101, 1980.

FAO- **A bioenergia e a segurança alimentar na América Latina e o Caribe**. Escritório Regional para América Latina e Caribe, 2010. Disponível em: <<http://www.rlc.fao.org/pr/prioridades/bioenergia/bioseguiridad.htm>>.

FENGEL, Dietrich.; WEGENER, Gerd. **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlim, New YORK, Walter de Gruyter, 1989. ISBN 3-11-012059-3. Acesso em: <https://books.google.com.br>. Disponível em 12/07/2015

FOGLER, H. Scott. - **Elementos de engenharia das reações químicas**. 3ª Ed., Editora: LTC, Rio de Janeiro, 2009, p. 892 - ISBN 9788521617167.

FREY, P. A., HEGEMAN, A. D. **Enzymatic Reaction Mechanisms** - Oxford University Press, 2007, p.852.

GAMBARATO, Bruno Chaboli- **Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena (EEL), 2010, p.100.

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

GHOSE, T. K. **Measurement of cellulose activities**. Pure & Appl. Chem., Vol.59, n.2, Biochemical Engineering Research Centre, Indian Institute of Technology, New Delhi-110016, India ,1987, p.257-268.

GLASSER, W. G., KELLY, S. S. **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**. New York, John Wiley & Sons, Inc. Lignin, p.796-849, 1987.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. **Determinação do teor de lignina em material lenhoso: Método Klason modificado**. O Papel, Vol.47, n.8, 1986, p.36-38.

HALL, M.; BANSAL, P.; LEE, J.H.; REALFF, M.J.; BOMMARIUS, A.S. **Cellulose Crystallinity: a Key Predictor of Enzymatic Hydrolysis Rate**, FEBS Journal, v.277, n.6, p.571-1582, 2010.

HENRISSAT, B. **Cellulases and their interaction with cellulose**. Cellulose v.1, p.169–196, 1994.

INFABIC - **SUBPROJETO 2 – Lignina - Participantes**: Paulo Mazzafera do Instituto de Biologia. Colaboração com X. S. Xie de Harvard. Disponível em: <http://inct-infabic.net.br/subprojeto-2-lignina>. Acesso em: 12.04. 2015.

INTECH- **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization** - Edited by Anuj K. Chandel and Silvio Silvério da Silva, ISBN 978-953-51-1119-1, Publisher: Intech, Chapters published May 15, 2013 under CC BY 3.0 licence DOI: 10.5772/1490, chapter 2, p.284.

KIM, M., AITA, G., DAY, D. F. Compositional changes in sugarcane bagasse on low temperature, long-term diluted ammonia treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* v. 161, p.34-40, 2010.

KLYOSOV, A. A., MITKEVICH O. V., SINITSYN A. P. Role of the activity and adsorption of cellulases in the efficiency of the enzymatic-hydrolysis of amorphous and crystalline cellulose. *Biochemistry*, v.25, p.540–542, 1986.

LEE, K., MOON, S. H. **Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase.** *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.102, p.261-268, 2003.

LEE, S. B., SHIN, H. S., RYU, D. D. Y., MANDELS, M. **Adsorption of cellulase on cellulose – effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis.** *Biotechnology and Bioengineering* v.24, p.2137–2153, 1982.

LUO, L., VOET, E. V. D., HUPPES, G. **Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil.** *Renewable and sustainable energy reviews*, v.615, p.1-7, 2008.

LYND, L. R., WEIMER, P. J., VAN ZYL, W. H., PRETORIUS, I. S. **Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* v.66, p.506–577, 2002.

MARANGONI, Alejandro G., 1965 - **Enzyme kinetics: a modern approach**-Department of Food Science University of Guelph - John Wiley & Sons, Inc – 2003, p.246 - ISBN 0471159859.

MARTÍNEZ, Julián; MARTÍNEZ, J.M. - **Fitting the Sovovás supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool**- *Computers and Chemical Engineering* 32 (2008) 1735–1745.

MATOS, Carolina Roberta Alves de - São Paulo (Estado). Secretaria do Meio Ambiente / Coordenadoria de Biodiversidade e Recursos Naturais- **Etanol e Biodiesel**- 15x23 cm. (Cadernos de Educação Ambiental), 2011, p.116 - ISBN 9788586624827.

MEDVE J., KARLSSON, J., LEE, D. & TJEMELD, F. **Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of enzymes.** *Biotechnol. Bioeng.*, v.59, p.621-634, 1998.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p.141–178, 1980.

MILLER, G. L., **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**, Anal. Chem., n.31, p.426, 1959.

MONTE, Joseana Rocha do - **Sacarificação da polpa celulósica do bagaço de cana-de-açúcar com celulases e xilanases de *Thermoascus aurantiacus*** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena (EEL), 2009, p.138.

MONTEIRO, Douglas Santos - **Reciclagem Química do Jornal para a Produção de Membranas de Acetato de Celulose pelo Processo de Acetilação Homogêneo** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia-Instituto de Química, Julho/2007, p.78.

MOTTA, Valter T. – **Autolab- Análises Clínicas-BIOQUÍMICA BÁSICA**, Capítulo 3, Editora: MEDBOOK, 2ª Edição, 2011,p.34 - ISBN: 8599977660.

MOUTTA, Rondinele de Oliveira - **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol** – (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena, 2009, p. 101.

NAKANISHI, Simone Coelho - **Utilização dos componentes lignocelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar para produção de membranas** – (Dissertação de Mestrado) -Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena (EEL), 2010, p.86.

NC-IUBMB - **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. In consultation with the IUPAC-IUBMB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN) Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html> >Acesso em: 09 Jul. 2015.

NELSON, Davi. L.; COX, Michael M. - **Lehninger Princípios de Bioquímica**. Trad. A. A Simões e W. R. N Lodi. 3a ed. São Paulo: Sarvier, 2002, p.896.

NETO, A. Q. M. **Álcool Combustível**. Série Indústria em Perspectiva. Instituto Brasília: Euvaldo Lodi, 2008.

NOVOZYMES' CELLULOSIC ETHANOL ENZYME KIT- **Enzymes for hydrolysis of lignocellulosic materials** – According to Regulation N° 453/2010-www.bioenergy.novozymes.com

O'DWYER, J. P., ZHU, L., CESAR, B. G., MARK, T. H. **Enzymatic hydrolysis of lime-pretreated corn stover and investigation of the HCH-1 Model: Inhibition pattern, degree of inhibition, validity of simplified HCH-1 Model**. Bioresource Technology. v. 98, p.2969–2977, 2007.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise F. S. - **Hidrólise Enzimática de Biomassa**-Quimica Nova, Vol. 33, n. 7, 1549-1558, 2010.

PHILIPPINI, Rafael Rodrigues- **Variedades híbridas de bagaço de cana-de-açúcar: caracterização química e hidrólise enzimática em condições de pré-tratamento diferenciadas** – (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo- Escola de Engenharia de Lorena (EEL)- p.84, 2012.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 180p. Disponível em: <<http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000418358>>. Acesso em 25 Jun. 2015.

RACKER, E. **History of the Pasteur effect and its pathobiology.** In: Mol Cell Biochem. v.5(1-2), p.17-23, 1974. PMID 4279327, doi:10.1007/BF01874168

REGINATTO, Valeria - **Estudo das enzimas produzidas por Trichoderma loni-brachiatum responsáveis pela degradação de materiais celulósicos** – (Dissertação de Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos- São Paulo-CAMPINAS, 1992, p.168.

RIBEIRO, Márcia Almeida - **Pré-tratamento do Bagaço de Cana Utilizando o Processo de Oxidação Avançada por Feixe de Elétrons para Hidrólise Enzimática da Celulose-** (Tese de Doutorado)- Ciências na Área de Tecnologia Nuclear Aplicações - Autarquia Associada à Universidade de São Paulo (IPEN)-2013, p.100.

ROCHA, G. J. M., GONÇALVES, A. R., OLIVEIRA, B. R., OLIVARES, E. G., ROSSELL, C. E. V. **Steam Explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production.** Industrial Crops and Products, v.35, n.1, p.274-279, 2012.

ROSA, Claudia Adriana Broglio da - **Influência do Teor de Lignina da Madeira de *Eucalyptus globulus* na Produção e na Qualidade da Celulose Kraft-** (Dissertação de Mestrado)-Universidade Federal de Santa Maria UFSM, RS, 2003, p.149.

ROSA, S. E. S., GARCIA, J. L. F. **O etanol de segunda geração: limites e oportunidades.** Revista do BNDES, v.32, p.117-156, 2009.

ROSSELL, C. E. V. - **Chemistry and Processing of Sugarbeet and Sugarcane-** edited by M. A. Clarke and M. A. Godshall Elsevier Science Publishers B.V.- Printed in the Netherlands - Chapter 22- Sugarcane Processing to Ethanol for Fuel Purposes. Amsterdam, 1988, p. 349-366.

SALIBA, Eloísa de Oliveira Simões; RODRIGUEZ, Norberto Mário; MORAIS, Sérgio Antônio Lemos de; PILÓ-VELOSO, Dorila - **Ligninas - Métodos de obtenção e caracterização química** - Ciência Rural, Santa Maria, Vol.31, n.5, 2001, p.917-928- ISSN 0103-8478.

SANTOS, A. L. F., KAWASE, FAUSTA K. Y., COELHO, G. V. **Enzymatic Saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide**. The Journal of Supercritical Fluids, Rio de Janeiro, 2011, p.277-282.

SANTOS, Iris Dias- **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extrativos na densidade básica, contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**- Departamento de Ciências Florestais - (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Universidade de Brasília, 2008, p.57.

SANTOS, Julliana Ribeiro Alves dos; GOUVEIA, Ester Ribeiro- **Produção de Bioetanol de Bagaço de Cana-de-açúcar** - Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, Vol.11, n.1, 2009, p.27-33- ISSN 1517-8595.

SANTOS, Victor Tabosa de Oliveira - **Composição e digestibilidade enzimática do bagaço de cana-de-açúcar prétratado com ácido sulfúrico diluído em reator estático** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena 2010. p.103.

SAURO, H. M. - **Enzyme Kinetics for Systems Biology** - University of Washington Seattle, WA –Editora: Ambrosius Publishing - Copyright © 2009-2011-First Edition, version 1.01, 2011, p.318.

SCHLITTLER, Luiz André Felizardo Silva - **Mapeamento do conhecimento tecnológico da cadeia produtiva do etanol de segunda geração por rota bioquímica**– (Tese de Doutorado) - Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química Rio de Janeiro, 2012. xxii, 29,7 cm, p.239.

SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida; AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter - **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica** Vol. 2- Editora Edgard Blücher LTDA - São Paulo, 2001, p.554.

SEGEL, I. H. Cap I: **Enzymes as biological catalysts. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems**. New York: John Wiley, p 1-17, 1975.

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

SILVA, J. C., GOUVEIA, E. R. **Algumas propriedades de endoglucanas produzidas por Streptomyces spp. em meio à base de bagaço de cana-de-açúcar**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v.2, n.2, p.60-70, 2008.

SILVA, Vanessa Souza; GARCIA, Carla de Almeida; SILVA, Cláudio Medeiros da - **O Destino do Bagaço da Cana-de-açúcar: um estudo a partir das**

agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná - Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, Vol.3, n.1, jan./abr. 2010, p. 59-76 - ISSN 1981-9951.

SIMÕES, J. (2005) **Orçamento do Centro de Tecnologia Canavieira deve triplicar até 2010**; maior linha de pesquisa é com variedades de cana. NOTÍCIAS DA INOVAÇÃO Centro de Tecnologia Canavieira. Disponível em: <http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/news-ctc1.php>. Acesso: 19 Jun. 2015.

SOARES, P. A., ROSSELL, C. E. V. **O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico**. São Paulo: NAIPPE USP; 2007. Disponível em: <http://www.novacana.com/pdf/estudos/Livro_Naippe_Vol2.pdf>. Acesso em: 25 Set. 2014.

SOUZA, Cristiano Soares de – **Derivatização Química e Caracterização de uma Lignina do Bagaço da Cana-de-açúcar**- (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química–MG, 2006, p.79.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. TAPPI T-222 om-06. Acid insoluble lignin in Wood and pulp, in Tappi Test Methods. Atlanta, GA, 2006.

US.DOE.2006 - **Breaking the Biological Barriers to Cellulosic Ethanol**: A Joint Research Agenda, DOE/SC-0095, U.S. Departamento of Energy Office Science of Energy Efficiency and Renewable Energy (www.doegenomestolife.org/biofuels/).

VANNICE, M. Albert - **Kinetics of Catalytic Reactions**- Springer Science/Business Media, Inc. 2005, p.256 - ISBN: ISBN-10: 0-387-24649-5; e-ISBN: 0-387-25972-4; ISBN-13: 978-0387-24649-9.

VILLEN, R. A. **Mauá: biotecnologia: histórico e tendências**. Mauá: Escola de Engenharia de Mauá, 2009.

WANDERLEY, Maria Carolina de Albuquerque- **Hidrólise enzimática de bagaço de cana de açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processos SHF** - (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas/Ambientais, Recife, 2012, p.97.

WANG, N. S. **Glucose assay by dinitrosalicylic colorimetric method**. Disponível em: <http://terpconnect.umd.edu/~nsw/ench485/lab4a.htm>. Acesso em: jan ago 2013.

WOLF, Lúcia Daniela - **Pré-tratamento Organossolve do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol e Obtenção de Xilooligômeros**- (Dissertação de Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 2011, p.147.

WOOD, T. M., MACCRAE, S. I. *Synergism between enzymes involved in the solubilization of native cellulose*. In Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of

Enzymatic and Acid Catalysis, Chapter 10, p.181–209, *Advances in Chemistry*, v.181, 1979.

WOOLEY, Robert; Mark Ruth, John Sheehan; Kelly Ibsen; Henry Majdeski; Adrian Galvez- **Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis Current and Futuristic Scenarios-** National Renewable Energy Laboratory (NREL)- July 1999 • NREL/TP-580-26157.

ZHANG, Y. H. P., LYND, L. R. **Towards an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems.** Biotechnology and Bioengineering, New York, v.88, p.797-824, 2004.

ZHOU, Chun-Hui; XIA, Xi; Lin, CHUN-XIANG; TONG, Dong-Shen; BELTRAMINI, Jorge **-Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels-** Received 5th May 2011, 40, 5588–5617- DOI:10.1039/c1cs15124j.

APENDICE I - Dados experimentais da curva de secagem do BCA.

| Tempo [h] | m₂ [g] | m₃ [g] | T_{amb.} [°C] | Amostra [%] | m_{H₂O} [g] | Umidade [%] |
|------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|
| 0 | 5650,82 | 5000,00 | 29,5 | 100,00 | 0,00 | 0,00 |
| 24 | 4327,86 | 3677,04 | 28,50 | 73,54 | 1322,96 | 26,46 |
| 48 | 3593,30 | 2942,48 | 29,00 | 58,85 | 2057,52 | 41,15 |
| 72 | 2998,34 | 2347,52 | 28,00 | 46,95 | 2652,48 | 53,05 |
| 96 | 2424,75 | 1773,93 | 28,00 | 35,48 | 3226,07 | 64,52 |
| 120 | 2126,16 | 1475,34 | 30,00 | 29,51 | 3524,66 | 70,49 |
| 144 | 1779,82 | 1129,00 | 28,50 | 22,58 | 3871,00 | 77,42 |
| 168 | 1491,69 | 840,87 | 29,00 | 16,82 | 4159,13 | 83,18 |
| 192 | 1247,80 | 596,98 | 30,00 | 11,94 | 4403,02 | 88,06 |

Nota: Bandeja Vazia = **m₁** = 650,82 g; **m₂** = Bandeja + Amostra (BCA); **m₃** = Massa da Amostra,
T = 50 ± 2 °C, V_{ar} = 0,5 m.s⁻¹.

APENDICE II- Dados experimentais de cinzas e lignina total.

Tabela A: Dados experimentais de cinzas.

| T [°C] | m1 [g] | m2 [g] | m3 [g] | (m ₁ + C) [g] | Cinzas [g] | Cinzas [%] |
|--------|---------|--------|---------|--------------------------|------------|------------|
| PACTA | 28,3857 | 1,0000 | 29,3857 | 28,4066 | 0,0209 | 2,09 |
| | 25,8166 | 1,0007 | 26,8173 | 25,8369 | 0,0203 | 2,03 |
| | 26,5589 | 1,0022 | 27,5611 | 26,5793 | 0,0204 | 2,04 |
| PAC70 | 28,3860 | 1,0070 | 29,3930 | 28,3921 | 0,0061 | 0,61 |
| | 25,8102 | 1,0210 | 26,8312 | 25,8167 | 0,0065 | 0,64 |
| | 26,5601 | 1,0091 | 27,5692 | 26,5663 | 0,0062 | 0,61 |
| PAC90 | 28,3858 | 1,0238 | 29,4096 | 28,3908 | 0,0050 | 0,49 |
| | 25,8025 | 1,0341 | 26,8366 | 25,8074 | 0,0049 | 0,47 |
| | 26,5539 | 1,0116 | 27,5655 | 26,5587 | 0,0048 | 0,47 |
| PAC120 | 26,5347 | 1,0331 | 27,5678 | 26,5365 | 0,0018 | 0,17 |
| | 26,6532 | 1,0076 | 27,6608 | 26,6551 | 0,0019 | 0,19 |
| | 25,8846 | 1,0015 | 26,8861 | 25,8864 | 0,0018 | 0,18 |

Nota: m₁ = Cadinho; m₂ = Massa da Amostra; m₃ = Cadinho + Amostra (BCA) e C = cinzas.

Tabela B: Dados experimentais de lignina total.

| T [°C] | BCA [g] | P [g] | (P + BCA) [g] | (BCA + R) [g] | Resíduo [g] | Lignina [%] |
|--------|---------|--------|---------------|---------------|-------------|-------------|
| PACTA | 5,0621 | 1,0000 | 6,0621 | 6,2665 | 0,2044 | 20,44 |
| | 5,0334 | 1,0022 | 6,0356 | 6,2511 | 0,2155 | 21,50 |
| | 5,0376 | 1,0361 | 6,0737 | 6,2818 | 0,2081 | 20,08 |
| PAC70 | 5,0087 | 1,0010 | 6,0097 | 6,1479 | 0,1382 | 13,81 |
| | 5,0492 | 1,0000 | 6,0492 | 6,1701 | 0,1209 | 12,09 |
| | 5,0081 | 1,0030 | 6,0111 | 6,1433 | 0,1322 | 13,18 |
| PAC90 | 5,0098 | 1,0020 | 6,0118 | 6,0751 | 0,0633 | 6,32 |
| | 5,0433 | 1,0011 | 6,0444 | 6,1032 | 0,0588 | 5,87 |
| | 5,0062 | 1,0006 | 6,0068 | 6,0663 | 0,0595 | 5,95 |
| PAC120 | 5,0445 | 1,0311 | 6,0756 | 6,1342 | 0,0586 | 5,68 |
| | 5,0401 | 1,0046 | 6,0447 | 6,0999 | 0,0552 | 5,49 |
| | 5,0083 | 1,0008 | 6,0091 | 6,0632 | 0,0541 | 5,41 |

Nota: P + BCA

APENDICE III- Taxas de conversão do processo de hidrólise enzimática do BCA.

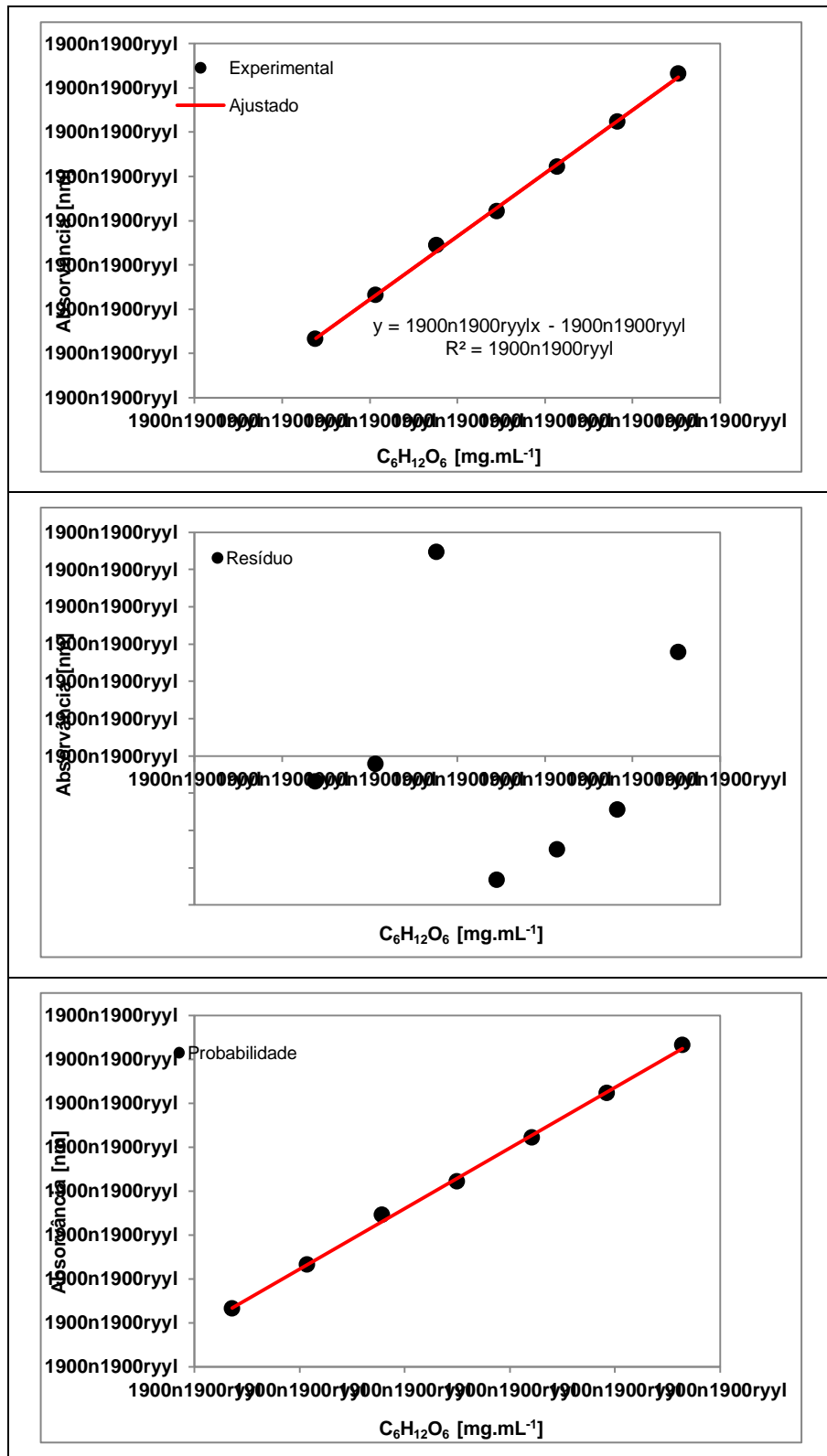
| t [h] | PACTA | | PAC70 | | PAC90 | | PAC120 | |
|-------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Glicose [g.L ⁻¹] | Celulose [g.L ⁻¹] | Glicose [g.L ⁻¹] | Celulose [g.L ⁻¹] | Glicose [g.L ⁻¹] | Celulose [g.L ⁻¹] | Glicose [g.L ⁻¹] | Celulose [g.L ⁻¹] |
| 0 | 0 | 9,4444 | 0 | 9,4444 | 0 | 9,4444 | 0 | 9,4444 |
| 6 | 0,1107 | 9,3337 | 0,1585 | 9,2859 | 0,1225 | 9,3219 | 0,6644 | 8,7800 |
| 12 | 0,2359 | 9,2085 | 0,6983 | 8,7461 | 0,2796 | 9,1648 | 1,4155 | 8,0289 |
| 24 | 0,3888 | 9,0556 | 1,3893 | 8,0551 | 0,5413 | 8,9031 | 2,5672 | 6,8772 |
| 48 | 0,6321 | 8,8123 | 2,2531 | 7,1913 | 0,9089 | 8,5355 | 3,6469 | 5,7975 |
| 72 | 0,9581 | 8,4863 | 2,9175 | 6,5269 | 1,5487 | 7,8957 | 5,2174 | 4,2270 |
| 96 | 1,5339 | 7,9105 | 3,6085 | 5,8359 | 2,9883 | 6,4561 | 6,6570 | 2,7874 |
| 120 | 2,2537 | 7,1907 | 4,3283 | 5,1161 | 4,9078 | 4,5366 | 8,5764 | 0,8680 |

APENDICE IV - Propriedades Termodinâmica da hidrólise enzimática do BCA.

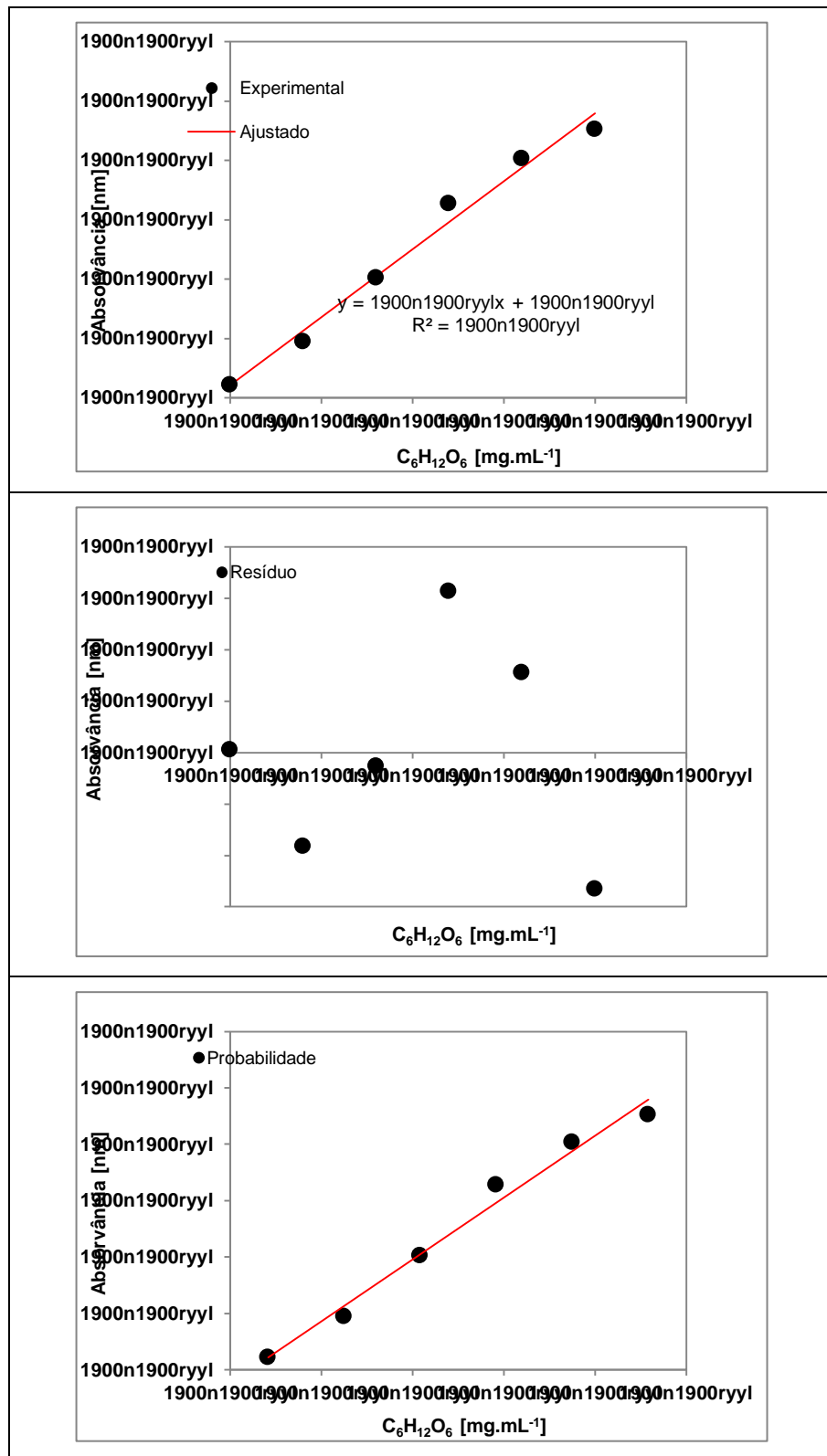
| PACTA | | | | | | |
|--------|----------|------------|------------|------------|----------|------------|
| t [h] | Ea | ΔH | ΔS | ΔG | k_{eq} | k |
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 30542,47 | 27855,64 | -123,07 | -11913,98 | 0,0119 | 3,6499E-05 |
| 12 | 30179,08 | 27492,25 | -115,54 | -9845,58 | 0,0256 | 4,1785E-05 |
| 24 | 29601,45 | 26914,62 | -109,46 | -8458,35 | 0,0429 | 5,1806E-05 |
| 48 | 28293,83 | 25607,00 | -101,15 | -7079,36 | 0,0717 | 8,4284E-05 |
| 72 | 27421,09 | 24734,26 | -94,68 | -5860,79 | 0,1129 | 1,1663E-04 |
| 96 | 25747,39 | 23060,56 | -85,00 | -4407,42 | 0,1939 | 2,1744E-04 |
| 120 | 24925,75 | 22238,92 | -78,47 | -3117,30 | 0,3134 | 2,9523E-04 |
| PAC70 | | | | | | |
| t [h] | Ea | ΔH | ΔS | ΔG | k_{eq} | k |
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 29751,50 | 27064,67 | -117,60 | -10936,94 | 0,0171 | 5,2371E-05 |
| 12 | 26355,66 | 23668,83 | -94,26 | -6791,38 | 0,0798 | 1,8535E-04 |
| 24 | 25501,71 | 22814,88 | -85,21 | -4722,01 | 0,1725 | 2,5469E-04 |
| 48 | 24639,90 | 21953,06 | -77,58 | -3118,23 | 0,3133 | 3,5101E-04 |
| 72 | 25061,82 | 22374,99 | -75,93 | -2163,40 | 0,4470 | 3,0000E-04 |
| 96 | 24676,21 | 21989,38 | -72,04 | -1291,60 | 0,6183 | 3,4630E-04 |
| 120 | 24239,89 | 21553,06 | -68,09 | -449,23 | 0,8460 | 4,0736E-04 |
| PAC90 | | | | | | |
| t [h] | Ea | ΔH | ΔS | ΔG | k_{eq} | k |
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 30530,67 | 27843,84 | -11638,95 | -122,18 | 0,0131 | 4,0407E-05 |
| 12 | 29823,23 | 27136,40 | -9376,74 | -112,99 | 0,0305 | 5,2578E-05 |
| 24 | 28389,04 | 25702,21 | -7523,55 | -102,82 | 0,0608 | 8,9666E-05 |
| 48 | 27381,38 | 24694,55 | -6017,94 | -95,04 | 0,1065 | 1,3047E-04 |
| 72 | 25731,21 | 23044,38 | -4376,60 | -84,86 | 0,1961 | 2,4112E-04 |
| 96 | 23181,14 | 20494,30 | -2069,73 | -69,83 | 0,4629 | 6,2291E-04 |
| 120 | 21673,14 | 18986,31 | 211,27 | -58,10 | 1,0818 | 1,0919E-03 |
| PAC120 | | | | | | |
| t [h] | Ea | ΔH | ΔG | ΔS | k_{eq} | k |
| 0 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 31062,29 | 28375,46 | -6935,51 | -109,27 | 0,0757 | 2,2574E-04 |
| 12 | 30515,04 | 27828,21 | -4663,11 | -100,55 | 0,1763 | 2,7674E-04 |
| 24 | 29040,21 | 26353,38 | -2647,58 | -89,74 | 0,3733 | 4,7914E-04 |
| 48 | 28776,76 | 26089,93 | -1245,47 | -84,59 | 0,6290 | 5,2850E-04 |
| 72 | 27124,06 | 24437,23 | 565,57 | -73,87 | 1,2343 | 9,7765E-04 |
| 96 | 26382,27 | 23695,44 | 2339,02 | -66,09 | 2,3882 | 1,2885E-03 |
| 120 | 23613,86 | 20927,03 | 6154,55 | -45,71 | 9,8812 | 3,6105E-03 |

Nota: Ea, ΔH , ΔG , ΔS , k em [mol.L⁻¹.h⁻¹], k_{eq}

APENDICE V – Curva de calibração de glicose I, resíduo e probabilidade.



APENDICE VI – Curva de calibração de glicose II, resíduo e probabilidade.



ANEXO I - Descrição de enzimas contidas em Novozymes no kit celulósico enzimático de etanol.

| Ns number | Enzyme type | Description |
|-----------|--------------------------------|--|
| NS22086 | Cellulase complex | <ul style="list-style-type: none"> - Primary enzyme for use in the hydrolysis of lignocellulosic material - Catalyzes the breakdown of cellulosic material into glucose, cellobiose, and higher glucose polymers - Can be used to reduce the viscosity or increase the extraction yield of various products of plant origin - The main reaction products of cellulose hydrolysis using NS22086 are cellobiose and glucose - Testing for synergy with NS22118 and NS22083 is recommended to maximize performance |
| NS22083 | Xylanase | <ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxyylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods) |
| NS22118 | β -glucosidase | <ul style="list-style-type: none"> - Purified endoxyylanase with a high specificity toward soluble pentosans - Able to liberate pentose sugars from biomass hemicellulose fractions - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods) |
| NS22119 | Enzyme complex | <ul style="list-style-type: none"> - Contains a wide range of carbohydrases, including arabinase, β-glucanase, cellulase, hemicellulase, pectinase, and xylanase - Can break down cell walls for the extraction of useful components from plant tissue - Able to liberate bound materials and degrade a variety of nonstarch polysaccharides - Can be used to supplement NS22086 for substrates containing pectin |
| NS22002 | β -glucanase Xylanase | <ul style="list-style-type: none"> - Contains a mixture of β-glucanase and xylanase enzyme activities - Possesses additional side activities, including cellulase, hemicellulase, and pentosanase - Can be used to supplement NS22086 for pretreatment that leaves a significant portion of the hemicellulose intact (i.e., neutral-pH or alkaline pretreatment methods) |
| NS22035 | Glucoamylase | <ul style="list-style-type: none"> - Used on liquefied starch-containing substrates to produce sugars for fermentation - Works in dedicated saccharification stages as well as simultaneous saccharification and fermentation - Glucoamylases hydrolyze both 1,4- and 1,6-alpha linkages to liberate glucose for subsequent fermentation by the yeast |

Fonte. NOVOZYMES, 2010.

ANEXO II - Atividade da enzima, densidade, pH, temperatura e dosagem recomendada.

| Enzyme classification | Activity ¹ | Density ² (g/mL) | pH | Temperature (°C) | Dosage ³ (% w/w ts) |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------|------------------|--------------------------------|
| NS22086 Cellulase complex | 1,000 BHU(2)/g | 1.15 | 5.0–5.5 | 45–50 | 1–5% |
| NS22083 Xylanase | 2,500 FXU-S/g | 1.09 | 4.5–6.0 | 35–55 | 0.05–0.25% |

| | | | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|------|---------|-------|------------|
| NS22118 β -glucosidase | 250 CBU/g | 1.2 | 2.5–6.5 | 45–70 | 0.2–0.6% |
| NS22119 Enzyme complex | 100 FBG/g (~ 13,700 PGU/g) | 1.19 | 4.5–6.0 | 25–55 | 0.05–0.4% |
| NS22002 Hemicellulase | 45 FBG/g (~ 470 FXU/g) | 1.20 | 5.0–6.5 | 40–60 | 0.4–2% |
| NS22035 Glucoamylase | 750 AGU/g | 1.15 | 4.5–5.5 | 60–70 | 0.01–0.06% |

Fonte. NOVOZYMES, 2010.