

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA DA SILVA

***ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTA CONSISTÊNCIA DE
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS***

CURITIBA

2012

LARISSA DA SILVA

***ESTUDO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTA CONSISTÊNCIA DE
MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, sub-área de Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo suporte constante, mesmo que na distância.

Aos meus amigos, namorado e família, que compreenderam a minha ausência nos momentos de dedicação exclusiva à realização deste e sempre me apoiaram a seguir adiante.

Aos membros do grupo CEPESQ, especialmente a(o)s colegas Ana Paula Pitarelo, Annielly Ballem, Arion Zandoná Filho e Marcos Henrique Silveira, que contribuíram diretamente com o desenvolvimento do projeto. Também aos colegas Fabiano Rosa da Silva, Francis Josiane Baumgardt e Michael Prado, pelo convívio diário.

Ao professor Dr. Luiz Pereira Ramos, pela orientação, paciência e ensinamentos constantes.

Ao CNPq e a Capes, pela concessão das bolsas.

A Novozymes Latin America, pelo fornecimento dos preparados enzimáticos e por contribuições realizadas ao longo da execução do trabalho.

RESUMO

A produção de etanol celulósico a partir da hidrólise enzimática da biomassa é uma alternativa importante para a crescente demanda por biocombustíveis. No entanto, para que esta alternativa se torne uma realidade, algumas barreiras devem ser superadas como o alto custo das enzimas, limitações na transferência de massa em reatores de alta consistência, inibição pelo produto da reação e adsorção inespecífica e/ou irreversível sobre o substrato, especialmente quando se faz uso de substratos lignificados e em elevadas concentrações de sólidos totais. O principal objetivo deste trabalho foi o de produzir elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis através de experimentos de hidrólise enzimática em alta consistência. Os ensaios foram conduzidos por 96 h a 50 °C usando o complexo enzimático Cellic CTec2 (Novozymes) e, como substratos, uma polpa kraft deslignificada de eucalipto e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor na presença de ácido fosfórico, sendo que as conversões das reações de hidrólise foram monitoradas por cromatografia a líquido de alta eficiência. Os experimentos foram organizados na forma de um delineamento experimental do tipo compósito central de face centrada, usando as seguintes variáveis em níveis máximo e mínimo: concentração de complexo enzimático (0,1 e 0,025 g.g⁻¹ de celulose), consistência de substrato (5 e 20 %) e intensidade de agitação (150 e 200 rpm). A maior conversão para o bagaço de cana pré-tratado a vapor, após 72 h de hidrólise, foi 92,5 % (25,7 g.L⁻¹), empregando 5 % de sólidos totais, 0,1 g de complexo enzimático.g⁻¹ de celulose e 200 rpm. O experimento correspondente para a polpa kraft também foi um dos de maior conversão (com 100 % de conversão mássica), juntamente com o que se diferencia deste apenas na concentração de complexo enzimático que, neste caso, foi de 0,025 g.g⁻¹ de celulose. No entanto, a maior quantidade de açúcares passíveis de fermentação foi produzida em experimentos conduzidos a 20 % de sólidos totais, dos quais se produziu 76,8 g.L⁻¹ de equivalentes de glucose a partir do bagaço pré-tratado a vapor (conversão mássica de 69,2 %) e 125,1 g.L⁻¹ a partir da polpa kraft deslignificada (conversão mássica de 74,2 %). Portanto, o preparado enzimático Cellic CTec2 foi capaz de produzir altas taxas de conversão da celulose presente no substrato pré-tratado, mesmo quando a reação foi realizada em elevada concentração de sólidos totais e quantidades de complexo enzimático relativamente baixas. Este desempenho foi também muito superior ao obtido com a mesma quantidade de uma mistura 10:3 entre Celluclast 1.5L FG e Novozym 188, nas mesmas condições, indicando vantagens quanto o uso do preparado comercial de Cellic CTec2 com relação a minimizar problemas relacionados à adsorção não produtiva sobre o substrato e à inibição retroativa. Além disso, os resultados do planejamento fatorial foram estatisticamente validados para ambos os substratos, tendo sido observada uma boa correlação entre o modelo matemático desenvolvido e os resultados obtidos experimentalmente.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar, polpa kraft deslignificada, hidrólise enzimática, alta consistência, Cellic CTec2, etanol celulósico.

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis of biomass is an important alternative to the growing demand for liquid fuels. However, some challenges must be overcome such as enzyme cost, mass transfer limitations, end-product inhibition and unproductive/irreversible adsorption, especially when using lignified substrates in high solid concentrations. The main objective of this work was to produce high concentrations of fermentable sugars using enzymatic hydrolysis at high total solids. Experiments were carried out for 96 h at 50 °C using Cellic CTec2 (Novozymes) and two cellulosic substrates, a delignified eucalyptus kraft pulp and phosphoric acid-impregnated steam-treated cane bagasse, with the reaction conversions always being monitored by high performance liquid chromatography (HPLC). All experiments were organized in a central composite face-centered design (CCFD) using the following variables within two levels (maximum and minimum): enzyme concentration (0.1 and 0.025 g.g⁻¹ cellulose), substrate consistency (5 and 20 wt%) and agitation intensity (150 and 200 rpm). The highest conversion of pretreated sugar cane bagasse at 72 h was 92.5 % (25.7 g.L⁻¹), obtained with 0.1 g of enzyme.g⁻¹ of cellulose, 5 wt% total solids and 200 rpm. The corresponding experiment with the eucalyptus kraft pulp was also the one with the highest conversion (100 % at 72 h). The other experiment with this substrate that reached 100 % conversion was the one mentioned in which the enzyme loading was lower (0,025 g.g⁻¹ of cellulose). However, the highest amount of fermentable sugars was derived from experiments carried out at 20 wt% total solids, producing 76.8 g.L⁻¹ of glucose equivalent from steam-treated bagasse (corresponding to a cellulose conversion of 69.2 wt%) and 125,1 g.L⁻¹ from the eucalyptus kraft pulp (corresponding to a cellulose conversion of 74.2 wt%). Therefore, the Cellic CTec2 enzymes were able to produce high saccharification levels of lignified cellulosic substrates even under high total solids and relatively low enzyme loadings, showing a performance by far superior to that obtained with the same loading of a Celluclast 1.5L enriched with Novozym 188 at a 10:3 ratio. This superiority may be due to a lower susceptibility to problems related with end-product inhibition as well as to the non-productive adsorption of enzyme components on lignin-carbohydrate complexes. Also, the results of the factorial design were statistically valid for both substrates and an excellent correlation was observed between the mathematical model and the experimental data.

Key words: Sugar cane bagasse, eucalypt kraft pulp, enzymatic hydrolysis, high total solids, Cellic CTec2, cellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA TÍPICA DE UMA HETEROXILANA DE GRAMÍNEAS, EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE SUBSTITUINTES ACETIL, ARABINOFURANOSIL E 4-O-METILGLUCURONOSIL LIGADOS COVALENTEMENTE À CADEIA LINEAR.	18
FIGURA 2 - ALCOÓIS PRECURSORES DA LIGNINA: <i>P</i> -CUMÁRICO (A), CONIFERÍLICO (B) E SINAPÍLICO (C).....	19
FIGURA 3 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DO BIOETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	22
FIGURA 4 - MODO DE AÇÃO CATALÍTICA PROPOSTO PARA AS CELULASES DE <i>HYPOCREA JECORINA</i>	26
FIGURA 5 - HIDRÓLISE COMPARATIVA DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, EMPREGANDO A MESMA MASSA DE CELLIC CTEC2 E DA MISTURA CELLUCLAST:NOVOZYM.....	45
FIGURA 6 - HIDRÓLISE COMPARATIVA DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR, EMPREGANDO A MESMA CARGA ENZIMÁTICA DE CELLIC CTEC2 E DA MISTURA CELLUCLAST:NOVOZYM.	46
FIGURA 7 - HIDRÓLISE EXPRESSA EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE E EM XILOSE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR AO LONGO DE 96 H USANDO CELLIC CTEC2 (A) E CELLUCLAST:NOVOZYM (B).	48
FIGURA 8 - HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA EM 5 % (A), 12,5 % (B) E 20 % (C) DE CONSISTÊNCIA, COM OS RESULTADOS EXPRESSOS EM G.L ⁻¹ AO LONGO DE 96 H DE INCUBAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.....	50
FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA HIDRÓLISE EM CONVERSÃO MÁSSICA (A) E EM GRAMA POR LITRO (B), CONSIDERANDO QUE OS 5 E 20 % DE CONSISTÊNCIA CORRESPONDEM A TOTALIDADE DE MATERIAL HIDROLISÁVEL.....	51
FIGURA 10 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (% , A) E EM G.L ⁻¹ (B).	52
FIGURA 11 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (% , A) E EM G.L ⁻¹ (B).	53

FIGURA 12 - HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM 5 % (A), 12,5 % (B) E 20 % (C) DE CONSISTÊNCIA, COM OS RESULTADOS EXPRESSOS EM G.L ⁻¹ AO LONGO DE 96 H DE INCUBAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.....	57
FIGURA 13 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), (A) E EM G.L ⁻¹ (B).....	58
FIGURA 14 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), (A) E EM G.L ⁻¹ (B).....	59
FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO EM CUBO E DE SUAS RESPECTIVAS FACES CENTRADAS DO PF DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2, RESULTADOS EM G.L ⁻¹ DAS CONVERSÕES DE 24 H EM (A) E (B), E DE 72 H EM (C) E (D).....	61
FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 24 H DE HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, CORRELACIONANDO INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).....	63
FIGURA 17 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 72 H DE HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, CORRELACIONANDO INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).....	64
FIGURA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS OBTIDOS DAS HIDRÓLISES DO PF USANDO POLPA KRAFT PARCIALMENTE DESLIGNIFICADA COMO SUBSTRATO, RESULTADOS DE 24 H (A) E 72 H (B).....	66
FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO EM CUBO E DE SUAS RESPECTIVAS FACES CENTRADAS DO PF DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2, RESULTADOS EM G.L ⁻¹ DAS CONVERSÕES DE 24 H EM (A) E (B), E DE 72 H EM (C) E (D).....	67
FIGURA 20 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 24 H DE HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR, CORRELACIONANDO CONCENTRAÇÃO DE	

COMPLEXO ENZIMÁTICO E INTENSIDADE DE AGITAÇÃO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).....	70
FIGURA 21 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 72 H DE HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR, CORRELACIONANDO CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E INTENSIDADE DE AGITAÇÃO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).....	71
FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS OBTIDOS DAS HIDRÓLISES DO PF USANDO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMO SUBSTRATO, RESULTADOS DE 24 H (A) E 72 H (B).....	72
FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO SURFACTANTE LUTENSOL ON70 EM CONTATO COM A COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC CTEC2.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA <i>IN NATURA</i>	21
TABELA 2 - VARIÁVEIS USADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COM FACE CENTRADA QUE FORAM EMPREGADAS NOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	41
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS USADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA. .	43
TABELA 4 - HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA E SEUS RENDIMENTOS EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO FATORIAL APÓS 24 E 72 H DE REAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.	49
TABELA 5 - HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS RENDIMENTOS EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO FATORIAL EM 24 E 72 H EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.	55
TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM A POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA.	62
TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM A POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA.	62
TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR.....	69
TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR.....	69

LISTA DE SIGLAS

ART – açúcar redutor

BCA – ácido bicinconínico

BSA – albumina do soro bovino

CF – co-fermentação

EqGlc – equivalentes de glucose

MM – massa molecular

FPU – unidades de papel de filtro

PF – planejamento fatorial

rpm – rotações por minuto

SHF – hidrólise e fermentação separados

SSCF – sacarificação e co-fermentação simultâneas

SSF – sacarificação e fermentação simultâneas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	17
2.2 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	20
2.3 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	24
2.4 MODO DE AÇÃO DAS CELULASES DE <i>Hypocrea jecorina</i>	25
2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTA CONSISTÊNCIA	30
3 OBJETIVOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor	34
4.2.2 Preparo da polpa kraft deslignificada para a hidrólise enzimática	35
4.2.3 Determinação da atividade enzimática	35
4.2.4 Determinação de proteína	37
4.2.5 Composição química dos substratos celulósicos	38
4.2.6 Hidrólise enzimática	40
4.2.7 Análise estatística dos dados dos planejamentos fatoriais	41
4.2.8 Hidrólise enzimática na presença de surfactante	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	43

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO	44
5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL USANDO POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA. ...	48
5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL USANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR EXLPOÇÃO A VAPOR.....	54
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA	60
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR	66
5.7 EFEITO DO SURFACTANTE.....	72
6 CONCLUSÃO.....	75
7 REFERÊNCIAS	77
APÉNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

O etanol pode ser obtido a partir de diferentes tipos de biomassas e por diferentes tecnologias de conversão, sendo que estas podem ser de primeira ou de segunda geração. Enquanto as tecnologias de primeira geração estão baseadas na fermentação da sacarose, presente, por exemplo, no caldo de cana-de-açúcar, as tecnologias de segunda geração utilizam resíduos agrícolas e agroindustriais para este mesmo fim. Neste caso, o processo fermentativo é baseado nos carboidratos liberados da biomassa vegetal por hidrólise da celulose e das hemiceluloses, fato que oferece barreiras tecnológicas que ainda vêm sendo estudadas por vários grupos de pesquisa em todo o mundo.

A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos envolve diferentes etapas como o preparo da matéria-prima, o pré-tratamento, a lavagem do substrato para remoção de inibidores, a hidrólise enzimática ou sacarificação da celulose, a fermentação das hexoses, a fermentação das pentoses, a recuperação do etanol e a separação e tratamento de efluentes. Vários autores têm demonstrado que a integração destas etapas pode diminuir as dificuldades técnicas inerentes ao processo e, naturalmente, reduzir o custo operacional que ainda representa um dos principais obstáculos a serem superados. Três possíveis estratégias de integração têm sido investigadas nestas últimas décadas: a co-fermentação de pentoses e hexoses (CF); a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF); e a sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF). Tais integrações ainda oferecem alguns problemas, como a inexistência de um micro-organismo industrial capaz de fermentar pentoses e hexoses eficientemente, as limitações causadas pelo acúmulo de etanol em reatores SSF e a união destes processos em um único biorreator, cujos parâmetros operacionais têm que respeitar as limitações de cada etapa simultaneamente. Neste cenário, propostas de desenvolvimento científico e tecnológico buscam incessantemente a redução no impacto inibitório dos produtos da reação sobre enzimas e micro-organismos, o aproveitamento racional das pentoses e a execução destas etapas de modo contínuo e eficiente.

A realização da etapa de hidrólise enzimática em alta consistência tem sido uma das soluções tecnológica mais intensamente investigadas. O uso de altas concentrações de substrato na hidrólise enzimática propicia uma diminuição do

consumo de água e, principalmente, um aumento da concentração de açúcares no meio, facilitando a etapa de fermentação. Assim, tais hidrolisados apresentarão maior viabilidade para a produção de etanol celulósico. Apesar disso, grandes quantidades de substrato podem acarretar diminuição no rendimento de hidrólise devido à menor mobilidade do sólido no meio, menor turbulência e menor contato do substrato com as enzimas.

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um estudo de otimização da hidrólise enzimática de substratos lignocelulósicos em alta consistência, testando inclusive a aplicação de aditivos surfactantes para eventualmente promover um maior contato entre as enzimas e o substrato, ou seja, reduzir os problemas de transferência de massa ocasionados pela reação em alta consistência. O complexo enzimático utilizado para este fim (Cellic CTec2) foi desenvolvido pela Novozymes A/S especialmente para a sacarificação de biomassa lignocelulósica, apresentando, conseqüentemente, vantagens importantes frente às complexos enzimáticos já existentes no mercado, tais como o uso em menor dosagem, menor custo e maior estabilidade frente aos inibidores. Além disso, não há necessidade de enriquecê-la com β -glucosidase, como no caso da conhecida Celluclast 1.5L FG, que foi por muitos anos considerada um complexo enzimático padrão na área de lignocelulósicos. Os substratos selecionados para este estudo foram amostras de polpa kraft deslignificada de eucalipto e de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor ácido-catalisada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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. Estas fontes alternativas devem diminuir a dependência por combustíveis fósseis e reduzir a emissão dos gases causadores do efeito estufa (SOUZA, 2008). 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 (SZCZODRAK, FIEDUREK, 1995). Neste cenário, o bagaço da cana-de-açúcar se destaca como uma importante matriz lignocelulósica para produção de etanol de segunda geração.

A produção de cana-de-açúcar no Brasil, segundo as estatísticas da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), foi de 625 milhões de toneladas na safra de 2010/11, com uma produtividade de 77798 kg por hectare, sendo aproximadamente 46 % destinada para o açúcar e 54 % para o etanol. Nesta mesma safra, foram produzidos 39 milhões de toneladas de açúcar e 28 milhões de m³ de etanol no país, gerando cerca de 160 milhões de toneladas de bagaço. Embora grande parte do bagaço possa ser utilizado para fins energéticos, essa quantidade representa uma oportunidade que a agroindústria não pode desprezar. Este resíduo agroindustrial é passível de conversão em açúcares fermentescíveis mediante o emprego de tecnologias que se encontram em franco desenvolvimento. Desta forma, tais materiais surgem como alternativa real à demanda por combustíveis fósseis.

Os materiais lignocelulósicos são compostos por três componentes majoritários: a celulose (50 %), as hemiceluloses (25 %) e a lignina (25 %). Portanto, a produção de açúcares passíveis de fermentação a partir da lignocelulose depende da hidrólise dos carboidratos (celulose e hemiceluloses) presentes no material, que pode ser feita via ácida ou enzimática (BASTOS, 2007). A hidrólise ácida é mais simples e mais rápida, porém, gera poluentes e subprodutos que atuam como inibidores da fermentação. Por outro lado, a hidrólise enzimática é mais seletiva e pode ser conduzida em condições mais brandas de temperatura e pH do meio de reação (SUN, 2002). Entre os componentes majoritários da lignocelulose, a lignina é o único que não apresenta açúcares fermentescíveis em sua estrutura. Trata-se de uma matriz polifenólica, amorfa e não linear, cuja estrutura é formada por derivados

do álcool *p*-hidroxicinâmico com vários graus de metoxilação (FENGEL, WEGENER, 1989).

2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os principais constituintes de materiais lignocelulósicos são a celulose, as hemiceluloses, a lignina e os extrativos, sendo a primeira o mais abundante (PÉREZ, MAZEAU, 2005). A celulose é um homopolissacarídeo constituído por unidades de anidro-D-glucopiranosose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4). A orientação equatorial das hidroxilas anoméricas confere à sua estrutura supramolecular uma forte tendência à linearidade. Por esta razão, a unidade conformacional da celulose é a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -glucopiranosose), enquanto que a glucose representa a sua unidade estrutural básica (ATTALA *et al.*, 1993; FENGEL, WEGENER, 1989). Devido às ligações de hidrogênio intra e intermoleculares presentes nesta estrutura, há formação de regiões mais fortemente arranjadas, chamadas de regiões cristalinas, que apresentam mais coesão no empacotamento das cadeias. O alto grau de associação molecular da celulose cristalina dificulta a hidrólise deste material, seja por catálise química ou enzimática (BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008). No entanto, a celulose também apresenta regiões mais fracamente associadas, denominadas regiões amorfa. Estas regiões possuem ligações β -(1,4) glicosídicas mais facilmente hidrolisáveis do que na região cristalina.

As hemiceluloses correspondem a uma família de heteropolissacarídeos que ocorrem juntamente com a celulose na parede celular. Suas cadeias podem ser ramificadas, portanto, menos cristalinas, conferindo-lhe menor estabilidade frente à degradação térmica, biológica e química. Os monossacarídeos mais comumente encontrados nas hemiceluloses são: D-manose, D-galactose, D-xilose, D-glucose, L-rhamnose, L-arabinopiranosose, ácido 4-O-metilglucurônico e ácido D-glucurônico (BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008).

As xilanas são os componentes majoritários das hemiceluloses das dicotiledôneas, representando, nestes casos, cerca de 20% em massa de material seco (SINGH, MADLALA, PRIOR, 2003). No entanto, em monocotiledôneas, estas

constituem apenas 2% de massa do material seco (PÉREZ, MAZEAU, 2005). Geralmente, as xilanas se apresentam como polissacarídeos heterogêneos formados na cadeia principal por unidades de anidro-D-xilopiranoses unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1,4), podendo apresentar substituintes *O*-acetil e α -L-arabinofuranosil, além de resíduos dos ácidos α -D-glucopiranosilurônico e α -D-4-*O*-metilglucopiranosilurônico (SUNNA, ANTRANIKIAN, 1997). Nas angiospermas, uma a cada 10 unidades de D-anidroxilopiranosose é substituída nos carbonos 2 e 3, podendo haver migração entre estas duas posições e funcionalização dupla de algumas unidades (COUGHLAN, HAZLEWOOD, 1993).

A Figura 1 apresenta a estrutura típica do principal componente das hemiceluloses de gramíneas que, naturalmente, encontra-se presente na parede celular dos colmos de cana-de-açúcar. Esta estrutura, genericamente classificada como 4-*O*-metilglucuronoxilanas, é similar à encontrada em outras matrizes como a madeira de folhosas (eucalipto) e é constituída por uma cadeia principal de β -(1,4)-D-xilopiranosana parcialmente acetilada, substituída por unidades de arabinofuranose, de ácido 4-*O*-metil-glucurônico e, eventualmente, de ácido glucurônico.

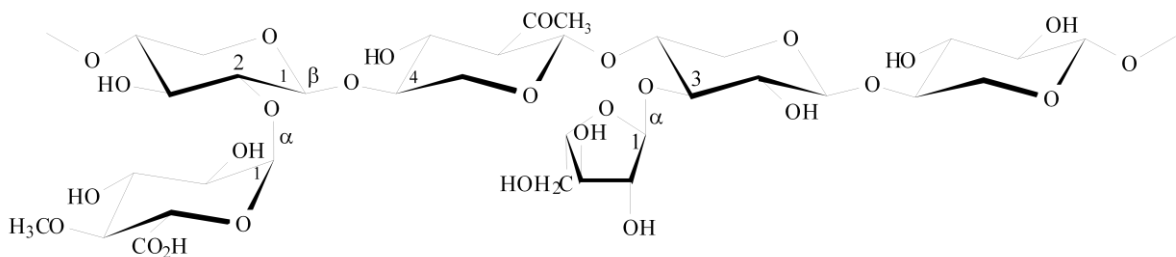


FIGURA 1 - ESTRUTURA TÍPICA DE UMA HETEROXILANA DE GRAMÍNEAS, EVIDENCIANDO A PRESENÇA DE SUBSTITUINTES ACETIL, ARABINOFURANOSIL E 4-*O*-METILGLUCURONOSIL LIGADOS COVALENTEMENTE À CADEIA LINEAR.

FONTE: Pitarelo (2007)

Além da celulose e das hemiceluloses, há outro polissacarídeo na parede celular vegetal que merece destaque: a pectina. Este constituinte é formado majoritariamente por unidades de ácido- α -D-galacturônico, e apresenta mais que 50% dos grupos carboxílicos encontrados na parede celular vegetal (POPA, SPIRIDON, 2005).

Depois da celulose, a macromolécula mais abundante na natureza é a lignina, que chega a representar 20-30% da biomassa lignocelulósica produzida no planeta. Trata-se de uma matriz amorfa não polissacarídica, altamente hidrofóbica e

complexa, formada por reações de condensação entre derivados do álcool *p*-hidroxicinâmico com vários graus de metoxilação (FENGEL, WEGENER, 1989) cujas estruturas estão representadas na Figura 2.

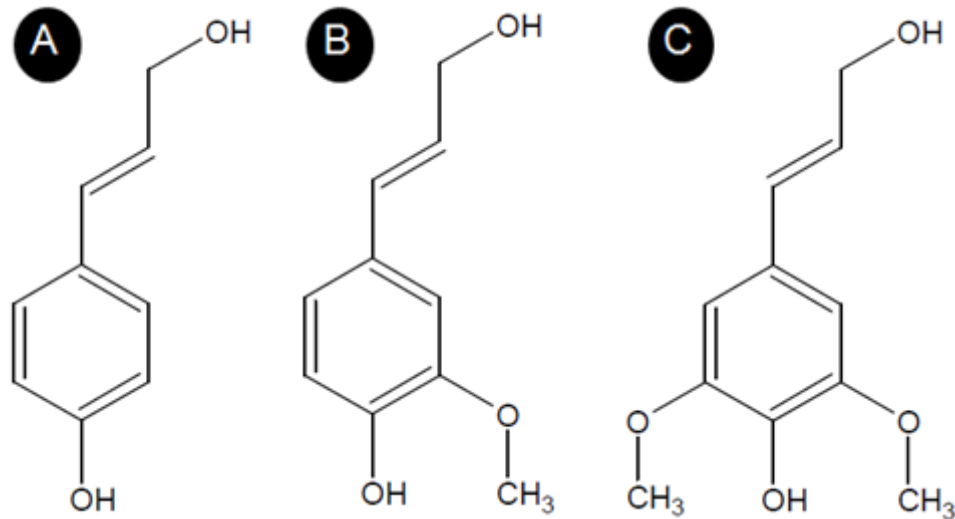


FIGURA 2 - ALCOÓIS PRECURSORES DA LIGNINA: *P*-CUMÁRICO (A), CONIFERÍLICO (B) E SINAPÍLICO (C).

FONTE: Adaptado de Fengel, Wegener (1989)

Ao contrário da celulose e das hemiceluloses, a distribuição das unidades monoméricas da lignina ao longo das cadeias não é ordenada e estas se encontram entrelaçadas por ligações carbono-carbono de diferentes tipos: entre cadeias alifáticas (β - β' , α - α' , α - β'), entre cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -5', β -1', α -1', β -6') e entre carbonos aromáticos (5-5'), além de ligações etéreas envolvendo cadeias alifáticas e anéis aromáticos (β -O-4', α -O-4') (HIGUCHI, 1985). Em geral, as ligações predominantes na estrutura da lignina são dos tipos β -O-4 (mais que 50%) e β -1 (LEE, 1997).

Os extrativos, por sua vez, costumam caracterizar a planta na cor, no cheiro, no sabor, em sua resistência natural ao apodrecimento e em suas propriedades abrasivas (D'ALMEIDA, 1988). As folhosas, como o eucalipto, possuem 3 a 10% de extrativos de baixa massa molar, estando esse valor em torno de 5 a 8% em coníferas como o pinho. É comum a denominação de resina para uma determinada classe de extrativos. Porém, este termo aplica-se a um conjunto de substâncias químicas que inibem a cristalização e, portanto, caracteriza mais a condição física do que a composição química da fração. Em geral, os seguintes compostos podem ser encontrados em resinas de madeiras: terpenos, lignanas, estilbenos, flavonóides e

outros aromáticos. Além dessas substâncias, outros compostos orgânicos podem também estar presentes, como gorduras, ceras, ácidos graxos, álcoois, esteróides e hidrocarbonetos de massa molar relativamente elevada.

A cana-de-açúcar é uma das principais matérias-primas vegetais para fins energéticos e o seu processamento em grande escala gera quantidades expressivas de bagaço, cuja composição química encontra-se relacionada na Tabela 1. Tal composição, expressa em base seca, foi determinada em material livre de extraíveis, cujo teor foi posteriormente incorporado à matriz para expressar a totalidade de seus constituintes. No entanto, é importante ressaltar que os dados da Tabela 1 não podem ser considerados absolutos porque não incluem componentes minoritários sabidamente presentes nesta matriz lignocelulósica, tais como ácidos urônicos e proteína. Além disto, os autores relatam que a coluna cromatográfica, utilizada para caracterizar os carboidratos presentes no hidrolisado ácido do bagaço, apresentava coeluição entre xilose e as hexoses manose e galactose, revelando que a presença destas na matriz lignocelulósica foi incorporada ao percentual de anidroxilose. Tal dificuldade analítica é muito comum em estudos de pré-tratamento e vários autores a ignoram porque estes três monossacarídeos apresentam o mesmo fator de resposta frente ao detector de índice de refração e a quantificação conjunta destes monossacarídeos é perfeitamente coerente com o objetivo de se determinar o teor de hemiceluloses presente na matriz.

2.2 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA

O alto grau de associação molecular da celulose cristalina e a forte interação desta com os demais componentes poliméricos da lignocelulose conferem ao agregado uma alta resistência à hidrólise ácida ou enzimática, além de oferecer resistência ao ataque microbiano (BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008). Desta forma, faz-se necessário o emprego de uma etapa de desorganização estrutural, geralmente associada a um método de pré-tratamento, para aumentar a susceptibilidade destes materiais à bioconversão (VAZQUEZ *et al.*, 2006; RAMOS *et al.*, 2003).

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA *IN NATURA*.

Componente	Composição (%)
Extraíveis totais	6,7 ± 0,2
Anidroglicose ¹	39,3 ± 0,3
Anidroxilose ²	16,3 ± 0,2
Anidroarabinose ²	2,3 ± 0,1
Grupo acetil	3,0 ± 0,1
Lignina solúvel ³	1,2 ± 0,1
Lignina insolúvel ³	27,4 ± 0,1
Cinzas	2,9 ± 0,2
Total	99,1

FONTE: Pitarelo *et al.* (2012)

¹ Presente como componente das β -(1-4)-D-glucanas (celulose)

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses)

³ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído

Vários métodos de pré-tratamento têm sido propostos para alterar ou remover os impedimentos estruturais ou composicionais que limitam a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, buscando com isto desconstruir a parede celular de plantas superiores e aumentar acessibilidade desta à produção de combustíveis renováveis como o etanol, maximizando assim a produção de açúcares fermentáveis oriundos da celulose e das hemiceluloses (LADISH *et al.*, 2008). Dentre os principais métodos até hoje estudados, podemos destacar os que utilizam hidrólise ácida (GUO *et al.*, 2009; VÁZQUEZ *et al.*, 2006; VÁZQUEZ *et al.*, 2004; TEIXEIRA, LINDEN, SCHROEDER, 1999), reagente alcalinos (CURRELI *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2009), explosão a vapor (RAMOS *et al.*, 2003; ZACCHI, GALBE, 2007; SUN *et al.*, 2009), oxidação úmida (SCHIMIDT, THOMSEN, 1998; MARTIN, KLINKE, THOMSEN, 2007), amônia líquida (GAO *et al.*, 2010; BALAN *et al.*, 2010), água quente (LYND *et al.*, 2002 (a); MARTÍN, AGUILERA, 1988), moagem (INOUE *et al.*, 2009; ALVO, BELKACEMI, 1997), organosolv (BEAZA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2010) e pré-tratamento biológico (YU *et al.*, 2009; CAMASSOLA, DILLON, 2009; ZHANG *et al.*, 2009).

Sob o ponto de vista econômico, o pré-tratamento deve, além de melhorar a produção de açúcares livres a partir de celulose e hemiceluloses, evitar a

degradação ou perda de carboidratos, minimizar a formação de inibidores e ser de baixo custo operacional (SUN, CHENG, 2002). Entre os diferentes métodos estudados até então, o pré-tratamento por explosão a vapor tem sido um dos mais utilizados, sendo considerado efetivo para diferentes tipos de fitobiomassa e facilmente adaptável aos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), cujo tempo ideal de hidrólise enzimática é normalmente estimado em 12 h. Esta tecnologia de pré-tratamento também tem se mostrado vantajosa pelos altos rendimentos obtidos e pela alta susceptibilidade do material pré-tratado à hidrólise enzimática e fermentação (PITARELO *et al.*, 2010). A Figura 3 ilustra a posição estratégica do pré-tratamento perante o processo de produção de etanol de segunda geração, onde é identificado como uma das principais etapas para viabilizar o processo como um todo.

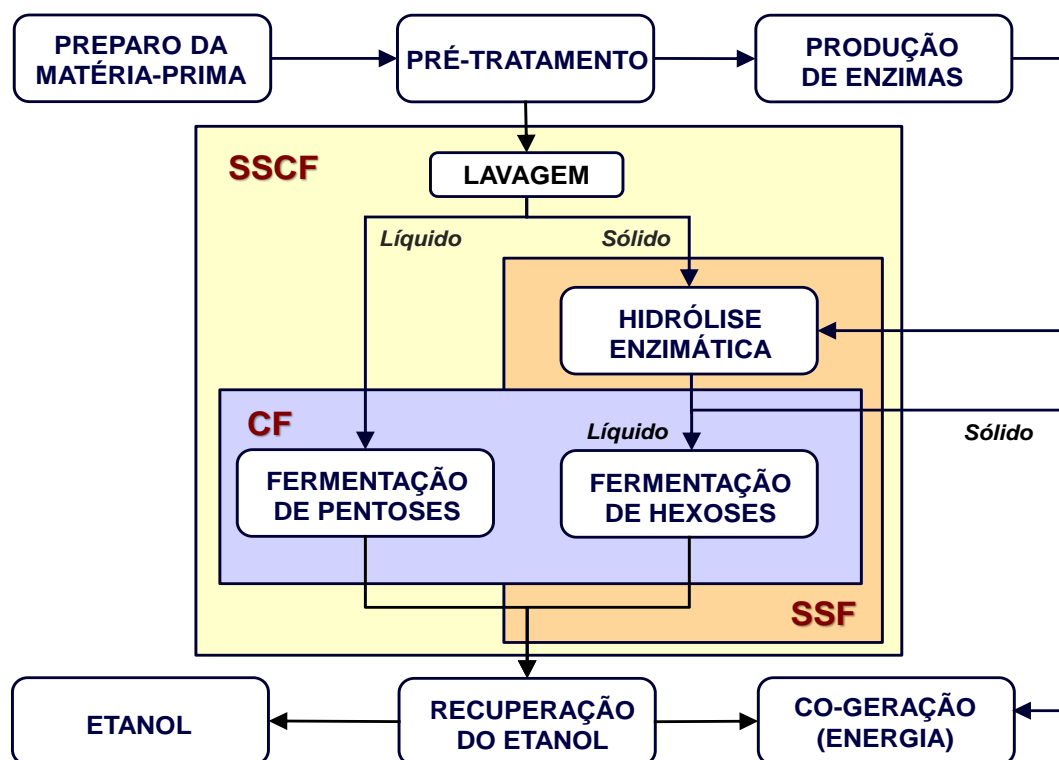


FIGURA 3 - ESQUEMA DE PRODUÇÃO DO BIOETANOL A PARTIR DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.

FONTE: Adaptado de Pitarelo *et al.* (2010)

No pré-tratamento a vapor, a biomassa é exposta a altas pressões de vapor por um determinado tempo de residência no reator e, em seguida, a uma rápida descompressão à pressão atmosférica. Ao longo deste processo, as ligações que asseguram a coesão da biomassa são fragilizadas e, em parte, quebradas, de forma

que, no momento da descompressão, o material é desfibrado gerando um aumento substancial na área superficial de contato (RAMOS, 2003). De todos os componentes da biomassa que sofrem hidrólise, as hemiceluloses são as mais profundamente modificadas por este tipo de reação. Sob a ação da temperatura e da pressão, os grupamentos acetil presentes nas hemiceluloses são hidrolisados a ácido acético e o ácido liberado no meio catalisa a quebra das ligações do complexo lignina-carboidrato (auto-hidrólise), provocando a solubilização de grande parte das hemiceluloses que, então, podem ser facilmente removidas por extração aquosa e seguir para a etapa de fermentação das pentoses, cujo sucesso depende do emprego de micro-organismos capazes de executar esta via metabólica com eficiência (Figura 3). Outros ácidos orgânicos, como os ácidos fórmico e levulínico, também podem contribuir neste processo, levando à liberação e acúmulo de produtos de baixa massa molar na fase condensada ou no extrato aquoso. Desta forma, a fração fibrosa insolúvel em água retém a quase totalidade da celulose presente na biomassa, além de uma lignina parcialmente modificada que pode então ser extraída com álcali, etanol ou dioxano (RAMOS, 2003). Tal fato é importante porque a susceptibilidade à hidrólise, particularmente enzimática, é reduzida pela adsorção inespecífica das enzimas sobre a lignina ou complexos lignina-carboidrato (SADDLER *et al.*, 2007). No entanto, a deslignificação de substratos celulósicos pré-tratados tem se demonstrado economicamente inviável, devido à complexidade desta operação em larga escala e nos problemas associados à geração de efluentes.

Além do processo SSF mencionado acima, a produção de etanol de segunda geração também pode ser realizada através dos processos de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) e de sacarificação e fermentação em separado (SHF). Neste último, cada uma das etapas envolvidas no processo pode ser otimizada isoladamente (ver Figura 3), a expensas de um maior investimento de capital devido à necessidade da instalação de dois reatores independentes. Já no SSCF, todas as etapas posteriores ao pré-tratamento da biomassa são realizadas em conjunto, incluindo a fermentação das hemiceluloses removidas pela etapa de pré-tratamento por explosão a vapor. Naturalmente, isto implicaria na existência e disponibilidade de um micro-organismo genética e fisiologicamente estável, capaz de produzir as enzimas responsáveis pela sacarificação do substrato e de fermentar

eficientemente os carboidratos liberados em sua hidrólise. Finalmente, há ainda o conceito de um bioprocesso totalmente consolidado, onde a desconstrução da estrutura da parede celular também seria induzida por enzimas e/ou biomoléculas produzidas pelo micro-organismo. No entanto, apesar dos recentes avanços da engenharia metabólica, esta tecnologia ainda está em seus estágios iniciais de desenvolvimento (LYND *et al.*, 2005).

2.3 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

O processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica destina-se a liberar açúcares fermentescíveis através da adição de ácido sulfúrico aos resíduos (no caso da hidrólise ácida) ou pela ação de enzimas. Na hidrólise enzimática, tal processo se dá pela atuação das enzimas que constituem o complexo celulolítico, as quais podem ser produzidas por fungos, bactérias ou protozoários (BASTOS, 2007). Além das celulasas, outras enzimas se fazem necessárias para a hidrólise efetiva da lignocelulose, como as hemicelulasas e as feruloil esterases.

A maioria das celulasas comerciais produzidas por fungos são provenientes dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (COUGHLAN, 1985). O mais importante é o *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*), um fungo filamentoso e mesofílico que pode produzir em alto rendimento as três principais classes de hidrolases responsáveis pela hidrólise da celulose à glucose: endo- β -(1,4)-glucanases, exo- β -(1,4)-glucanases e β -(1,4)-glucosidases (ANDREAUS, FERREIRA FILHO, BON, 2008; TEERI, 1997).

Como dito acima, as hemiceluloses são heteropolímeros de origem vegetal, não-amiláceos e não-celulósicos, compostos por diferentes unidades monossacarídicas ligadas entre si por diferentes tipos de ligação. Portanto, para romper as ligações existentes nas hemiceluloses, é necessário o uso de diversas classes de enzimas, conferindo complexidade à família das hemicelulasas (SJOSTROM, 1992). Atualmente, as mais usadas comercialmente também são produzidas por micro-organismos dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (DUMITRIU, 2005) que, de um modo geral, atuam sobre as hemiceluloses presentes

nos tecidos vegetais, convertendo-os aos seus respectivos açúcares monoméricos (CAVACO-PAULO, 1995; LEHNINGER, NELSON, COX, 1995).

Celulases e hemicelulases, assim como quaisquer outros tipos de enzimas, dependem de parâmetros específicos para atuarem de forma otimizada. Tais parâmetros incluem a intensidade e tipo de agitação, a relação enzima-substrato, a presença de tensoativos no meio, a temperatura e o pH da reação (BON, 2005; CAVACO-PAULO, 1995). Fora da estreita faixa ótima de atuação das enzimas (especialmente no que diz respeito à temperatura e pH), o seu sítio catalítico deixa de interagir eficientemente com o substrato devido a alterações na sua estrutura conformacional, ocasionando perdas de rendimento no processo ou até mesmo a desnaturação destas enzimas (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995). Desta forma, fica evidente a necessidade de estudos que otimizem estas variáveis.

2.4 MODO DE AÇÃO DAS CELULASES DE *Hypocrea jecorina*

As celulases hidrolisam as ligações β -(1,4)-glucosídicas das cadeias de celulose e causam uma diminuição de seu grau de polimerização, que chega a 11000 unidades na celulose nativa. Este grau de polimerização representa o número de monômeros de anidroglicose que compõem a cadeia polimérica linear (LEHNINGER, NELSON, COX, 1995). Métodos de pré-tratamento também causam uma redução significativa do grau de polimerização do componente celulósico da biomassa e, no caso da explosão a vapor, tal redução pode ser de 30 (auto-hidrólise) até 70% (pré-tratamento ácido-catalisado), podendo gerar, neste último caso, substratos cujas cadeias de celulose tenham comprimento similar à celulose microcristalina (RAMOS, NAZHAD, SADDLER, 1993).

As três classes de enzimas que atuam de forma sinérgica na sacarificação da celulose são as endoglucanases, as exoglucanases e as β -glucosidases, sendo que seus respectivos modos de ação sobre o substrato celulósico estão ilustrados na Figura 4. As endoglucanases clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas ao longo das cadeias, gerando uma queda expressiva do grau de polimerização da celulose e, conseqüentemente, novas extremidades redutoras e não-redutoras para ação das

exoglucanases. As exoglucanases (celobiohidrolases) removem resíduos de celobiose de extremidades redutoras e não redutoras das cadeias que, como dito acima, são geradas pela ação das endoglucanases. As β -glucosidases (celbiases) clivam resíduos de celobiose, gerados pela ação sinérgica das endoglucanases e exoglucanases, liberando monômeros de glucose (LYND *et al.*, 2002 (b); LEHNINGER, NELSON, COX, 1995; BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008; KUMAR, SINGH, SINGH, 2008). Esta atividade específica, embora não verdadeiramente celulásica, reduz a inibição retroativa que a celobiose exerce sobre as endo e exoglucanases (BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008). No entanto, as β -glucosidases sofrem inibição pelo acúmulo de monômeros de glucose no meio reacional.

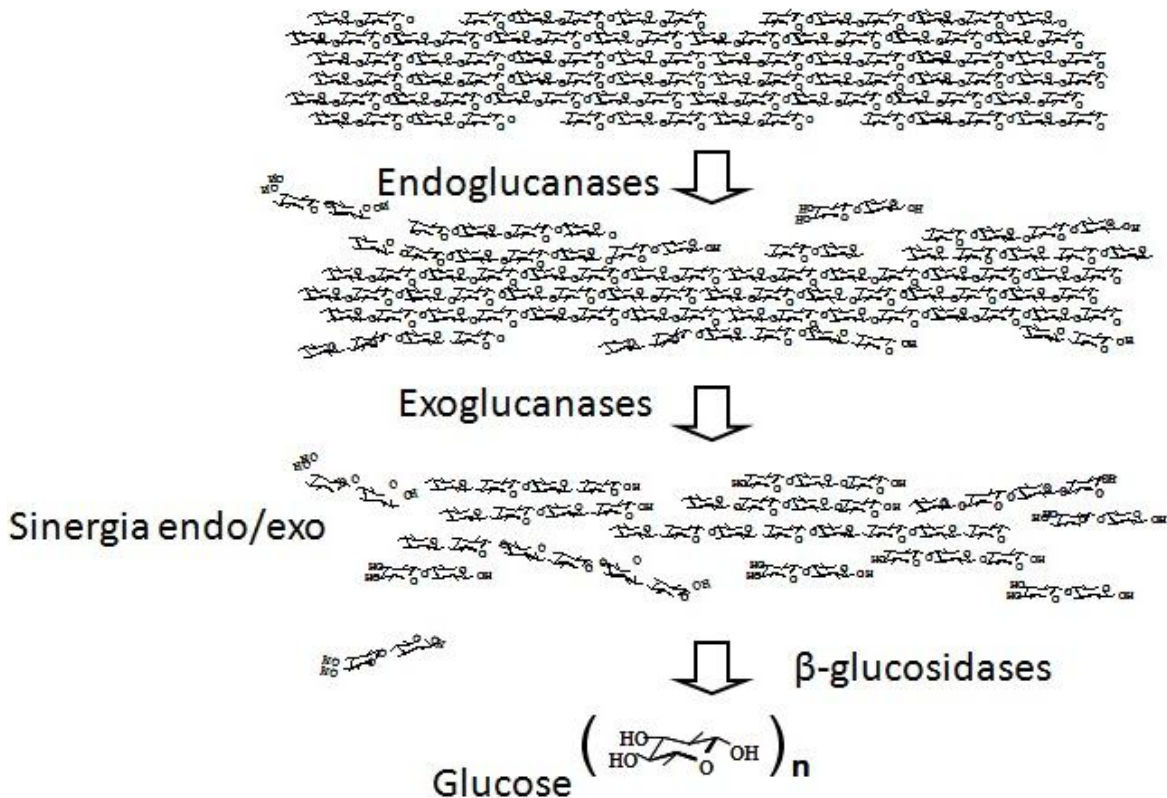


FIGURA 4 - MODO DE AÇÃO CATALÍTICA PROPOSTO PARA AS CELULASES DE *HYPOCREA JECORINA*.

FONTE: RAMOS E FONTANA, 2004

Para que as celulasas exerçam melhor a sua atividade hidrolítica, muitas delas contam com uma ferramenta estrutural que permite a adsorção da enzima sobre o substrato. Tal interação se dá através de um peptídeo rico em resíduos de aminoácidos aromáticos, especialmente a tirosina, denominado módulo de ligação

ao carboidrato (CBM, do inglês *carbohydrate binding module*), que é capaz de estabelecer ligações de hidrogênio e interações de van der Waals que mantêm a enzima sobre o substrato pelo tempo necessário à realização de uma ou mais ações catalíticas progressivas. Portanto, a ausência do CBM reduz a atividade da enzima sobre a celulose cristalina, pois diminui a formação do complexo enzima-substrato (TEERI, 1997).

As endoglucanases representam aproximadamente 10% das celulasas secretadas por *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) (CAVACO-PAULO, 1995). Seu sítio catalítico apresenta-se em forma de fenda, mais aberta quando comparada ao sítio catalítico das exoglucanases, permitindo que possa atuar em qualquer ponto ao longo da cadeia celulósica, inclusive nas regiões cristalinas. Porém, a reação mais efetiva ocorre na região amorfa, em que ligações β -(1,4)-glucosídicas são hidrolisadas antes da dessorção (TEERI, 1997). Um aspecto importante a ser salientado é o fato de que a hidrólise com esta classe de celulasas é favorecida pela agitação mecânica (CAVACO-PAULO, ALMEIDA, BISHOP, 1996; ESTEGHLALIAN *et al.*, 2001), pois esta favorece o processo de dessorção das enzimas para o meio.

As exoglucanases ou celobiohidrolases apresentam um sítio ativo na forma de túnel e podem atuar somente sobre as extremidades da cadeia de celulose, liberando celbiose predominantemente. Existem dois tipos de celobiohidrolases: a CBH I ataca as terminações redutoras e representa 60% das celulasas secretadas por *Hypocrea jecorina*, enquanto que a CBH II ataca as terminações não redutoras e corresponde a 20% da secreção enzimática deste fungo (SUOMINEN *et al.*, 1993; PALONEN *et al.*, 2004).

Na hidrólise das hemiceluloses que compõem substratos lignocelulósicos de diferentes origens, as xilanases, que atuam de maneira similar às endo- β -(1,4)-glucanases (portanto, classificadas como endo- β -(1,4)-D-xilanases), também quebram aleatoriamente as ligações glicosídicas (ou β -(1,4)-D-xilosídicas) de cadeias lineares de xilanas (POUTANEN, SUNDBERG, 1988). Por outro lado, as exo- β -(1,4)-xilanases liberam preferencialmente xilbiose como resultado de sua ação catalítica e também apresentam um módulo de ligação ao substrato (TOMME, WARREN, GILKES, 1995).

Dando sequência ao conjunto de enzimas envolvidas na hidrólise das hemiceluloses, as cadeias laterais ligadas à cadeia principal de xilanas e

glucomananas são removidas pelas enzimas α -glucuronidase, α -arabinosidase e α -D-galactosidase. As feruloil esterases, pectinases e tanases também contribuem na desconstrução das hemiceluloses porque são responsáveis por romper algumas ligações covalentes inter e intrapoliméricas. Em especial, a feruloil esterase quebra a ligação entre a lignina e as hemiceluloses, o que facilita o acesso das enzimas ao substrato (DUMITRIU, 2005; BON, GÍRIO, PEREIRA, 2008).

Além deste conjunto de hidrolases, ainda podem ser citadas as enzimas produzidas por fungos da podridão branca (*white rot fungi*) que têm a capacidade de expressar biocatalisadores que degradam a lignina, como as lignina peroxidases (EC 1.11.1.14) (KIRK, FARREL, 1987), as manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) (SIERRA-ALVAREZ *et al.*, 2001) e as lacases (EC 1.10.3.2) (WANG, JIA, 2007). Embora importantes para o processo de decomposição da lignocelulose na biosfera, bem como para vários processos industriais como o tratamento de efluentes e a biopolpação de madeira, tais enzimas não têm tido aplicação prática na hidrólise enzimática *in vitro* de materiais lignocelulósicos porque exigem condições operacionais distintas daquelas necessárias para o bom funcionamento de celulasas e hemicelulasas.

Mcqueen-Mason, Durachko e Cosgrove (1992) relataram a existência de outras proteínas acessórias que constituem os complexos enzimáticos e não atuam de forma hidrolítica, mas que interferem na hidrólise dos lignocelulósicos. Estas proteínas são as swolleninas e as expansinas, sendo uma produzida por fungos e a outra derivada de plantas, respectivamente. Sua ação se dá através de um inchamento das cavidades da rede celulósica, perturbando a estrutura das ligações químicas envolvidas e, portanto, aumentando a acessibilidade deste substrato e a ação celulásica (ARANTES, SADDLER, 2010). Outro estudo também demonstrou que quantidades muito pequenas de expansinas, usadas juntamente com as celulasas de *Hypocrea jecorina*, foram capazes de aumentar em até 13 % a conversão de celulose quando comparado com o mesmo complexo celulásico sem este aditivo (BAKER *et al.*, 2000).

Geralmente, substratos celulósicos lignificados apresentam maior resistência à hidrólise enzimática porque a lignina atua como barreira à interação enzima-substrato e, dependendo de sua hidrofobicidade, promove a perda de atividade por adsorção inespecífica. Por exemplo, Pan *et al.* (2005) demonstraram que, para um

rendimento de hidrólise de 90 %, a carga enzimática poderia ser reduzida de 40 para 30 FPU.g⁻¹ de celulose caso o teor de lignina no substrato fosse reduzido de 27,4 para 18,4 %.

A concentração das enzimas no meio também é fator determinante no rendimento da hidrólise de materiais (ligno)celulósicos. Elevadas concentrações de do complexo multienzimático podem acarretar em competição pelo substrato, adsorção inespecífica e liberação em maior escala de produtos de caráter inibidor como a celobiose. Quanto maior a carga de enzima aplicada na reação, maior é a taxa de conversão (SILVA, 2009). Porém, a relação entre a concentração das enzimas e a eficiência da hidrólise não é linear (RAMOS, BREUIL, SADDLER, 1992). Shen e Agblevor (2008) comprovaram esta afirmação ao demonstrar que a conversão em açúcares redutores aumentou de 46,3 % para 73,8 % em 72 h de reação, com o aumento da concentração inicial de complexo enzimático de 2,9 para 17,4 FPU.g⁻¹ de substrato seco (ou 5,8 e 34,8 FPU.g⁻¹ de celulose, respectivamente). Portanto, um aumento de 6 vezes na atividade enzimática provocou um aumento correspondente de apenas 60% no rendimento de hidrólise. Ramos, Breuil e Saddler (1993) empregaram três concentrações enzimáticas distintas na hidrólise de substratos deslignificados (5, 10 e 20 FPU.g⁻¹ de celulose) e obtiveram conversões em glucose, após 72 h de reação, de 91, 95 e 98 %, respectivamente. No entanto, em tempos de incubação inferiores, da ordem de 12 a 24 h, as diferenças nas taxas de conversão foram mais pronunciadas, revelando que maiores cargas enzimáticas, na ausência de lignina, aumentam a velocidade inicial de hidrólise sem necessariamente comprometer os rendimentos finais de sacarificação.

A concentração das β -glucosidases também interfere na hidrólise da celulose, pois estas enzimas são responsáveis pela redução do efeito inibitório da celobiose. Tengborg, Galbe e Zacchi (2001) testou a hidrólise de cavacos de *Picea abies* (sem casca) impregnados com dióxido de enxofre e pré-tratados a vapor, adicionando β -glucosidase durante a sacarificação. No ensaio com a maior atividade celulásica (26 FPU.g⁻¹ de celulose), uma relação linear foi observada entre o aumento da conversão da celulose e a atividade β -glucosidásica. No entanto, quando menores cargas enzimáticas foram testadas (7 FPU.g⁻¹ de celulose), a adição sequencial de atividade β -glucosidásica se mostrou praticamente irrelevante. Outro aspecto

importante sobre as β -glucosidases é o de que elas apresentam grande afinidade pela lignina, conforme já demonstrado por Ramos, Breuil, Saddler (1993).

2.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA EM ALTA CONSISTÊNCIA

A implementação da hidrólise enzimática em alta consistência, ou seja, uso de elevadas concentrações de substrato na produção do etanol celulósico ou de segunda geração oferece vantagens significativas ao processo. Tais vantagens se caracterizam pela redução do custo de instalação dos reatores de hidrólise, pela geração de um caldo (ou hidrolisado) com elevada concentração de açúcares passíveis de fermentação e, conseqüentemente, pela redução significativa do custo da destilação. Estudos preliminares indicaram que ao aumentar a concentração de glucose de 1,5 para 16 %, pode-se reduzir em até seis vezes o custo da destilação após fermentação (ZACCHI, AXELSSON, 1989).

A relação entre a concentração do substrato e a carga enzimática empregada no processo de sacarificação afeta a taxa de hidrólise dos polissacarídeos presentes na biomassa nativa ou pré-tratada (RAMOS, BREUIL, SADDLER, 1992). Além dos fenômenos de transferência de massa, altas concentrações de substrato interferem diretamente na eficiência do processo por dificultarem os fenômenos de transferência de massas, maximizarem a perda de atividade catalítica por efeitos de cisalhamento e aumentarem a concentração dos produtos de hidrólise no meio de reação (HUANG, PENNER, 1991; PENNER, LIAW, 1994; SUN, CHENG, 2002). Ramos, Breuil e Saddler (1992) demonstraram que tais efeitos são reais mesmo quando a relação entre a concentração de substrato e a carga enzimática aplicada é mantida constante. No entanto, a relação entre concentração de enzimas e eficiência da hidrólise não é linear, mas quanto maior a carga do complexo enzimático aplicada na reação, maior a taxa de conversão. Estes e outros autores também recomendam que a atividade enzimática deva ser idealmente expressa em relação à massa de celulose presente no meio de reação, o que naturalmente depende de uma caracterização criteriosa da composição química do substrato. Vale também ressaltar que elevadas concentrações de enzima podem acarretar em

competição pelo substrato, adsorção inespecífica e liberação em maior escala de produtos de maior caráter inibidor, como é o caso da celobiose (SADDLER, GREGG, 2004).

A hidrólise enzimática em alta consistência (ou alto teor de sólidos totais), devido a sua importância, já foi investigada por muitos autores. Em alguns destes trabalhos, elevadas conversões já foram obtidas. Por exemplo, Zhang *et al.* (2009) atingiram a produção de 156 g.L^{-1} de glucose após 48 h de hidrólise de polpas celulósicas derivadas de cavacos de poplar, sob teor de sólidos totais de até 20 %. No entanto, este substrato possui cerca de 90 % de celulose e menos de 3 % de lignina, o que representa menor barreira estrutural frente à ação enzimática. Usando palha de milho explodida a vapor, Yang *et al.* (2011) conseguiram 85 % de conversão em 30 h de hidrólise com um substrato que continha 45 % de celulose, percentual semelhante ao bagaço de cana explodido a vapor. No entanto, este ensaio, realizado em três etapas, foi iniciado com uma atividade enzimática de 15 FPU.g^{-1} de celulose, seguido da adição de 3 e 2 FPU.g^{-1} de celulose após 9 e 21 h do início da reação, respectivamente. Além disso, a sacarificação foi iniciada com 15 % de sólidos totais e, então, aumentou-se gradativamente a quantidade de substrato até 30 %. Estes fatores, que caracterizam reações em batelada alimentada, facilitaram a ocorrência da reação por diminuir a resistência à transferência de massas no início do ensaio, além de minimizar a inibição por adsorção não específica ao repor parte das enzimas em diferentes momentos da reação.

A acessibilidade do substrato sólido ao ataque enzimático está relacionada não só com as propriedades estruturais do material e a composição dos complexos enzimáticos, mas também com a obtenção de uma boa mistura entre as fases. Boas misturas devem tender a homogeneidade a fim de ampliar o contato entre o sólido e o líquido. Samaniuk *et al.* (2011) sugeriram que o uso de uma agitação mais severa aumenta as conversões derivadas de sistemas onde há alta concentração de substrato. O agitador ideal também deve promover maior contato entre as fases sem desnaturar a ação enzimática. Em suma, a tecnologia empregada deve ser capaz de misturar uniformemente as fases e oferecer elevado rendimento de conversão, baixo gasto energético e menor tempo de reação. Com esta finalidade, podem-se variar os tipos de agitadores e a intensidade com que esta agitação é feita (MCCABE, SMITH, HARRIOTT, 1993; ZHANG *et al.*, 2009).

Segundo Ladish *et al.* (2008) e Hodge *et al.* (2008), a hidrólise enzimática em alta consistência também pode trazer problemas relacionados à inibição da enzimas causada pelos próprios produtos da reação (como açúcares e ácidos fenólicos hidrossolúveis), além de limitações nos fenômenos de transferência de massa. Porém, mesmo com menor rendimento, este tipo de reação pode ser interessante pela produção de elevadas concentrações de açúcares solúveis (ZHANG *et al.*, 2009), o que pode favorecer a etapa de fermentação. Ao vencer os gargalos supracitados, o desafio da hidrólise em alta consistência (empregando menores quantidades de água) está em achar o equilíbrio entre a concentração de substrato e taxas de conversão que tornem o processo viável.

Aditivos como surfactantes podem ser usados para melhorar o processo de dessorção das enzimas no substrato e também minimizar a adsorção inespecífica das enzimas sobre a lignina e/ou complexos lignina-carboidrato (SADDLER *et al.*, 2007). Desta forma, busca-se deixar as enzimas mais disponíveis para atuar no substrato e, conseqüentemente, melhorar a conversão do substrato em açúcares passíveis de fermentação. Vários estudos já demonstraram que, ao combinar celulasas com um surfactante, seja aniônico ou catiônico, a hidrólise de materiais celulósicos é prejudicada provavelmente por interferir nos mecanismos de interação das enzimas com a superfície do substrato celulósico. Por outro lado, a eficiência do processo hidrolítico é potencializada pelo uso de surfactantes não iônicos. Porém, um mesmo surfactante, sendo usado com diferentes complexos enzimáticos, pode demonstrar comportamentos diferentes em termos de interação com estas enzimas. Portanto, o uso destes tensoativos merece atenção como alternativa para otimizar a hidrólise enzimática, particularmente em situações onde a consistência (concentração) do substrato no meio de reação seja superior a 10 % (m.v⁻¹) (ANDREAUS, FERREIRA FILHO, BON, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar os principais parâmetros envolvidos na hidrólise enzimática em alta consistência de substratos celulósicos pré-tratados, empregando preparações enzimáticas comerciais de última geração (Cellic CTec2, Novozymes).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a composição química dos substratos selecionados para este estudo, a saber: polpa kraft deslignificada e bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor;
- Comparar o complexo enzimático de trabalho, Cellic CTec2, com uma preparação enzimática de referência em estudos de hidrólise de materiais lignocelulósicos (Celluclast 1.5L FG enriquecida com Novozym 188);
- Otimizar a hidrólise da polpa kraft deslignificada empregando um delineamento experimental do tipo compósito central de face centrada (CCFC), variando a intensidade da agitação, a carga enzimática e a concentração de substrato;
- Determinar a influência da presença de lignina no processo de hidrólise enzimática, através da substituição da polpa kraft deslignificada pelo bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor no desenvolvimento do delineamento experimental do tipo CCFC;
- Definir as condições de hidrólise de maior conversão e de maior liberação de açúcares fermentescíveis a partir dos substratos selecionados;
- Caracterizar a influência da adição do surfactante não-iônico Lutensol ON 70 em experimentos de hidrólise do substrato lignificado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

As amostras de polpa kraft deslignificada de eucalipto foram fornecidas na forma de cartões pela Usina Iguaçu Celulose (Curitiba, PR). O bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor foi preparado a partir de estudos realizados anteriormente em nossos laboratórios (PITARELO, 2007), a partir de amostras de biomassa fornecidas pela Usina Sucroalcooleira São Martinho (Rio de Janeiro, RJ).

As preparações celulásicas empregadas neste trabalho corresponderam às comerciais Celluclast 1.5L FG, Novozym 188 e Cellic CTec2, todas provenientes da Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca) e fornecidas pela Novozymes Latin America (Araucária, PR, Brasil). O preparado Celluclast 1.5L FG corresponde a um complexo celulásico de *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*), enquanto que Novozym 188 é uma preparação β -glucosidásica de *Aspergillus niger*. Por outro lado, a Cellic CTec2 corresponde a uma mistura otimizada de complexos enzimáticos de última geração, especialmente desenvolvida para emprego em processos de hidrólise enzimática de biomassa.

Os demais reagentes, solventes, gases e padrões analíticos foram adquiridos e utilizados de acordo com as exigências mínimas de cada técnica de análise.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por explosão a vapor

O bagaço de cana foi inicialmente impregnado com uma solução contendo 9,5 mg de ácido fosfórico por grama de bagaço seco (PITARELO *et al.*, 2010). Após 24 h a 4 °C, o bagaço impregnado foi climatizado à temperatura ambiente e transferido para o interior do reator de explosão a vapor. O pré-tratamento foi realizado por 10 min a 180 °C, ao que se seguiu a descompressão do material para o interior de um

ciclone. Esta condição de pré-tratamento foi otimizada em trabalhos desenvolvidos anteriormente no grupo de pesquisa em parceria com a Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca), a Novozymes Latin America (Araucária, PR), a Universidade de Lund (Lund, Suécia) e o Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP), sob financiamento da Comunidade Européia no projeto de pesquisa intitulado “CaneBiofuel” (www.canebiofuel.com.br).

O material pré-tratado foi recolhido quantitativamente do interior do ciclone e lavado com água por duas vezes a uma consistência de 5% (m.v⁻¹) sob agitação mecânica, por 1 h e na temperatura ambiente, empregando equipamento de alto torque marca IKA RW20. O produto final foi drenado em funil de Büchner até a menor retenção de água e mantido sob vácuo em refrigerador para uso em reações de hidrólise. O rendimento final do processo de preparação do substrato pré-tratado, em relação à massa de bagaço de cana (peso seco) empregada no reator de pré-tratamento a vapor, correspondeu a uma média mássica de aproximadamente 80 %. O substrato assim produzido foi armazenado sob vácuo a 4 °C, depois de ter sido analisado em relação ao seu respectivo teor de umidade.

4.2.2 Preparo da polpa kraft deslignificada para a hidrólise enzimática

Os cartões de polpa kraft deslignificada de eucalipto foram rasgados e mergulhados em aproximadamente 15 L de água destilada sob agitação mecânica, com auxílio de um equipamento de torque IKA RW20, até que todo o material fosse desmembrado. Em seguida, o material foi filtrado em funil de Büchner para reduzir ao máximo o teor de água livre. Tal homogeneização se fez necessária para minimizar os erros experimentais na amostragem para condução das reações de hidrólise. O substrato assim produzido foi armazenado sob vácuo a 4 °C, depois de ter sido analisado em relação ao seu respectivo teor de umidade.

4.2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada apenas para o preparado enzimático

contendo a mistura Celluclast 1.5L e Novozym 188 (Novozymes), empregada nos ensaios na proporção 10:3 (Celluclast:Novozym). A atividade da Cellic CTec2 não foi divulgada por motivo de sigilo industrial. A metodologia usada foi uma adaptação do procedimento descrito por Ghose (1987).

Todos os ensaios de atividade foram conduzidos em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 4,8. A atividade celulásica total foi determinada contra 70 mg de papel filtro Whatman # 1, incubando 1 mL da solução do complexo enzimático com 1 mL do tampão acetato a 50 °C durante 60 min. Este preparado foi diluído em pelo menos três concentrações diferentes e suficientes para produzir em torno de 1 mg.mL⁻¹ de açúcares redutores após a conclusão do ensaio. A reação foi interrompida com a adição de 3 mL do reagente DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico), seguida de fervura por 5 min. Após resfriamento à temperatura ambiente e homogeneização do meio de reação, retirou-se uma alíquota de 1 mL que foi diluída com a adição de 4 mL de água destilada para determinação de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV/Vis Varian, modelo Cary 100. A partir destes valores, foi construído um gráfico semilog relacionando as diluições do complexo enzimático e suas respectivas concentrações de açúcar redutor.

A solução de DNS usada nos ensaios de atividade enzimática foi preparada conforme descrito por Ghose (1987), misturando até dissolução 10,6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich), 19,8 g de hidróxido de sódio (Vetec), 306 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado, Vetec), 8,13 g de fenol (Merck) e 8,3 g de metabissulfito de sódio (Cinética Química Ltda) em 1416 mL de água destilada. A padronização do método do DNS foi realizada através de uma curva analítica, preparada a partir de soluções de glucose no intervalo de 0 a 3 g.L⁻¹, seguindo os mesmos passos do ensaio de atividade, ou seja, os padrões permaneceram incubados a 50 °C por 60 min, seguido da adição de 3 mL de DNS e fervura por 5 min. A correlação linear (R^2) entre a concentração de glucose e as absorbâncias obtidas, em nenhum dos casos, foi menor que 0,99. Portanto, por meio de regressão linear, pode-se interpolar os dados da determinação de atividade enzimática e chegar à diluição da mistura enzimática necessária para liberar 1 mg.mL⁻¹ de açúcar redutor no meio reacional.

Uma unidade internacional (UI) de atividade enzimática correspondeu à liberação de 1 μ mol de equivalentes de glucose por unidade de volume e minuto de

reação (GHOSE, 1987; RAMOS, FONTANA, 2004). A atividade enzimática em FPU.mL⁻¹ (unidades de papel de filtro por mL de preparado enzimático) foi calculada conforme a equação a seguir.

$$\textit{Atividade (FPU/mL)} = \frac{E_{dil} * V_T (mL)}{t (min) * 1 \mu mol \text{ de glucose} (mg) * V_e (mL)} \quad (1)$$

onde “E_{dil}” é a diluição da mistura enzimática capaz de liberar 1 mg.mL⁻¹ de glucose, “V_T” é o volume total da reação (2 mL), “t” é o tempo de reação (60 min) e “V_e” é o volume do complexo enzimático diluído que foi empregada, lembrando que 1 μmol de glucose corresponde a 0,18 mg.

Nos ensaios de hidrólise enzimática, a atividade encontrada na solução de enzimas foi então multiplicada pelo volume (mL) de solução que foi empregado no experimento e o produto foi dividido pela massa (g) de substrato seco a ser hidrolisado. Desta forma, a atividade final do ensaio foi expressa em FPU.g⁻¹ de substrato seco (unidades de papel de filtro por grama de substrato seco), conforme a equação abaixo,

$$\textit{Atividade (FPU/g de celulose)} = \frac{V * A_c (FPU/mL)}{m (g)} \quad (2)$$

onde “V” é o volume total (mL) do preparado enzimático usado na reação de hidrólise, “A_c” a atividade enzimática em FPU.mL⁻¹ e “m” é a massa (g) do substrato seco submetido à hidrólise.

4.2.4 Determinação de proteína

A quantidade de proteína presente nas amostras foi determinada pelo método do ácido bicinconínico ou BCA (SMITH *et al.*, 1985), através do uso de 2 mL do reagente BCA em 100 μL de solução do complexo enzimático. O reagente foi preparado no momento de fazer a análise, através da mistura dos reagentes A e B do kit BCA, da Thermo Scientific. A proporção da mistura é de 50 partes de A para 1 parte de B, sendo que o reagente B é composto por sulfato de cobre a 4% e o reagente A é uma mistura de carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em hidróxido de sódio a 0,1 mol.L⁻¹. O princípio do

método se baseia na formação de um complexo colorido que ocorre pela redução do Cu^{2+} , em meio alcalino, pela proteína. Posteriormente à incubação do reagente com a solução enzimática, por 30 min a 37 °C, foi feita a medição da absorbância em espectrofotômetro UV/Vis Varian, modelo Cary 100), no comprimento de onda de 562 nm. A curva analítica foi feita com padrão de BSA (albumina de soro bovino) no intervalo de concentração de 0,025 a 2 g.L⁻¹, através de medições de absorbância no mesmo comprimento de onda citado, que resultaram em uma correlação linear (entre concentração de BSA e absorbância) igual ou superior a 0,99.

4.2.5 Composição química dos substratos celulósicos

A composição química da polpa kraft deslignificada de eucalipto e do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor foi realizada de acordo com adaptação do método de Klason para a determinação de lignina insolúvel em ácido em amostras de biomassa (GOMIDE, DEMUNER, 1986). Uma massa conhecida do substrato foi pré-hidrolisada com H_2SO_4 a 72 % (12 mol/L) a 30 °C por 1 h. Após esta etapa, fez-se a adição de 84 mL de água. A solução resultante foi autoclavada em autoclave da marca Samrello (Blumenau, SC) por 1 h a 118 °C e pressão de 1,1 kgf/cm², a fim de completar a hidrólise. Após a autoclavagem, o líquido resultante foi filtrado a quente em cadinho de Gooch previamente pesado, o qual foi posteriormente levado à estufa por 2 h a 105 °C. O teor de lignina insolúvel foi medido gravimetricamente a partir da pesagem do cadinho de Gooch antes e após a filtração.

A lignina solúvel em ácido foi quantificada nos hidrolisados de Klason por espectrofotometria no ultravioleta, após aferir o líquido filtrado em balão volumétrico de 250 mL. As medidas de absorbância foram realizadas em 210 e 280 nm para quantificação da lignina solúvel em ácido, conforme a equação abaixo,

$$C \text{ (g/L)} = \frac{4,53 (A_{210} - A_{280})}{300} \quad (3)$$

onde “ A_{210} ” é a absorbância da fração solúvel medida no comprimento de 210 nm e “ A_{280} ” é a absorbância da mesma fração solúvel em 280 nm (DENICE, LIN, 1992).

A composição em carboidratos dos substratos celulósicos e a eventual produção de seus respectivos produtos de desidratação foi determinada através de

análise por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) dos hidrolisados ácidos resultantes da determinação de Klason. O sistema cromatográfico usado foi da marca Shimadzu, modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO10A e detector de índice de refração RID10A. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65 °C, precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com fase móvel H₂SO₄ 5 mmol.L⁻¹ a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹. A quantificação foi efetuada por padronização externa, baseado-se em curvas de calibração construídas para cada componente monitorado: celobiose, glucose, xilose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural. Os cálculos efetuados levaram em conta os seus respectivos fatores de correção de hidrólise ácida, valores estes que consideram a incorporação de uma molécula de água na quebra das ligações glicosídicas e ou a perda de moléculas de água nas reações de desidratação, com a consequente conversão dos analitos monitorados nas unidades monoméricas presentes na composição química do bagaço.

A determinação da umidade dos materiais celulósicos foi feita por método gravimétrico em estufa (Olidef CZ - Ribeirão Preto, SP) a 105 °C por 2 h. Logo após o aquecimento em estufa, o material foi esfriado em dessecador sob vácuo e pesado. O peso seco foi calculado em relação à massa seca do material original, de acordo com a equação a seguir.

$$\textit{Umidade} (\%) = 100 - \left(\frac{m_1 - m_2}{m_3} \right) * 100 \quad (4)$$

onde “m₁” é a massa do pesa filtro com a amostra após secagem em estufa, “m₂” é a massa do pesa filtro vazio e “m₃” é a massa de amostra adicionada ao pesa filtro.

O teor de cinzas foi quantificado através de uma massa conhecida do material, que foi acondicionada em um cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Este material foi calcinado em mufla a 525 °C por 2 h, segundo a norma Adolfo Lutz (1985). O teor de cinzas foi obtido pela diferença de massa entre o cadinho com cinzas e o cadinho vazio, que foi expressa em relação à quantidade de amostra inicial, conforme a equação a seguir.

$$\textit{Cinzas} (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_3} * 100 \quad (5)$$

onde “ m_1 ” a massa do cadinho com cinza após calcinado, “ m_2 ” a massa do cadinho vazio e “ m_3 ” a massa de substrato seco adicionado ao cadinho.

4.2.6 Hidrólise enzimática

As preparações enzimáticas empregadas para a sacarificação dos substratos celulósicos (polpa kraft deslignificada de eucalipto e bagaço de cana pré-tratado a vapor) foram a Cellic CTec2 e uma mistura 10:3 de Celluclast 1.5L FG e Novozym 188. Estas foram avolumadas com tampão acetato 50 mmol.L⁻¹, pH 4,8. A hidrólise enzimática dos substratos foi realizada de acordo com um delineamento experimental do tipo compósito central de face centrada, desenvolvido a partir de um planejamento com três variáveis em dois níveis (2^3), conforme descrito na Tabela 2. Os experimentos tratados por “HP” referem-se à hidrólise da polpa kraft deslignificada, enquanto que os “HB” referem-se à hidrólise do bagaço de cana pré-tratado a vapor, sendo o número que acompanha o nome oriundo do planejamento apresentado na Tabela 2. As concentrações de complexo enzimático empregadas foram de 0,025 e 0,1 gramas por grama de celulose presente no substrato (base seca), de acordo com os resultados de análise química. Já a concentração do substrato variou entre 5 e 20% (m.v⁻¹) em relação ao peso seco do substrato, enquanto que a agitação, realizada em incubadora orbital da Tecnal, modelo TE-422, variou entre 150 e 200 rpm. O planejamento também envolveu um ponto central (PC) realizado em quintuplicatas, do qual foi derivada a variância do sistema (desvio-padrão).

O uso de tratamento estatístico tem por objetivo facilitar a visualização e interpretação dos resultados e suas tendências como um todo, visto que analisar os dados obtidos pontualmente potencializa a possibilidade de erros interpretativos. Sendo assim, optou-se pelo uso de um planejamento fatorial 2^3 pela sua facilidade em avaliar simultaneamente diferentes variáveis e com um número reduzido de experimentos a serem realizados.

TABELA 2 - VARIÁVEIS USADAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM FACE CENTRADA QUE FORAM EMPREGADAS NOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Exp.	Concentração de enzima (g.g ⁻¹ de celulose)	Concentração de substrato (%)	Intensidade de agitação (rpm)
H1	0,1	20	150
H2	0,025	20	150
H3	0,1	5	150
H4	0,025	5	150
H5	0,1	20	200
H6	0,025	20	200
H7	0,1	5	200
H8	0,025	5	200
H9 (PC)	0,0625	12,5	175
H10	0,0625	12,5	200
H11	0,0625	12,5	150
H12	0,0625	20	175
H13	0,0625	5	175
H14	0,1	12,5	175
H15	0,025	12,5	175

4.2.7 Análise estatística dos dados dos planejamentos fatoriais

A função resposta, empregada para analisar os resultados de hidrólise enzimática, correspondeu ao rendimento obtido após 24 e 72 h de sacarificação, sempre expresso em relação aos teores de celulose ou hemiceluloses (xilanas) presentes no substrato. A análise estatística dos dados foi realizada empregando o programa Excel, com o qual foram geradas as tabelas de análise de variância (ANOVA) e as superfícies de resposta, com base na seguinte equação,

$$\text{Conversão} = [I + S + A + E + E^2 + S^2 + A^2 + E * S + S * A + E * A] \quad (6)$$

onde “I” é a variável independente e os demais valores são multiplicados por um coeficiente, calculado com base nos resultados de cada planejamento fatorial, “S” é a consistência do substrato, “A” é a intensidade da agitação e “E” é a quantidade de complexo enzimático empregada.

Finalmente, os gráficos de Pareto foram gerados em planilha Excel através de uma média entre a diferença das conversões, conforme apresentado na seguinte equação,

$$\text{Efeito} = \frac{(A_{max}^1 - A_{min}^1) + (A_{max}^2 - A_{min}^2) + (A_{max}^3 - A_{min}^3) + (A_{max}^4 - A_{min}^4)}{4} \quad (7)$$

onde “A_{max}” é a conversão no nível máximo de uma variável “A”, “A_{min}” é a conversão no nível mínimo desta mesma variável e os índices correspondem aos experimentos cuja conversão foi obtida (1) nos níveis máximos das variáveis “B” e “C”, (2) nos níveis mínimo da variável “B” e máximo da variável “C”, (3) nos níveis máximo da variável “B” e mínimo da variável “C” e (4) nos níveis mínimos das variáveis “B” e “C”.

4.2.8 Hidrólise enzimática na presença de surfactante

Os ensaios de hidrólise enzimática na presença do surfactante não iônico Lutensol ON70 foram realizado em triplicata, em uma condição de hidrólise pré-definida através dos dados do planejamento fatorial. Neste sentido, optou-se por usar a condição do ponto central, com 0,0625 g de complexo enzimático por grama de celulose, 12,5 % de substrato e 175 rpm de agitação, devido à disponibilidade destes dados em um número razoável de replicatas. A preferência por este experimento também se deu pelo fato de ter resultado em uma conversão apenas parcial da biomassa lignocelulósica (aproximadamente 46 % da celulose presente no bagaço de cana pré-tratado a vapor), permitindo, assim, a visualização de qualquer interferência (seja ela positiva ou negativa) que o uso deste aditivo pudesse apresentar frente ao desempenho do complexo enzimático da Cellic CTec2. A concentração de surfactante escolhida se deu por ensaios realizados previamente com a mistura enzimática Celluclast 1.5L:Novozym 188, que indicaram perda da atividade enzimática a partir de concentrações superiores a 0,5 g.L⁻¹. Esta informação é portanto coerente com dados da literatura, onde se sugere que o uso de tensoativos em elevadas concentrações pode interferir na hidrólise enzimática por diminuir a eficiência de adsorção das enzimas sobre o substrato (ANDREAUS, FERREIRA FILHO, BON, 2008). O monitoramento da reação foi realizado conforme descrito no item 4.2.6 desta dissertação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

O procedimento de hidrólise ácida proposto por Klason e modificado por Gomide e Demuner (1986) proporciona a determinação da quantidade de lignina total do substrato analisado, juntamente com a quantificação dos principais monômeros constituintes dos polissacarídeos via análise cromatográfica dos hidrolisados. Estes resultados, expressos em relação à massa seca dos substratos celulósicos, estão apresentados na Tabela 3. Tais dados foram utilizados para projetar os experimentos e determinar os rendimentos de hidrólise, que estarão demonstrados nos próximos itens desta dissertação.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS USADOS NA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.

Componente	Substrato*	
	Polpa kraft deslignificada (%)	Bagaço pré-tratado (%)
Anidroglicose ¹	74,24 ± 1,03	54,96 ± 0,95
Anidroxilose ²	16,44 ± 0,42	3,76 ± 0,14
Anidroarabinose ²	nd ⁴	0,14 ± 0,02
Lignina solúvel ³	3,53 ± 0,34	0,98 ± 0,01
Lignina insolúvel ³	nd ⁴	31,10 ± 0,67
Cinzas	0,31 ± 0,03	6,69 ± 0,82
Total	94,53	97,63

* Dados apresentados em relação ao peso seco de cada substrato

¹ Presente como componente das β -(1-4)-D-glucanas (celulose)

² Presente como componentes das heteroxilanas (hemiceluloses)

³ Lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido sulfúrico diluído

⁴ Não detectado

O teor de umidade da polpa kraft deslignificada foi de $75,28 \pm 0,11$ % e do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor, $80,33 \pm 1,00$ %. Estes valores foram levados em consideração no preparo dos ensaios de hidrólise para cálculo da massa de substrato seco a ser adicionado na reação. A umidade do substrato foi descontada do volume final da reação, que foi de 100 mL.

A polpa kraft deslignificada é composta majoritariamente por celulose (74,24 %), contra 54,96 % do bagaço de cana pré-tratado a vapor. No entanto, o conteúdo

total de lignina do bagaço é de 31,10 %, enquanto que a polpa contém menos de 4 % deste componente. Este substrato, com baixa quantidade de lignina, foi escolhido para permitir a comparação com os estudos posteriores com bagaço de cana pré-tratado a vapor, a fim de avaliar a influência da sua presença no processo de hidrólise enzimática de biomassa.

Comparativamente à composição química do bagaço de cana (Tabela 1), a catálise fosfórica associada ao pré-tratamento por explosão a vapor diminuiu em aproximadamente 12 pontos percentuais o teor de xilose presente no substrato. Esta hemicelulose, por se apresentar mais disponível, foi hidrolisada pelo ácido e sua ausência deve conferir ao substrato maior acessibilidade. Devido à hidrólise de parte das hemiceluloses, o teor de lignina total aumentou em 3,48 pontos percentuais, no entanto o aumento no teor de glucose (cerca de 40 %) do substrato é favorável ao processo como um todo, uma vez que se pode hidrolisar mais material passível de fermentação.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE AS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

A fim de estabelecer relações entre os preparados enzimáticos de Cellic CTec2 e de Celluclast 1.5L enriquecida com Novozym 188 (mistura Celluclast:Novozym), fez-se um teste preliminar usando polpa kraft deslignificada como substrato a uma consistência de 5 % (m.v⁻¹) de celulose. A concentração de complexo enzimático utilizada foi de 3,36 g.L⁻¹ (peso úmido), o que, para a mistura de Celluclast:Novozym, corresponde a uma atividade de 5 FPU.g⁻¹ de substrato seco e a uma quantidade de proteína total de 1,96 g.L⁻¹, da qual 0,57 g.L⁻¹ corresponde à β -glucosidase adicionada na mistura. Já para o complexo enzimático Cellic CTec2, não foi possível expressar a atividade final por motivos de sigilo industrial. No entanto, a quantidade de proteína correspondente à concentração de complexo enzimático usada no ensaio foi de 3,43 g.L⁻¹. A Figura 5 mostra as conversões em equivalentes de glucose de cada um dos complexos enzimáticos em questão, ao longo de 96 h de hidrólise.

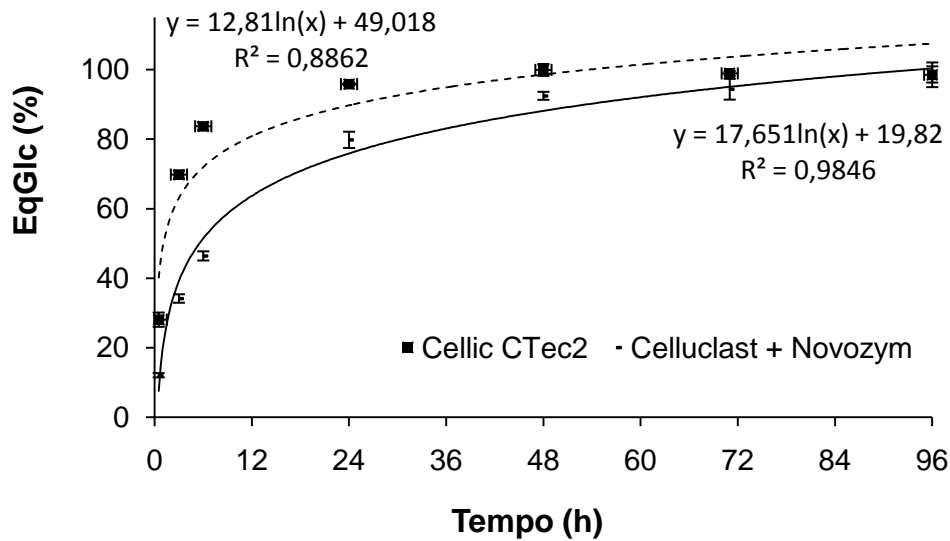


FIGURA 5 - HIDRÓLISE COMPARATIVA DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, EMPREGANDO A MESMA MASSA DE CELLIC CTec2 E DA MISTURA CELLUCLAST:NOVOZYM.

As duas curvas de hidrólise seguem um comportamento logarítmico, ambas com bons ajustes. Ao fim das 96 h de reação, os dois complexos enzimáticos foram capazes de hidrolisar 98 % do substrato deslignificado. Portanto, nos dois casos, houve muita semelhança entre os resultados oriundos da curva de hidrólise, a partir do que é difícil julgar qual mistura enzimática foi mais eficiente. No entanto, especialmente nos primeiros pontos da curva (e.g., 6 h), percebe-se que a velocidade inicial de hidrólise da Cellic CTec2 foi superior à velocidade inicial de hidrólise da mistura Celluclast:Novozym, revelando vantagens significativas no uso da primeira para o desenvolvimento de processos de produção de etanol celulósico ou de segunda geração. Esta superioridade pode ser confirmada no comparativo (Figura 6) realizado nas mesmas condições experimentais já mencionadas, porém, usando bagaço de cana de açúcar pré-tratado por explosão a vapor como substrato.

As curvas de hidrólise do bagaço de cana pré-tratado a vapor, novamente apresentadas em relação à liberação de equivalentes de glicose, apresentaram o mesmo comportamento logarítmico esperado para reações desta natureza. No entanto, a diferença entre os complexos enzimáticos foi significativa desde os primeiros momentos de contato com o substrato.

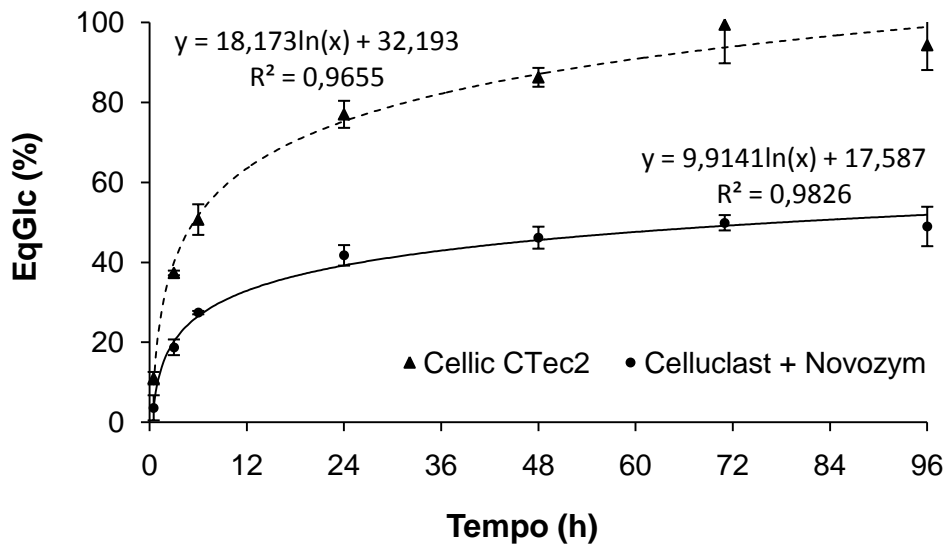


FIGURA 6 - HIDRÓLISE COMPARATIVA DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR, EMPREGANDO A MESMA CARGA ENZIMÁTICA DE CELLIC CTec2 E DA MISTURA CELLUCLAST:NOVOZYM.

Conforme os dados da Figura 6, o complexo enzimático Cellic CTec2 converteu 50 pontos percentuais de substrato a mais do que a mistura Celluclast:Novozym após 96 h de reação, demonstrando a sua superioridade frente à fenômenos de adsorção não produtiva (que não resulta em atividade catalítica) ou não específica, ou seja, sobre a lignina presente no substrato. No entanto, outros fatores podem ter influenciado este desempenho, como a resistência a fenômenos de transferência de massa que adviriam da presença da lignina no meio de reação, já que a concentração dos substratos foi estabelecida em relação aos seus respectivos teores de celulose. Logo, a relação mássica entre as quantidades de enzimas e de celulose foi mantida constante, mas não nos foi possível determinar se a atividade enzimática foi comparativamente a mesma, já que a dosagem enzimática não pode ser realizada em relação à eventuais medidas de atividade.

No que diz respeito à velocidade inicial da reação, o emprego de Cellic CTec2 permitiu a conversão de aproximadamente 84 e 62 % da celulose presente na polpa kraft deslignificada e no bagaço de cana pré-tratado a vapor, respectivamente, após 6 h de hidrólise. Como as endoglucanases atuam principalmente no início da reação de sacarificação da celulose, é provável que esta classe de enzima apresente maiores níveis desta atividade específica do que a mistura Celluclast:Novozym. No entanto, outras proteínas acessórias também podem fazer parte destes complexos enzimáticos e assim interferir neste processo, favorecendo ainda mais a obtenção de

taxas superiores de hidrólise, particularmente no caso da Cellic CTec2 (BAKER *et al.*, 2000).

Outro aspecto de grande relevância para procedimentos de hidrólise da celulose é a ocorrência de inibição pelo acúmulo de produtos no meio de reação, também denominada inibição retroativa (PALMQVIST *et al.*, 1996; KADAM, RYDHOLM, McMILLAN, 2004). No entanto, este parece não ter sido o caso nas condições em que os ensaios foram realizados, já que a concentração de celulose foi equivalente em ambos os experimentos. Foi também constatado, com base nos resultados de análise cromatográfica, que não houve qualquer acúmulo de celobiose em reações catalisadas pela mistura Celluclast:Novozym, ao passo que, em hidrólises baseadas no uso da Cellic CTec2, a celobiose foi detectada em baixas concentrações, correspondentes a no máximo 1,5 % de conversão final da celulose em equivalentes de glucose. Portanto, os resultados obtidos não devem estar associados à falta de atividade celobiásica no meio, já que o substrato foi totalmente hidrolisado em 96 h e que a concentração de celobiose esteve provavelmente abaixo de condições inibitórias durante todo o ensaio, levando ao conceito de que as diferenças no desempenho dos complexos enzimáticos não podem ser atribuídas à inibição retroativa das celobiohidrolases, mas, sim, à maior presença de atividade endoglucanásica no preparado comercial de Cellic CTec2 conforme já mencionado.

A solução de Cellic CTec2 utilizada neste estudo apresenta praticamente o dobro do teor de proteína apresentado pela mesma massa da mistura Celluclast:Novozym (10:3). Ou seja, para ensaios baseados na massa da mistura enzimática comercial, conforme ela se apresenta ao mercado, o uso de quantidades equivalentes destas preparações levaria a duas vezes mais proteína total na primeira em relação à segunda. Embora isto possa ser entendido como uma boa explicação para o melhor desempenho da Cellic CTec2, não nos foi possível investigar a correlação que existe entre o teor de proteínas e a presença de celulasas nestas preparações, considerando que as proteínas quantificadas possam ser acessórias.

Os dois complexos enzimáticos também foram comparados quanto à liberação de xilose durante o processo de hidrólise dos substratos. Neste sentido, ambas apresentaram comportamentos semelhantes aos da hidrólise da celulose (Figura 7), com 70 e 46 % das hemiceluloses (xilanas) hidrolisadas logo nas

primeiras 6 h de reação para o uso de Cellic CTec2 e Celluclast:Novozym, respectivamente. Este perfil também pode ser observado na hidrólise da polpa kraft deslignificada, guardadas as devidas proporções, bem como nos ensaios do planejamento fatorial que serão apresentados a seguir. No caso da polpa kraft deslignificada, a conversão em xilose atingiu 100 % em 6 h com a Cellic CTec2, enquanto que com a mistura Celluclast:Novozym, neste mesmo tempo de reação, atingiu 60 % de conversão das hemiceluloses.

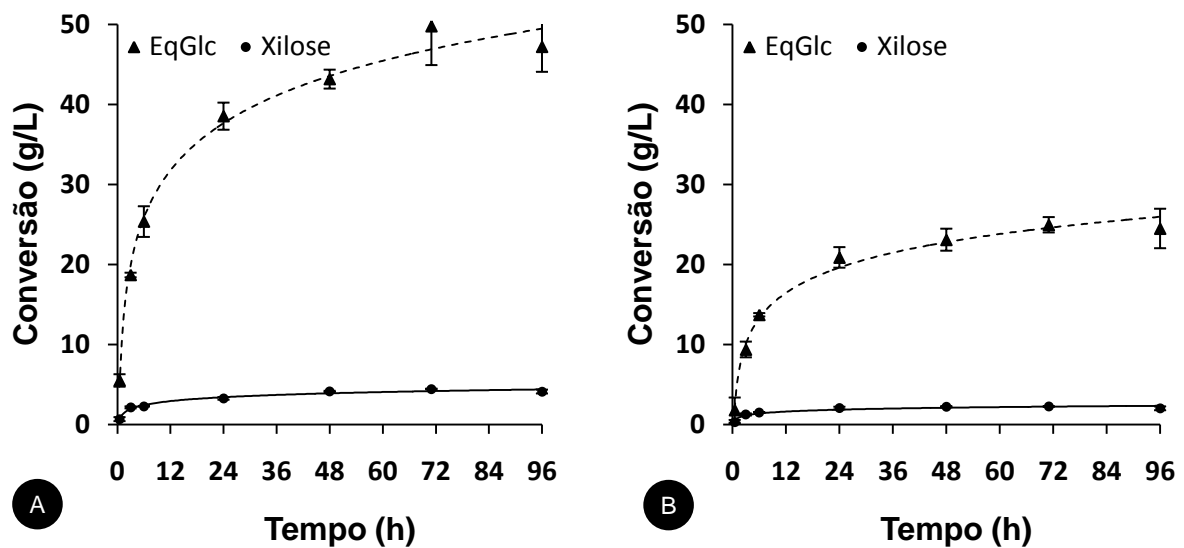


FIGURA 7 - HIDRÓLISE EXPRESSA EM EQUIVALENTES DE GLUCOSE E EM XILOSE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR AO LONGO DE 96 H USANDO CELLIC CTEC2 (A) E CELLUCLAST:NOVOZYM (B).

5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL USANDO POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA.

Os ensaios de hidrólise da polpa kraft deslignificada serviram principalmente para avaliar o comportamento dos complexos enzimáticos sobre um substrato celulósico praticamente puro, ou seja, sem a influência da lignina. A Tabela 4 apresenta os dados de conversão em porcentagem e em gramas por litro, sempre expressos em equivalentes de glucose, além da equação de regressão e do ajuste de cada uma das reações realizadas no planejamento fatorial. Tais experimentos seguiram as condições definidas na Tabela 2. Por outro lado, as cinéticas referentes

TABELA 4 - HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA E SEUS RENDIMENTOS EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO FATORIAL APÓS 24 E 72 H DE REAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.

Exp.	Conversão* (%)				Produção de EqGlc (g.L ⁻¹)			
	Regressão	Ajuste	em 24 h	em 72 h	Regressão	Ajuste	em 24 h	em 72 h
HP1	$y = 18,721\ln(x) + 4,3872$	0,9964	65,8	84,3	$y = 27,81\ln(x) + 6,5149$	0,9964	97,8	125,1
HP2	$y = 13,321\ln(x) - 5,3116$	0,9798	34,4	54,7	$y = 19,78\ln(x) - 7,8876$	0,9798	51,1	81,2
HP3	$y = 21,598\ln(x) + 36,144$	0,9711	116,7	120,0	$y = 8,0203\ln(x) + 13,422$	0,9711	43,3	44,1
HP4	$y = 14,773\ln(x) + 12,259$	0,9725	59,5	78,1	$y = 5,4891\ln(x) + 4,5551$	0,9725	22,1	29,0
HP5	$y = 16,561\ln(x) + 14,529$	0,9903	69,4	83,8	$y = 24,593\ln(x) + 21,575$	0,9903	103,0	124,5
HP6	$y = 15,156\ln(x) - 3,4605$	0,9784	50,1	59,8	$y = 22,505\ln(x) - 5,1378$	0,9784	74,3	88,8
HP7	$y = 22,091\ln(x) + 36,603$	0,9859	115,0	123,9	$y = 8,2027\ln(x) + 13,592$	0,9859	42,7	46,0
HP8	$y = 11,417\ln(x) + 11,68$	0,9892	44,8	63,9	$y = 4,2399\ln(x) + 4,3379$	0,9892	16,6	23,7
HP9 - A	$y = 13,052\ln(x) + 17,561$	0,9796	63,3	68,3	$y = 12,113\ln(x) + 16,298$	0,9796	58,8	63,4
HP9 - B	$y = 13,229\ln(x) + 18,587$	0,9821	62,0	74,4	$y = 12,28\ln(x) + 17,253$	0,9821	57,6	69,1
HP9 - C	$y = 13,045\ln(x) + 18,187$	0,9725	60,7	71,0	$y = 12,112\ln(x) + 16,886$	0,9725	56,3	65,9
HP9 - D	$y = 12,857\ln(x) + 20,058$	0,9738	64,1	76,4	$y = 11,932\ln(x) + 18,615$	0,9738	59,5	70,9
HP9 - E	$y = 13,587\ln(x) + 19,319$	0,9852	65,3	76,6	$y = 12,615\ln(x) + 17,937$	0,9852	60,6	71,1
HP10	$y = 14,83\ln(x) + 22,797$	0,9544	70,9	87,0	$y = 13,764\ln(x) + 21,158$	0,9544	65,8	80,7
HP11	$y = 15,799\ln(x) + 22,536$	0,9688	72,5	92,5	$y = 14,663\ln(x) + 20,916$	0,9688	67,3	85,9
HP12	$y = 17,256\ln(x) + 2,2905$	0,9864	59,7	75,8	$y = 25,628\ln(x) + 3,4017$	0,9864	88,6	112,6
HP13	$y = 19,554\ln(x) + 28,663$	0,9824	98,5	111,8	$y = 7,2626\ln(x) + 10,646$	0,9824	36,6	41,5
HP14	$y = 19,47\ln(x) + 31,399$	0,9911	98,7	113,1	$y = 18,079\ln(x) + 29,156$	0,9911	91,6	105,0
HP15	$y = 11,897\ln(x) + 11,365$	0,9318	50,3	67,9	$y = 11,045\ln(x) + 10,552$	0,9318	45,7	63,0

* Resultados baseados na liberação de equivalente de glucose no meio de reação.

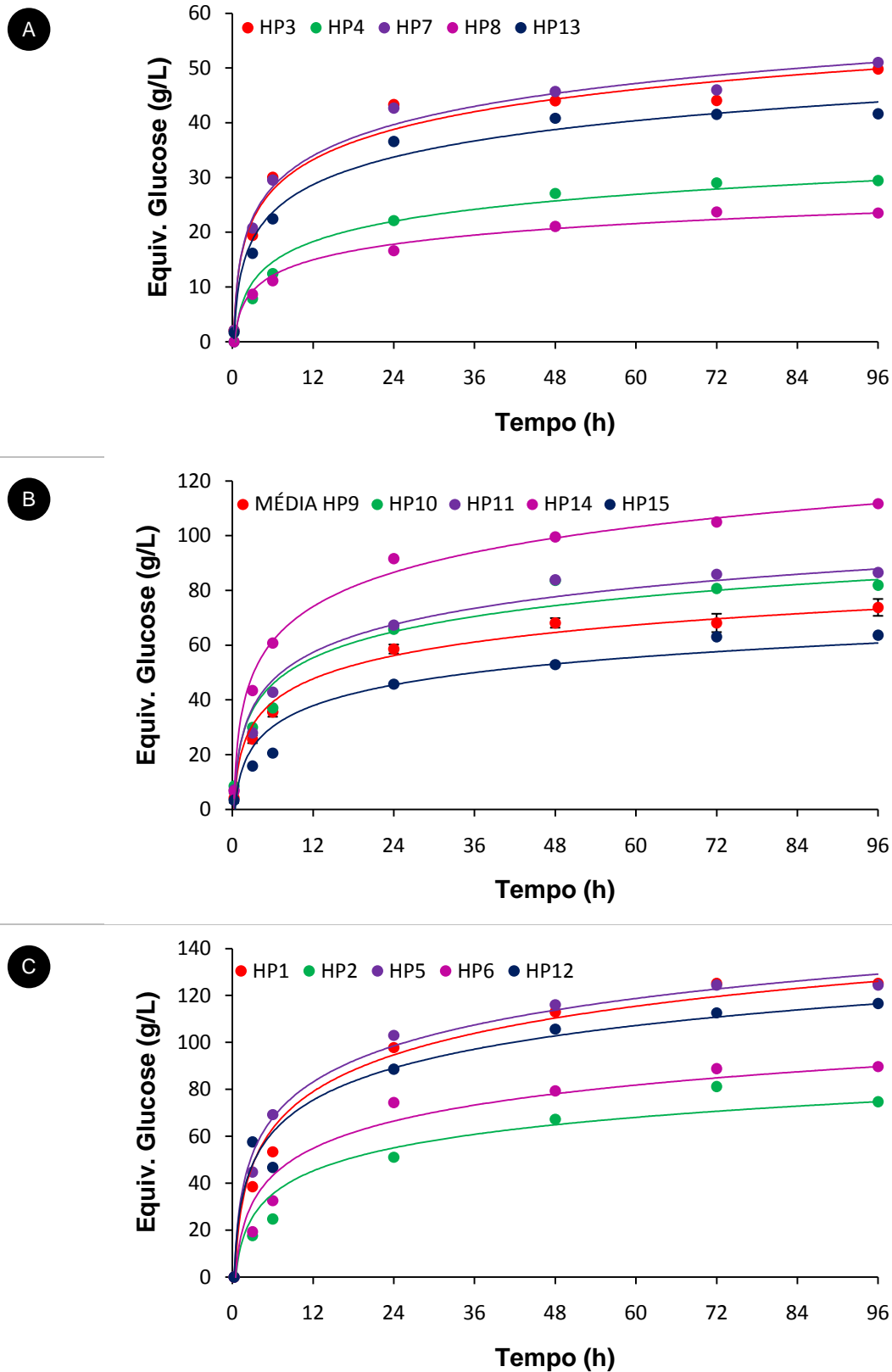


FIGURA 8 - HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA EM 5 % (A), 12,5 % (B) E 20 % (C) DE CONSISTÊNCIA, COM OS RESULTADOS EXPRESSOS EM G.L⁻¹ AO LONGO DE 96 H DE INCUBAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.

a cada uma das regressões apresentadas na Tabela 4, expressas em liberação de equivalentes de glucose em g.L^{-1} , estão representadas na Figura 8.

A escolha dos tempos de reação para o tratamento estatístico dos dados e para compilação das tabelas apresentadas a seguir foi motivada por considerações sobre as duas principais tecnologias de produção do etanol de segunda geração. Os tempos selecionados foram de 24 e 72 h de conversão, tendo em vista que o primeiro atenderia ao conceito de SSF e o segundo seria adequado para o conceito de SHF, ou seja, da realização da hidrólise e da fermentação em separado. No que diz respeito ao processo SSF, vários estudos propõem a adição da levedura (ou dos micro-organismos responsáveis pela fermentação) em menores tempos de hidrólise, geralmente da ordem de 12 h. No entanto, o ponto de 12 h não foi coletado neste estudo e, por esta razão, optou-se pelo uso do tempo de 24 h, evitando construir o modelo sobre um ponto estimado pela regressão logarítmica.

As equações logarítmicas apresentadas demonstram o bom ajuste do modelo em relação aos pontos experimentais da curva de hidrólise (variando entre 0,9318 e 0,9964). A apresentação dos resultados em conversão mássica (%) e em grama por litro (g.L^{-1}) se fez necessária devido a grandes variações na concentração de substrato presente no meio de reação. Isto significa que, na hidrólise da polpa kraft deslignificada a 5 % de consistência, conversões de 100 % (50 g.L^{-1}) representam menor liberação de açúcar livre do que a conversão de 50 % deste mesmo substrato a 20 % de consistência (100 g.L^{-1}), conforme ilustrado na Figura 9.

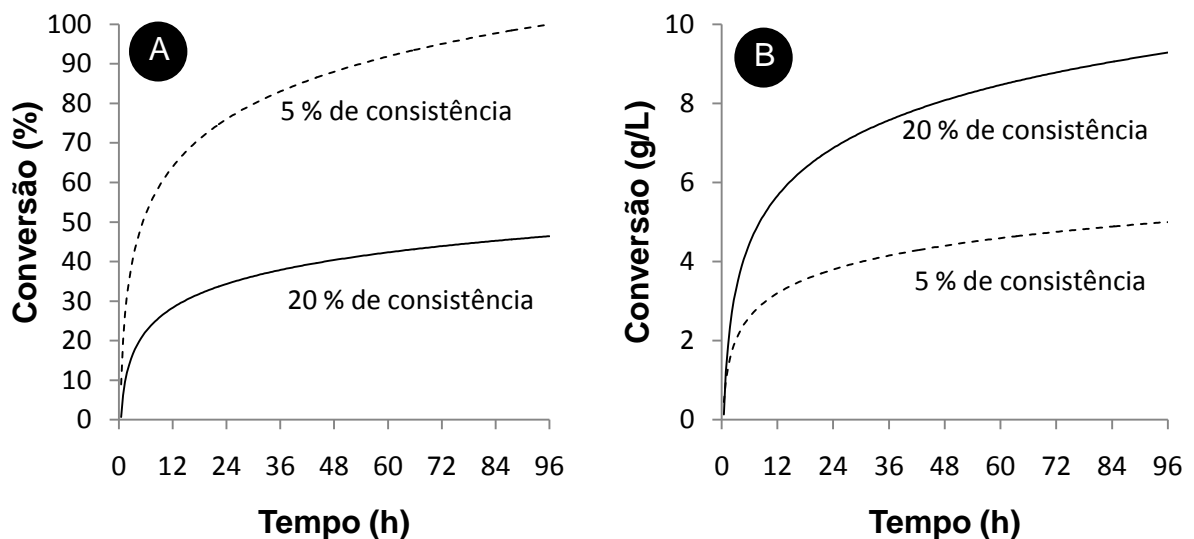


FIGURA 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA HIDRÓLISE EM CONVERSÃO MÁSSICA (A) E EM GRAMA POR LITRO (B), CONSIDERANDO QUE OS 5 E 20 % DE CONSISTÊNCIA CORRESPONDEM A TOTALIDADE DE MATERIAL HIDROLISÁVEL.

A conversão em porcentagem nos dá a resposta sobre a eficiência enzimática naquelas condições de agitação e concentração de substrato, enquanto que a conversão em gramas por litro nos dá a quantidade de açúcares disponíveis para o processo de fermentação e, portanto, para a produção de etanol de segunda geração. A interpretação estatística do planejamento fatorial será discutida nos próximos itens, e a influência de cada variável sobre a função resposta encontram-se nos gráficos de Pareto apresentados a seguir.

As Figuras 10 e 11 mostram os efeitos individuais e combinados de cada variável usada na hidrólise enzimática da polpa kraft, cujos resultados foram expressos em conversão percentual (10A e 11A) e em g.L^{-1} (10B e 11B) para os tempos de 24 e 72 h de reação. Nestes gráficos, o valor de “s” (linha pontilhada) foi calculado com base no desvio das replicatas realizadas no ponto central do planejamento fatorial 2^3 . Assim, todos os efeitos cujo valor for maior do que o “s” em módulo deverão ser considerados estatisticamente significativos. Ainda, os efeitos considerados de primeira ordem são aqueles analisados individualmente, os de segunda ordem são a associação de duas variáveis e o de terceira ordem, o efeito da sinergia entre as 3 variáveis do sistema.

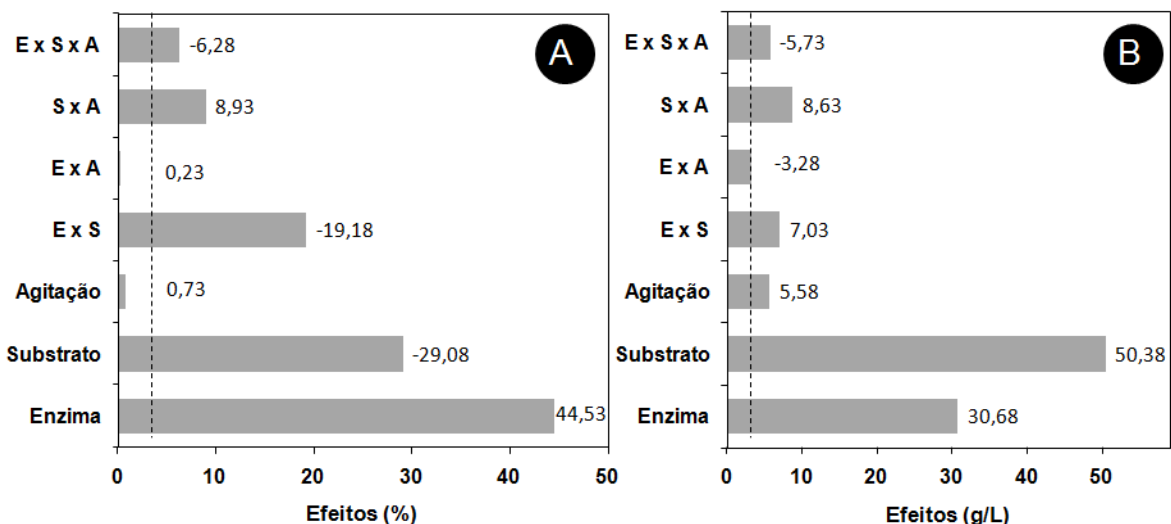


FIGURA 10 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), A) E EM G.L^{-1} (B).

A Figura 10 revela que em 24 h de hidrólise enzimática há um maior número de efeitos estatisticamente significativos do que aqueles obtidos após 72 h de

reação. Este fato é parcialmente justificado pela maior acessibilidade deste substrato à hidrólise, tendo em vista a sua baixa concentração de lignina. Para os efeitos de primeira ordem nos experimentos baseados em conversão mássica percentual, os relativos às concentrações de complexo enzimático (E) e de substrato (S) foram bem mais significativos, sendo que o aumento da concentração do complexo enzimático, do nível mínimo para o nível máximo, foi capaz de aumentar a conversão em 44,53 pontos percentuais, enquanto que o aumento da concentração de substrato gerou uma diminuição da eficiência de hidrólise em 29,08 pontos percentuais. Por outro lado, para os resultados expressos em g.L^{-1} , todos os efeitos de primeira ordem foram considerados significativos. Já quanto aos efeitos de segunda ordem, tanto para os dados de conversão percentual (Figura 10A) como para os dados de g.L^{-1} (Figura 10B), a única interação não significativa se deu entre as variáveis concentração de do preparado enzimático e agitação. No entanto, apesar destas tendências, prevalece a existência de interação significativa entre as três variáveis (ou efeitos de terceira ordem).

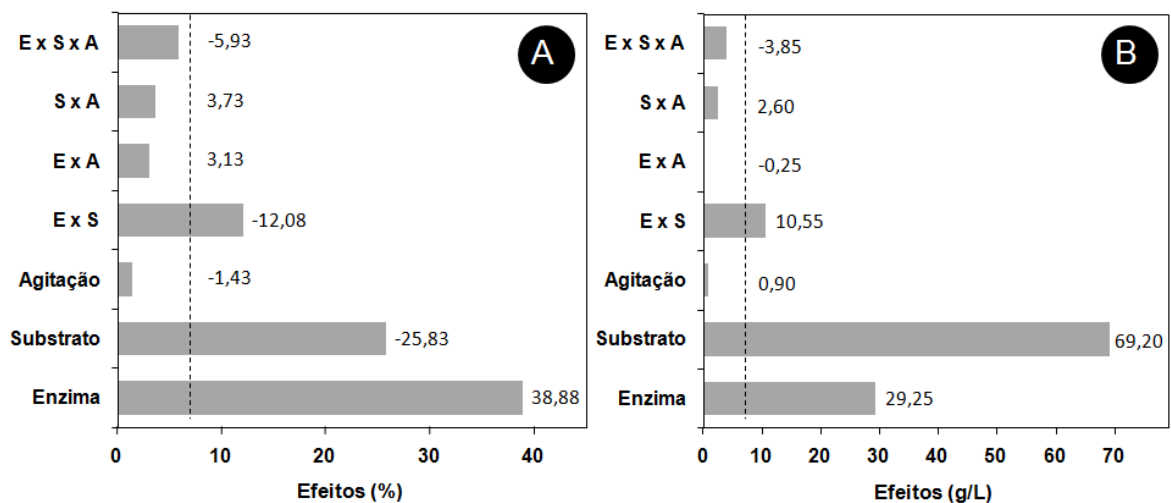


FIGURA 11 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), **(A)** E EM G.L^{-1} **(B)**.

É interessante observar que, para os resultados oriundos da hidrólise da polpa kraft deslignificada após 72 h, os efeitos de terceira ordem (para ambas as respostas) deixaram de ser estatisticamente significativos, sugerindo que a sinergia entre os efeitos se dá majoritariamente no início da reação. Os efeitos de segunda ordem também apresentaram o mesmo comportamento em relação à análise das

duas respostas (% e g.L^{-1}), onde apenas a interação entre as concentrações do complexo enzimático e de substrato se demonstrou estatisticamente significativa. Os efeitos de primeira ordem para ambas as respostas (% e g.L^{-1}) também apresentaram a mesma tendência, já que estas mesmas variáveis (concentrações de complexo enzimático e de substrato) foram as únicas estatisticamente significativas. Em dados reais, o aumento da concentração de complexo enzimático do nível mínimo para o nível máximo aumentou a conversão em 38,88 pontos percentuais e a produção de açúcares fermentescíveis em $29,25 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que o aumento da concentração de substrato apresentou efeitos significativos de caráter positivo sobre a quantidade de açúcares produzidos (de $69,2 \text{ g.L}^{-1}$) e de caráter negativo sobre as taxas de conversão mássica (de -25,83 pontos percentuais). Estes fatos podem ser comprovados pela análise da Figura 12 (cubos B e D), pois, fixadas as condições intermediárias de agitação e da concentração de complexo enzimático, o aumento da concentração de substrato de 5 para 20 % ocasionou um aumento de $71,1 \text{ g.L}^{-1}$ (de $41,5$ para $112,6 \text{ g.L}^{-1}$ na Figura 12D) na produção de açúcares fermentescíveis e uma diminuição de 36 pontos percentuais (de 111,8 para 75,8 % na Tabela 4, experimentos HP12 e H13) na conversão mássica da celulose em equivalentes de glucose.

5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL USANDO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PRÉ-TRATADO POR EXLPOÇÃO A VAPOR

Comparados à polpa kraft deslignificada, os experimentos realizados com bagaço de cana pré-tratado a vapor permitiram detectar a influência da presença da lignina na conversão do substrato em açúcares passíveis de fermentação. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Tabela 5, juntamente com a equação de regressão e o ajuste obtido para cada uma das reações realizadas no planejamento fatorial. Tais resultados estão mais uma vez representados em conversão mássica (%) e em gramas por litro, sempre em relação à liberação de equivalentes de glucose, conforme descrito anteriormente. Estes experimentos seguiram as condições definidas na Tabela 2 deste documento.

TABELA 5 - HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E SEUS RENDIMENTOS EM CADA EXPERIMENTO DO PLANEJAMENTO FATORIAL EM 24 E 72 H EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.

Exp.	Conversão* (%)**				Produção de EqGlc (g.L ⁻¹)			
	Regressão	Ajuste	em 24 h	em 72 h	Regressão	Ajuste	em 24 h	em 72 h
HB1	$y = 6,2575\ln(x) + 6,3623$	0,9668	26,0	32,4	$y = 6,9435\ln(x) + 7,0678$	0,9668	28,8	36,0
HB2	$y = 2,9269\ln(x) - 0,022$	0,8687	8,0	14,1	$y = 1,8138\ln(x) + 1,3565$	0,8687	8,9	16,2
HB3	$y = 11,985\ln(x) + 11,295$	0,9389	47,3	67,2	$y = 3,3253\ln(x) + 3,1345$	0,9389	13,1	18,6
HB4	$y = 4,066\ln(x) + 2,3065$	0,9849	13,5	22,4	$y = 1,1278\ln(x) + 0,655$	0,9849	3,8	6,2
HB5	$y = 20,276\ln(x) - 16,2$	0,8557	51,6	69,2	$y = 22,502\ln(x) - 17,97$	0,8557	57,2	76,8
HB6	$y = 4,2806\ln(x) + 1,3266$	0,9314	13,4	23,8	$y = 4,7543\ln(x) + 1,4721$	0,9314	14,9	26,5
HB7	$y = 16,885\ln(x) + 14,219$	0,9247	66,8	92,5	$y = 4,6841\ln(x) + 3,9504$	0,9247	18,6	25,7
HB8	$y = 6,5271\ln(x) + 4,8811$	0,9139	25,6	33,2	$y = 3,2482\ln(x) - 0,024$	0,9139	7,1	9,2
HB9 - A	$y = 8,689\ln(x) + 6,1901$	0,9055	33,4	47,3	$y = 6,0279\ln(x) + 4,2956$	0,9055	23,2	32,8
HB9 - B	$y = 8,8799\ln(x) + 4,3284$	0,9398	34,5	45,7	$y = 6,1597\ln(x) + 3,0022$	0,9398	24,0	31,7
HB9 - C	$y = 6,6172\ln(x) + 5,4197$	0,8873	34,2	47,5	$y = 4,5912\ln(x) + 3,7599$	0,8873	23,7	33,0
HB9 - D	$y = 8,3111\ln(x) + 7,1805$	0,9063	34,1	44,5	$y = 5,7654\ln(x) + 4,9836$	0,9063	23,7	30,9
HB9 - E	$y = 8,7743\ln(x) + 5,9053$	0,9948	34,3	46,1	$y = 6,0865\ln(x) + 4,2956$	0,9948	23,8	32,0
HB10	$y = 11,561\ln(x) + 7,5203$	0,8848	38,5	62,8	$y = 8,0201\ln(x) + 5,218$	0,8848	26,7	43,6
HB11	$y = 10,656\ln(x) + 8,8798$	0,9239	39,2	61,7	$y = 7,3928\ln(x) + 6,1624$	0,9239	27,2	42,8
HB12	$y = 14,492\ln(x) - 15,59$	0,9530	26,7	48,7	$y = 3,2228\ln(x) + 2,9945$	0,9530	29,7	54,0
HB13	$y = 11,615\ln(x) + 10,778$	0,9213	45,4	60,9	$y = 16,082\ln(x) - 17,3$	0,9213	12,6	16,9
HB14	$y = 11,092\ln(x) + 14,889$	0,9758	49,6	62,0	$y = 7,6947\ln(x) + 10,331$	0,9758	34,4	43,0
HB15	$y = 7,0234\ln(x) + 4,4761$	0,9159	25,6	36,6	$y = 4,8734\ln(x) + 3,1028$	0,9159	17,7	25,4

* Resultados baseados na liberação de equivalente de glucose no meio de reação.

As equações relacionadas na Tabela 5 apresentaram bons ajustes, que variaram entre 0,8687 e 0,9948. A conversão mássica máxima em 72 h foi de 92,49 % para o experimento HB7, enquanto que a maior quantidade de açúcar produzido foi de 76,79 g.L⁻¹ no experimento HB5. Esta diferença entre a maior conversão mássica e a maior produção de equivalentes de glucose em gramas por litro se deve à diferença nos teores de celulose presentes em cada reação. Por exemplo, no experimento HB1, os 36,08 % de rendimento correspondem a uma produção de 42,75 g.L⁻¹ de açúcar, enquanto que, no experimento HB8, os 34,15 % de rendimento representam apenas 10,14 g.L⁻¹ de açúcar fermentescível. Desta forma, através da porcentagem de conversão, obtém-se uma resposta relacionada à eficiência enzimática naquela condição experimental. Já na resposta dada em grama por litro, a informação obtida é sobre a viabilidade da implementação do processo de fermentação destes açúcares em etanol de segunda geração.

Os resultados de 24 h de hidrólise que merecem destaque (Tabela 5), em relação a uma conversão mássica elevada, aliada a uma alta produção de açúcares fermentescíveis, foram os do ensaio em que foi utilizado o maior nível das três variáveis do processo. Tais condições resultaram em 52 % de conversão da celulose e em 57 g.L⁻¹ de EqGlc. Neste mesmo sentido, o ensaio das faces centradas que gerou o melhor resultado foi aquele realizado sob maior concentração de complexo enzimático e níveis intermediários de agitação e concentração de substrato, de onde se obteve a conversão de 50 % do substrato e a liberação de 34 g.L⁻¹ de EqGlc. O mesmo estudo comparativo, realizado nos dados de 72 h de hidrólise, também indica que o ensaio com melhor correlação entre a conversão mássica e a produção de açúcares fermentescíveis foi o HB5 (maior nível de todas as três variáveis), enquanto que, nos resultados que representam as faces centradas, quatro dos seis experimentos se mostraram favoráveis. Portanto, neste caso, uma análise mais aprofundada dos custos associados ao aumento de cada variável seria necessária para identificar a condição de maior viabilidade. Finalmente, os ensaios da face centrada que não revelaram boa correlação entre as duas respostas foram os HB13 e HB15, com as variáveis concentração do complexo enzimático e agitação em nível intermediário e a concentração de substrato em nível mínimo (HB13) e com níveis intermediários de concentração de substrato e agitação e níveis mínimos de concentração de complexo enzimático (HB15).

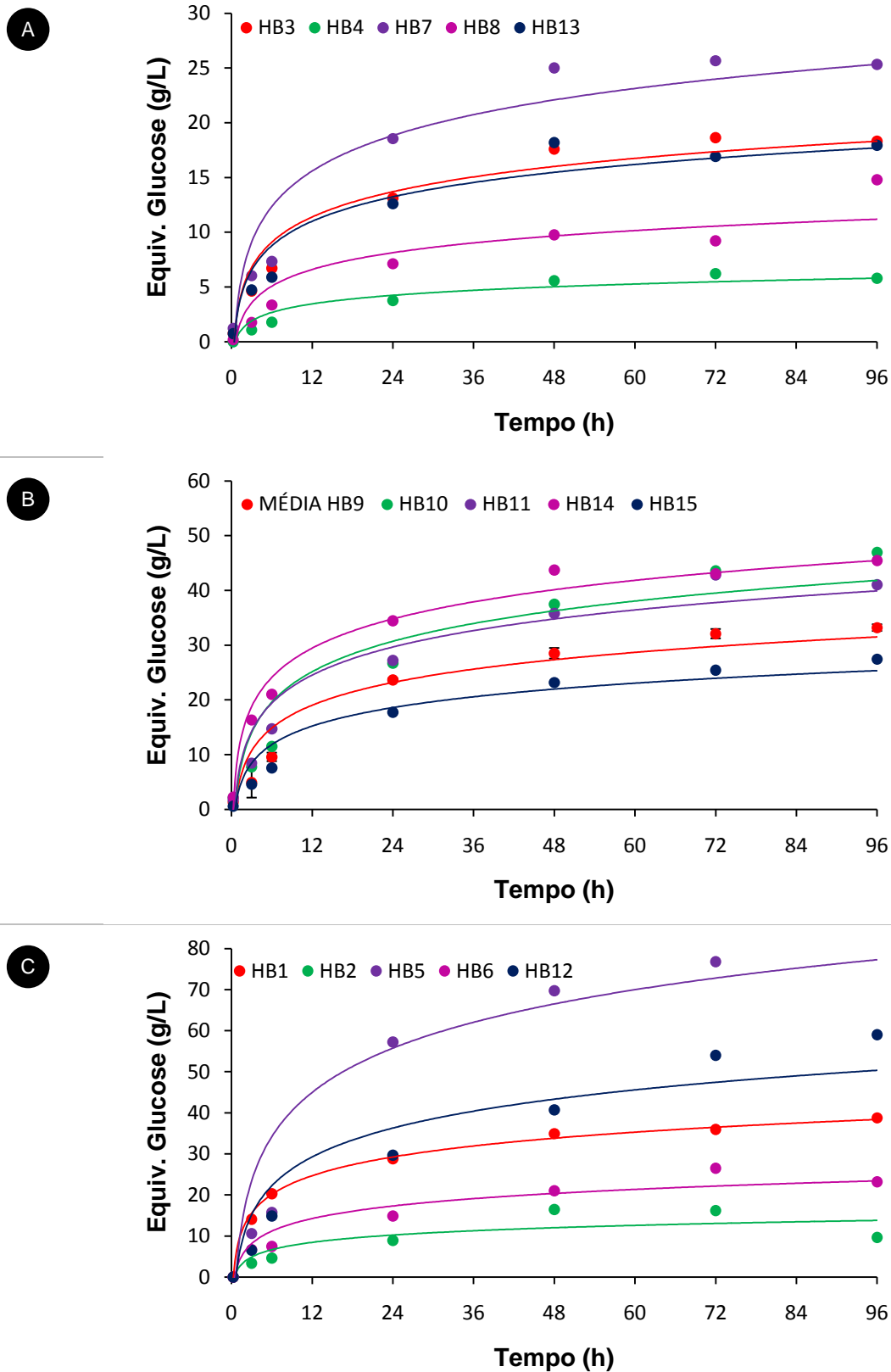


FIGURA 12 - HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM 5 % (A), 12,5 % (B) E 20 % (C) DE CONSISTÊNCIA, COM OS RESULTADOS EXPRESSOS EM G.L⁻¹ AO LONGO DE 96 H DE INCUBAÇÃO EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2.

As cinéticas que representam as equações logarítmicas do bagaço de cana pré-tratado a vapor, apresentadas na Tabela 5, estão demonstradas na Figura 12, onde os resultados estão expressos em g.L^{-1} .

Percebe-se também, quando analisados os dados das Tabelas 3 e 4, e especialmente os gráficos das Figuras 8 e 12, que os experimentos com bagaço de cana pré-tratado apresentaram menor conversão mássica do que os realizados com polpa kraft deslignificada sob as mesmas condições. Este fato pode ser justificado pela presença de lignina, que dificulta o acesso das enzimas ao material passível de hidrólise. No entanto, as justificativas associadas a esta tendência ficarão mais evidente no tratamento dos dados que será apresentado a seguir.

Os dados apresentados na Tabela 5 deram origem aos gráficos das Figuras 13 e 14, que foram construídos para avaliar o efeito de cada variável do planejamento fatorial (e de suas combinações) sobre as respostas desejadas em % e em g.L^{-1} . Os valores de “s” (linha pontilhada) dos gráficos de Pareto foram calculados com base nos desvios das replicatas realizadas no ponto central de cada resposta do planejamento e, por definição, todos os valores (em módulo) que forem maiores que os valores de “s” devem ser considerados estatisticamente significativos.

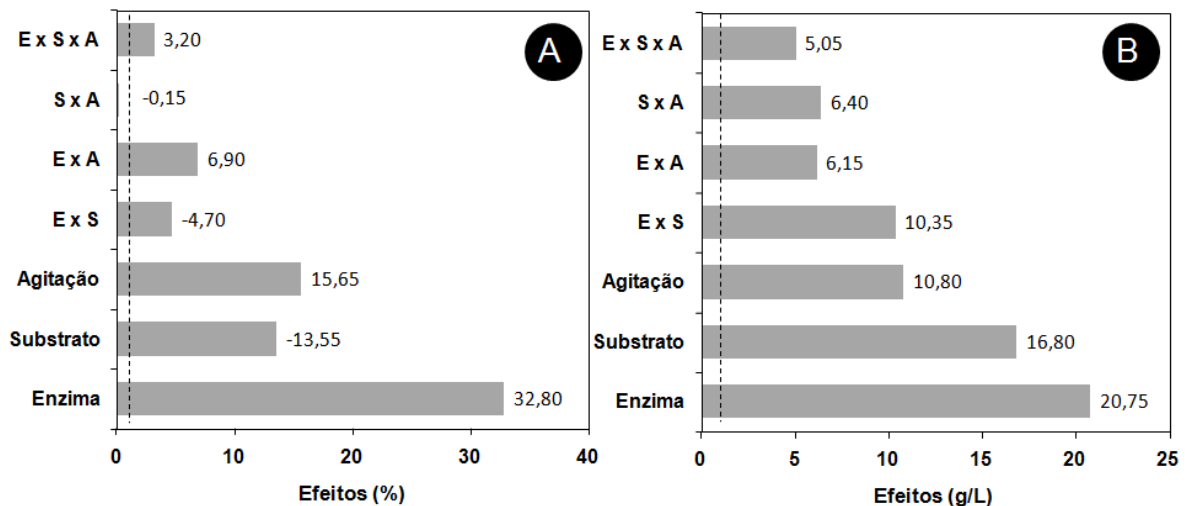


FIGURA 13 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), **(A)** E EM G.L^{-1} **(B)**.

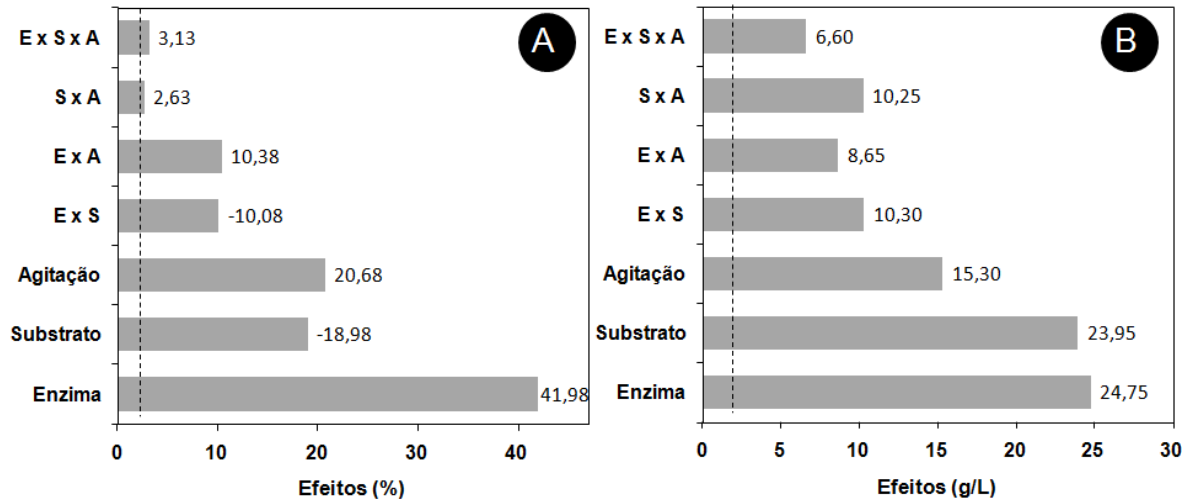


FIGURA 14 - GRÁFICOS DE PARETO REFERENTE AOS DADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMPARANDO AS RESPOSTAS EM CONVERSÃO MÁSSICA (%), **(A)** E EM g.L^{-1} **(B)**.

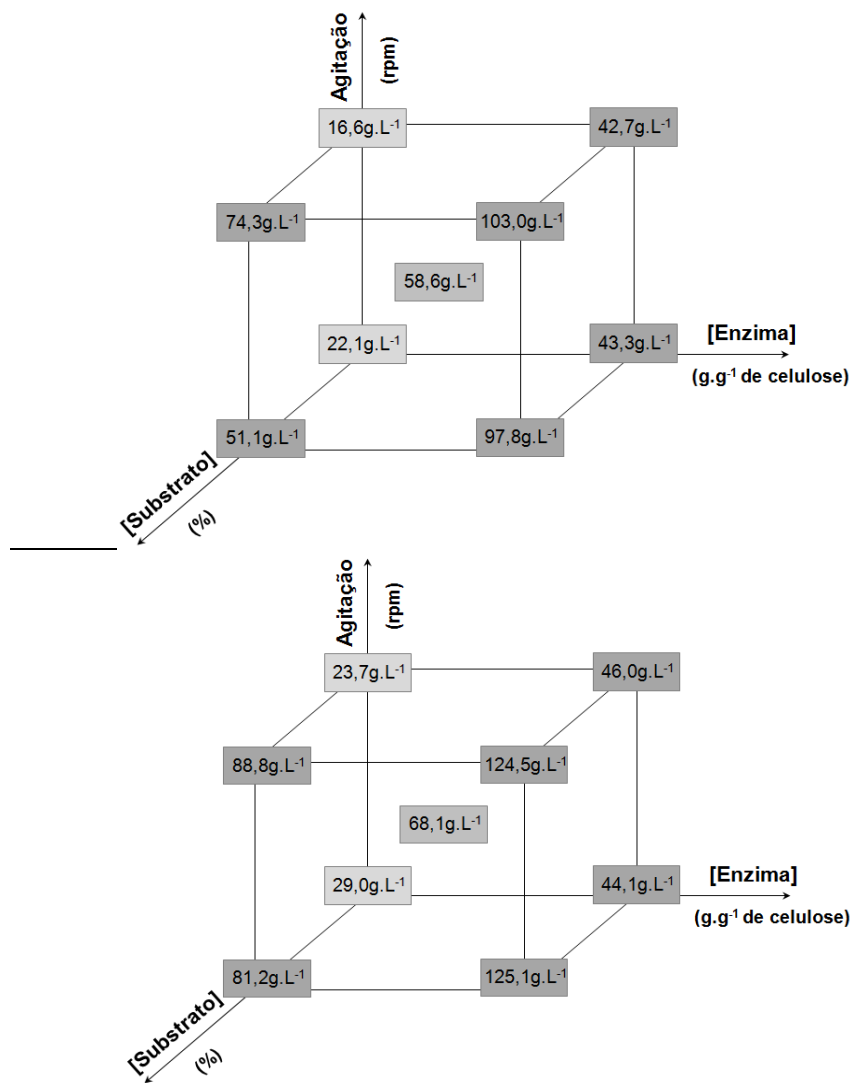
Tanto para 24 h como para 72 h, com os resultados de conversão em % ou em g.L^{-1} , todos os efeitos de primeira ordem foram considerados significativos. Já os efeitos de segunda ordem foram todos significativos nos ensaios de 24 e 72 h cujos resultados foram expressos em g.L^{-1} , enquanto que, quando os resultados foram expressos em %, a interação substrato-agitação não se mostrou estatisticamente significativa. Já o efeito de terceira ordem também foi significativo em ambos os casos, particularmente para os resultados expressos em g.L^{-1} , demonstrando um elevado grau de interação entre as três variáveis e a consequente dificuldade em interpretá-las separadamente. Os únicos efeitos significativos que apresentaram interferência negativa nos resultados de hidrólise foram a concentração de substrato e a interação do complexo enzima-substrato dos dados expressos em porcentagem. Na verdade, esta informação era esperada, uma vez que o aumento na concentração do substrato aumenta os problemas de transferência de massa e de inibição retroativa quando se pensa em eficiência enzimática (HUANG, PENNER, 1991; PALMQVIST *et al.*, 1996). Já quando a base de dados é baseada na produção de açúcares passíveis de fermentação, variáveis como a agitação e a concentração de substrato se mostram altamente significativas, podendo, neste último caso, causar um aumento na produção de EqGlc em até 23 g.L^{-1} em 72 h de reação ao variá-la de seu nível mínimo para o seu nível máximo. Além disso, o aumento da intensidade da agitação minimiza problemas como adsorção não específica das enzimas sobre a lignina.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA

Além das cinéticas já apresentadas anteriormente, fez-se também a representação, em formato de cubo de face centrada (Figura 15), dos dados de sacarificação da polpa kraft deslignificada após 24 e 72 h de reação, sempre expressando em liberação de equivalentes de glucose (em g.L^{-1}). A opção por estes tempos de hidrólise foi baseada nos principais conceitos para a produção de etanol celulósico (SSF e SHF, respectivamente), conforme já discutido neste trabalho. Assim, pode-se comparar as tendências dos dois substratos nas condições de hidrólise já definidas na Tabela 2. Além disso, a opção de usar apenas os dados em g.L^{-1} para o tratamento estatístico se deu pela maior relevância destes em relação ao objetivo de aplicá-los aos processos de produção de etanol celulósico conhecidos, como SSF e SHF, e que exigem elevadas concentrações de açúcares passíveis de fermentação.

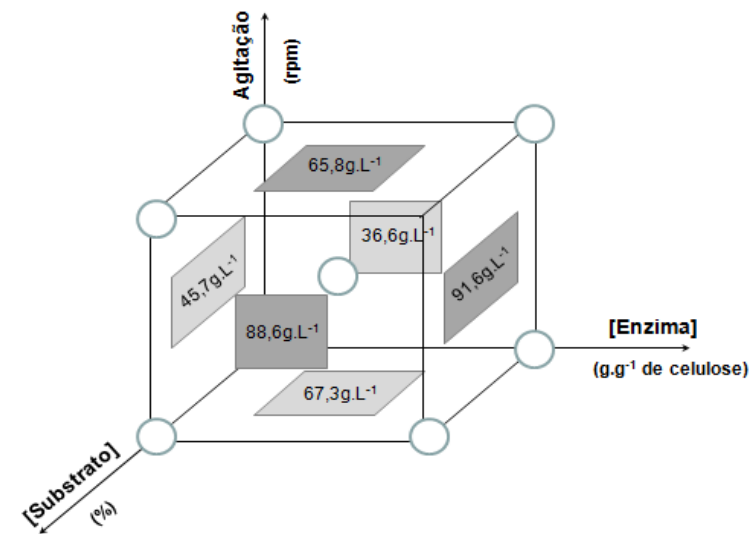
Os cubos 15A e 15C constituem os resultados provenientes apenas dos ensaios do planejamento 2^3 , perfazendo oito experimentos mais o ponto central, enquanto que os cubos 15B e 15D são compostos pelos resultados oriundos dos ensaios da face centrada (seis experimentos). Tais experimentos foram feitos para validar os dados de hidrólise enzimática da polpa, bem como para permitir a geração de superfícies de resposta que respeitassem um modelo quadrático.

A fim de avaliar a confiabilidade e representatividade dos resultados obtidos com este substrato parcialmente deslignificado, fez-se um estudo estatístico dos efeitos dos dados do planejamento fatorial para as respostas em g.L^{-1} derivado dos dados apresentados nos cubos 15 A e 15C da Figura 15. O ajuste é a razão entre a soma quadrática da regressão pela soma quadrática total, enquanto que a porcentagem máxima de variância é a razão da subtração entre a soma quadrática total e o erro puro pelo valor inteiro da soma quadrática total.



A

B



C

D

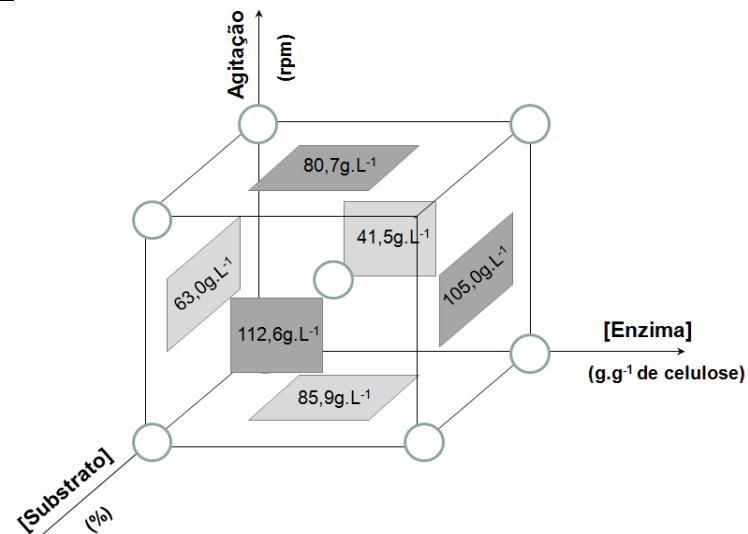


FIGURA 15 - REPRESENTAÇÃO EM CUBO E DE SUAS RESPECTIVAS FACES CENTRADAS DO PF DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2, RESULTADOS EM G.L⁻¹ DAS CONVERSÕES DE 24 H EM (A) E (B), E DE 72 H EM (C) E (D).

As análises de variância (ANOVA) dos dados apresentados deram origem às Tabelas 6 e 7, sendo que o ajuste (R^2) e a porcentagem máxima de variância (%Var) do modelo foram, respectivamente, de 0,957 e 0,955 para 24 h e de 0,952 e 0,950 para 72 h. As ANOVA correspondentes a estes pontos (24 e 72 h) do planejamento fatorial da polpa kraft deslignificada estão apresentadas nas Tabelas 6 e 7 a seguir.

TABELA 6 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM A POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA.

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F_{tabelado}
Regressão	9702,30	9	1078,00	22,34	3,18
Resíduo	434,33	9	48,26		
Falta de Ajuste	1,99	5	0,40	0,00	6,26
Erro Puro	432,35	4	108,09		
Total	10136,63	18			

* SQ = Soma quadrática; GL = Grau de liberdade; MQ = Média quadrática; F = Variância

TABELA 7 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM A POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA.

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F_{tabelado}
Regressão	14941,00	9	1660,10	19,98	3,18
Resíduo	747,79	9	83,09		
Falta de Ajuste	2,75	5	0,55	0,00	6,26
Erro Puro	745,04	4	186,26		
Total	15688,79	18			

* SQ = Soma quadrática; GL = Grau de liberdade; MQ = Média quadrática; F = Variância

A ANOVA foi realizada para os tempos de 24 e 72 h de hidrólise e apenas calculada com base nos dados em $g.L^{-1}$, conforme já explicado. Além disso, conforme já mencionado, a escolha dos tempos de reação basearam-se nas premissas de uso dos hidrolisados em processos de SSF e SHF, respectivamente.

Os resíduos mencionados nas Tabelas 7 e 8 são constituídos por duas fontes de erro: os erros experimentais de difícil controle total (chamados de erro puro) e as diferenças entre os dados gerados pelo modelo e os dados experimentais (chamadas de falta de ajuste). Com base nestas medidas, foi possível demonstrar a validação estatística do modelo quadrático do planejamento fatorial de face centrada

em questão, desenvolvido para a hidrólise enzimática da polpa kraft parcialmente deslignificada, já que foram obtidos valores adequados para o ajuste e para a porcentagem máxima de variância. A validação se dá quando a variância (F) da regressão for maior que o valor tabelado, e quando a variância da falta de ajuste for menor que a tabelada. O comportamento do modelo frente aos dados experimentais para 24 h também pode ser observado quando analisadas as superfícies de resposta, apresentadas na Figura 16, conforme o seguinte modelo matemático,

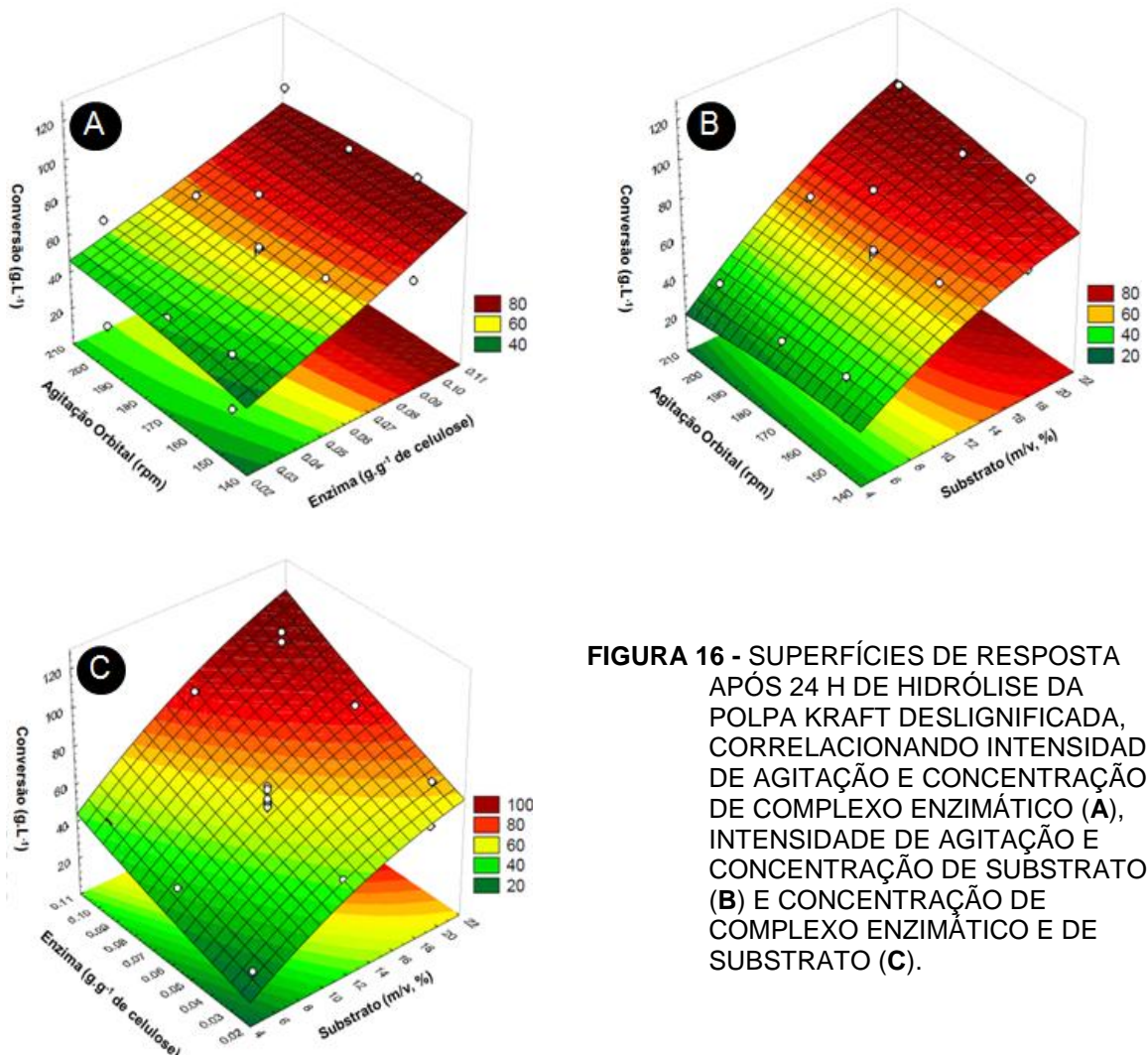


FIGURA 16 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 24 H DE HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, CORRELACIONANDO INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).

$$\begin{aligned} \text{Conversão} = & -42,9803 + 0,79S + 0,4845A + 504,4935E + 757,2967E^2 - 0,08865S^2 - \\ & 0,0017A^2 + 12,4889ES + 0,023SA - 1,7467EA \end{aligned} \quad (8)$$

Os gráficos da Figura 16 indicam que a tendência para maiores produções de açúcares se dá em maiores concentrações de complexo enzimático (16A e C), maiores concentrações de substrato especialmente quando combinadas com maior intensidade de agitação (16B) e com maiores cargas de complexo enzimático (16C). As tendências destinam os resultados para conversões de 120 g.L⁻¹ de equivalentes de glucose. Para 72 h de hidrólise, o comportamento do modelo frente aos dados experimentais além de poder ser mais bem observado nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 17, seguindo o modelo matemático a seguir,

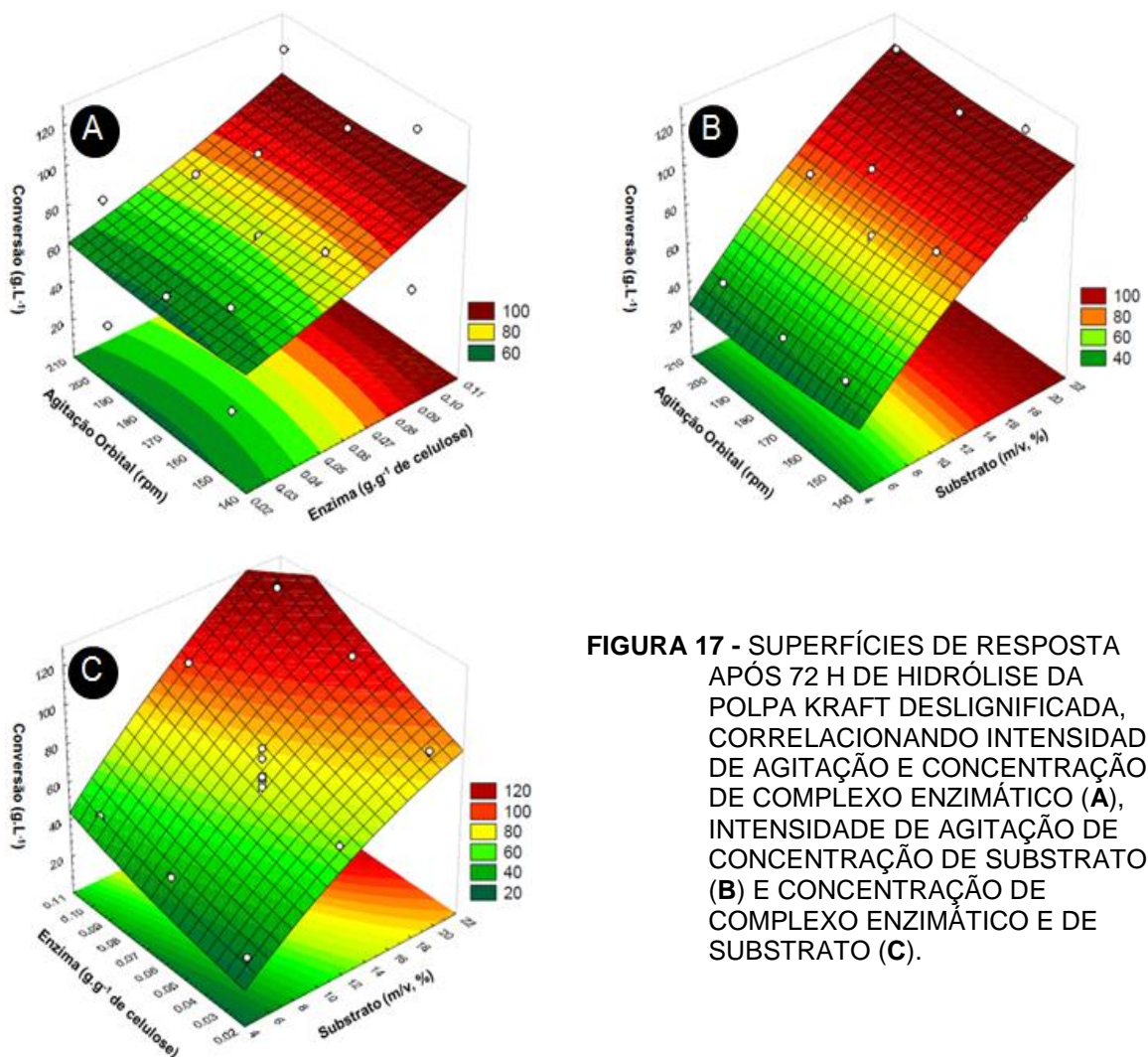


FIGURA 17 - SUPERFÍCIES DE RESPOSTA APÓS 72 H DE HIDRÓLISE DA POLPA KRAFT DESLIGNIFICADA, CORRELACIONANDO INTENSIDADE DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO (A), INTENSIDADE DE AGITAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (B) E CONCENTRAÇÃO DE COMPLEXO ENZIMÁTICO E DE SUBSTRATO (C).

$$\begin{aligned} \text{Conversão} = & 67,0717 + 4,5163S - 0,7331A + 47,7572E + 1321,0538E^2 - 0,0905S^2 + \\ & 0,0019A^2 + 18,7556ES + 0,0069SA - 0,1333EA \end{aligned} \quad (9)$$

Os gráficos de 72 h de hidrólise demonstram que não houve mudança no sistema reacional no que diz respeito a mudança nas tendências da variável resposta com relação às demais. Sendo assim, os resultados indicam o uso de maiores quantidades de complexo enzimático, concentração de substrato e intensidade de agitação quando se espera maior concentração de produto passível de fermentação no hidrolisado. Além disso, os pontos brancos nos gráficos representam a dispersão dos resultados experimentais obtidos e vale ressaltar que a sua pequena distância da superfície indica que o modelo matemático aplicado é capaz de prever as respostas de acordo com a mudança de cada variável dentro dos limites máximos e mínimos já estabelecidos no planejamento fatorial, corroborando assim a validação da ANOVA apresentada.

A previsibilidade dos dois modelos matemáticos apresentados em relação aos dados experimentais está representada na Figura 18. Portanto, a boa correlação observada entre os dados teóricos e experimentais assegura a possibilidade de que as superfícies de resposta obtidas sejam capazes de caracterizar o sistema reacional estudado.

Todos os ensaios realizados com a polpa kraft deslignificada apresentaram conversões superiores aos ensaios realizados com bagaço de cana pré-tratado a vapor sob as mesmas condições. Em alguns casos, após 24 h de hidrólise, já foi possível observar conversões próximas a 100 % (Tabela 4), particularmente nos experimentos realizados com menor concentração de substrato. Portanto, a celulose presente no substrato deslignificado mostrou-se bem mais acessível à ação dos preparados enzimáticos, seja pela ausência de lignina em sua estrutura, seja pela maior acessibilidade da estrutura supramolecular da celulose, já que o meio alcalino empregado no processo de polpação e o poder altamente oxidativo da etapa de branqueamento causam modificações profundas na cristalinidade, grau de polimerização e porosidade deste componente.

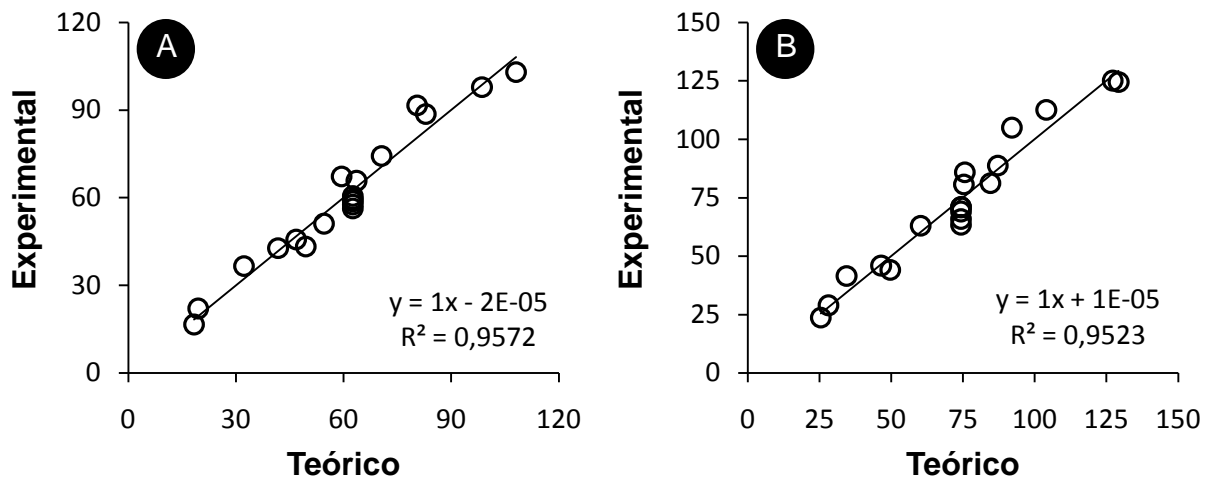
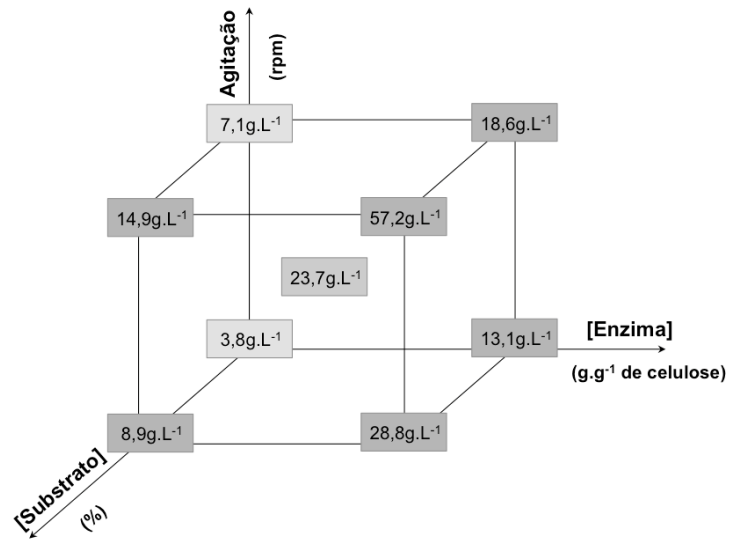


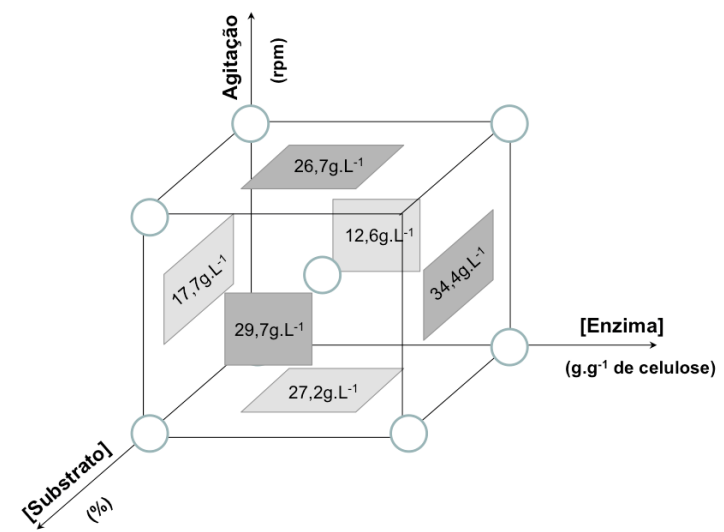
FIGURA 18 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS OBTIDOS DAS HIDRÓLISES DO PF USANDO POLPA KRAFT PARCIALMENTE DESLIGNIFICADA COMO SUBSTRATO, RESULTADOS DE 24 H (A) E 72 H (B).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR

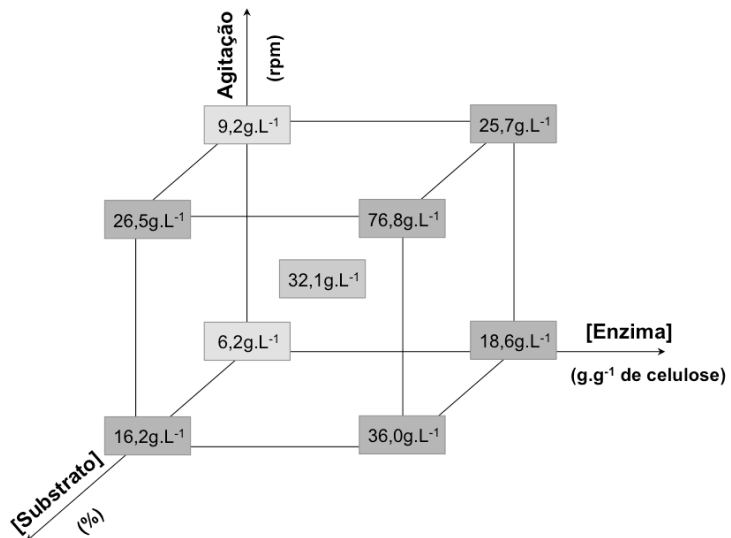
Para melhor visualização das tendências dos resultados apresentados na Tabela 5, a função resposta foi expressa em uma projeção cúbica onde os vértices representam os níveis máximos e mínimos das variáveis selecionadas (concentração de substrato, intensidade de agitação orbital e quantidade de complexo enzimático) e o seu centro geométrico representa o ponto central do planejamento experimental descrito na Tabela 2. Os cubos se encontram na Figura 19. A face centrada foi representada nas subdivisões B e D da figura.



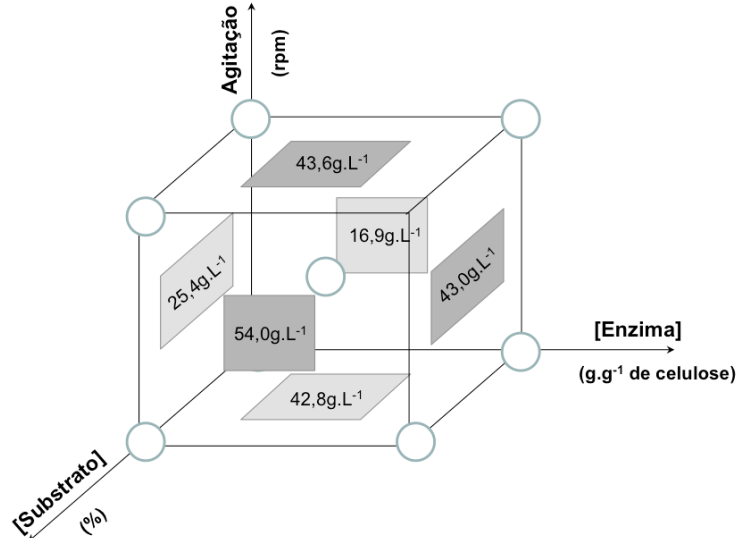
A



B



C



D

FIGURA 19 - REPRESENTAÇÃO EM CUBO E DE SUAS RESPECTIVAS FACES CENTRADAS DO PF DO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO POR EXPLOSÃO A VAPOR EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO DE CELLIC CTEC2, RESULTADOS EM G.L⁻¹ DAS CONVERSÕES DE 24 H EM (A) E (B), E DE 72 H EM (C) E (D).

Pode-se dizer que os resultados de 24 e 72 h (Tabela 5) apresentaram uma tendência de aumento do percentual de sacarificação da celulose no sentido de maiores níveis de agitação e de concentração de complexo enzimático sob as menores concentrações de substrato. No entanto, o aumento da concentração de substrato pode oferecer melhores condições para o processo de produção de etanol de segunda geração, mesmo em situações onde o percentual de sacarificação da celulose não tenha sido muito elevado. Sendo assim, para ambos os tempos de reação analisados, a tendência para maiores concentrações de produto se dá nos níveis máximos das três variáveis estudadas, chegando a produzir $57,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 24h e $76,8 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 h. Além disto, o aumento da quantidade de complexo enzimático está limitado por razões econômicas, devido ao seu alto custo de produção e grande impacto nos estudos de viabilidade econômica do processo. Já o aumento da intensidade de agitação orbital esteve limitado à capacidade de operação da incubadora disponível para este estudo. No entanto, mesmo sob estas limitações operacionais, os resultados oriundos deste trabalho foram extremamente satisfatórios para avaliar o complexo enzimático utilizado em condições de elevada concentração de substrato.

Os resultados obtidos com a polpa kraft deslignificada e com o bagaço de cana pré-tratado a vapor, no sentido do aumento da função resposta com variações na concentração de substrato, na quantidade de complexo enzimático empregada no ensaio e na intensidade de agitação, apresentaram as mesmas tendências, apesar da presença de altos teores de lignina no segundo caso. Nota-se também que, em todos os casos, o bagaço de cana pré-tratado a vapor apresentou menor acessibilidade, reforçando a hipótese da ocorrência de adsorção não específica da(s) enzima(s) sobre a lignina. Neste sentido, vale ressaltar que, em todos os experimentos de hidrólise, a carga enzimática foi expressa em relação à quantidade de celulose presente no substrato, e não ao teor de sólidos totais envolvidos na reação. Por consequência, nos experimentos realizados com os dois substratos na mesma concentração de sólidos totais (*e.g.*, 5, 12,5 ou 20 %), a quantidade de complexo enzimático utilizada para hidrolisar o bagaço de cana pré-tratado a vapor foi sempre menor do que aquela empregada para hidrolisar a polpa kraft deslignificada, já que o teor de celulose do primeiro era bem menor do que o teor de celulose do segundo.

Os resultados dos experimentos do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor análogos aos da polpa kraft parcialmente deslignificada também foram analisados estatisticamente através dos testes de análise de variância e de desenvolvimento das superfícies de resposta. As análises de variância dos dados apresentados deram origem às Tabelas 8 e 9, sendo que o ajuste (R^2) e a porcentagem máxima de variância (%Var) do modelo foram, respectivamente, de 0,947 e 0,944 para 24 h e de 0,905 e 0,895 para 72 h. O ajuste é a razão entre a soma quadrática da regressão pela soma quadrática total, enquanto que a porcentagem máxima de variância é a razão da subtração entre a soma quadrática total e o erro puro pelo valor inteiro da soma quadrática total.

TABELA 8 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 24 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR.

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F_{tabelado}
Regressão	2402,50	9	266,94	17,72	3,18
Resíduo	135,57	9	15,06		
Falta de Ajuste	0,22	5	0,04	0,00	6,26
Erro Puro	135,35	4	33,84		
Total	2538,07	18			

* SQ = Soma quadrática; GL = Grau de liberdade; MQ = Média quadrática; F = Variância

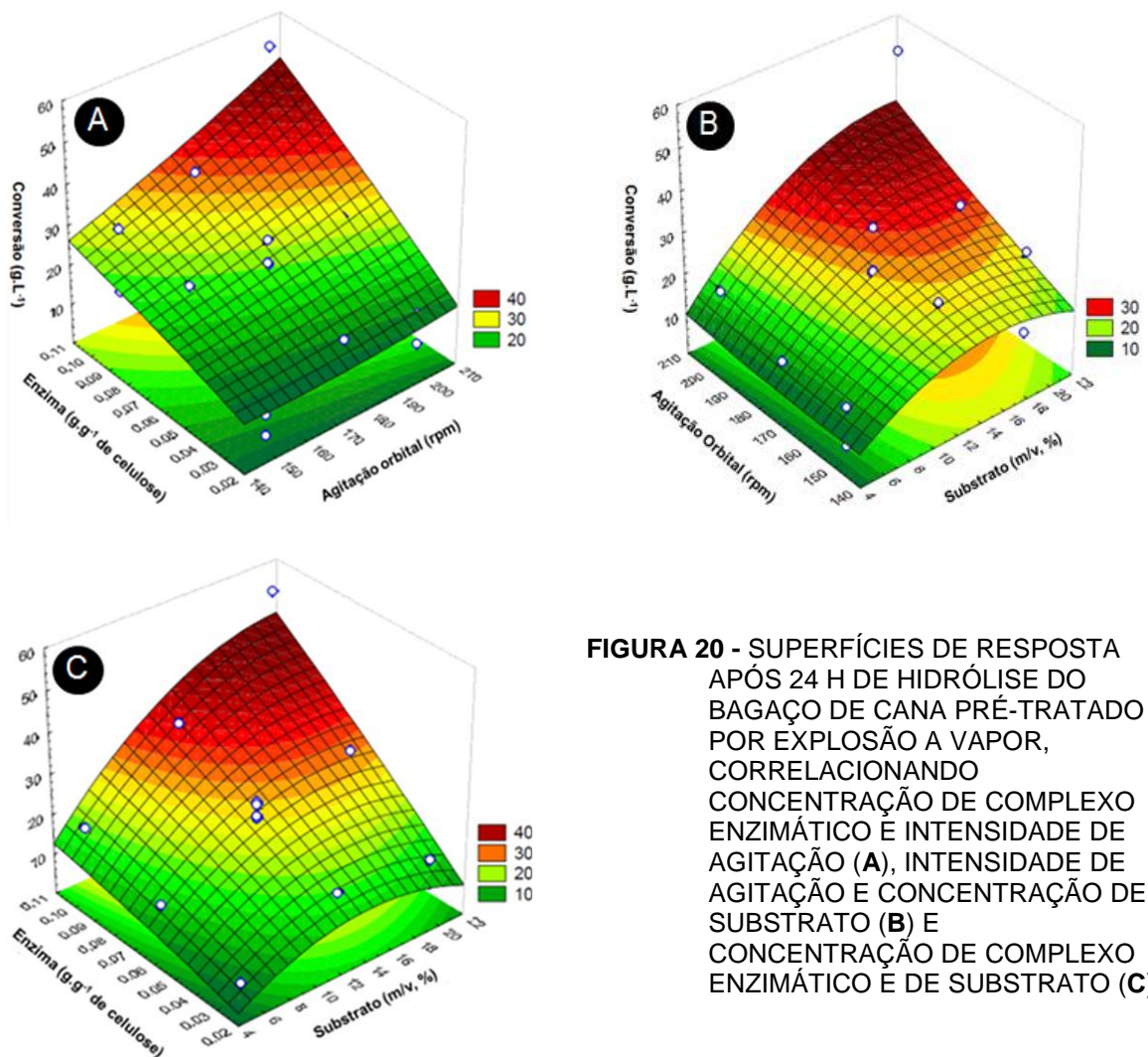
TABELA 9 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DOS RESULTADOS DE 72 H DO PLANEJAMENTO FATORIAL REALIZADO COM BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR.

FONTE	SQ	GL	MQ	F	F_{tabelado}
Regressão	4370,80	9	485,64	9,47	3,18
Resíduo	461,42	9	51,27		
Falta de Ajuste	1,90	5	0,38	0,00	6,26
Erro Puro	459,52	4	114,88		
Total	4832,22	18			

* SQ = Soma quadrática; GL = Grau de liberdade; MQ = Média quadrática; F = Variância

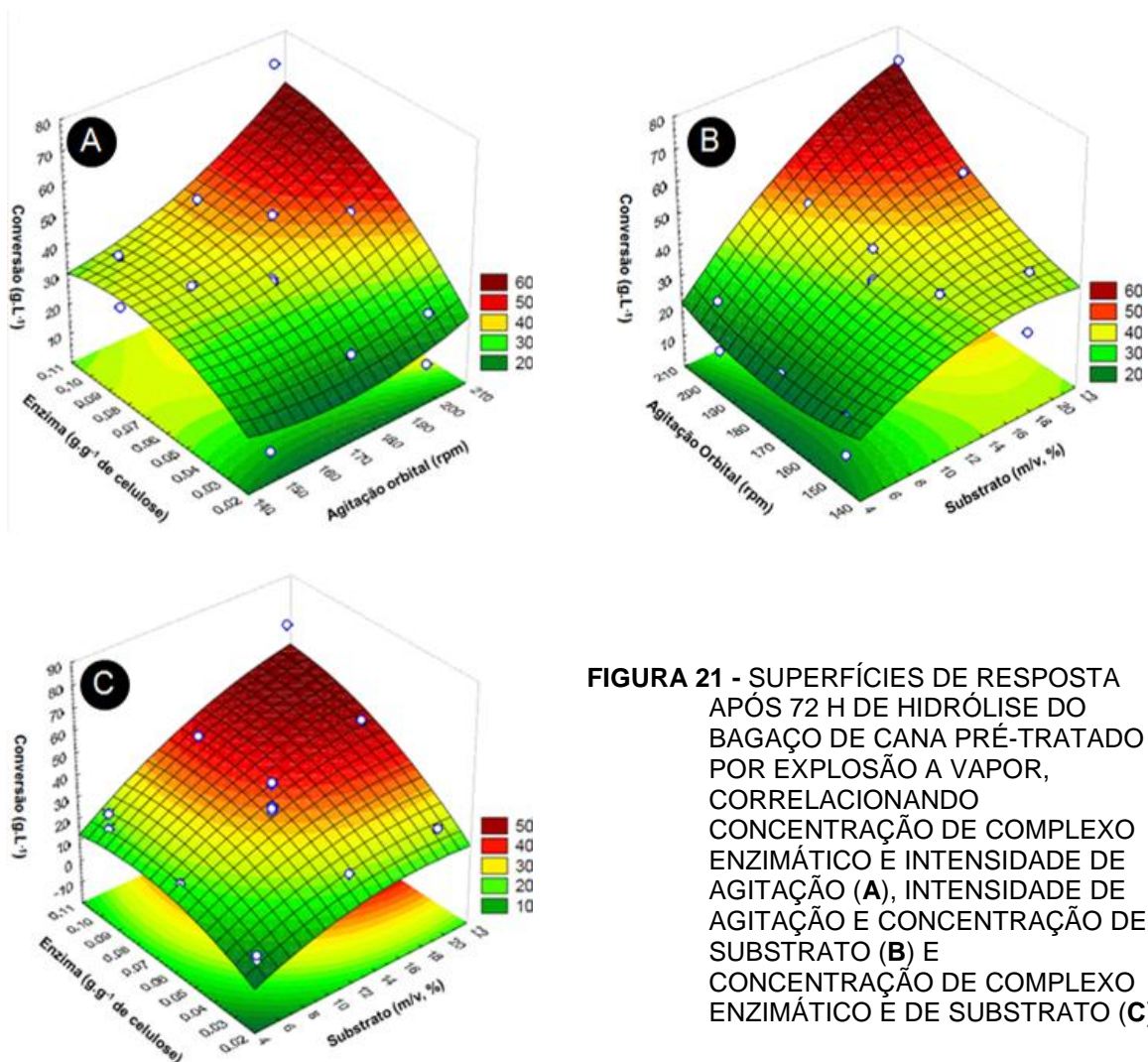
Conforme já descrito, os resíduos apresentados nas tabelas de ANOVA podem ser subdivididos em erro puro e falta de ajuste, sendo que o primeiro se refere aos erros experimentais do processo e o segundo está relacionado às diferenças entre os dados gerados pelo modelo e os dados experimentais. Assim, pode-se testar a validação estatística do modelo quadrático do planejamento fatorial

de face centrada em questão. O modelo desenvolvido para a hidrólise enzimática do bagaço de cana pré-tratado a vapor se mostrou adequado. A validação se dá quando a variância (F) da regressão for maior que o valor tabelado, e quando a variância da falta de ajuste for menor que a tabelada. O comportamento do modelo frente aos dados experimentais para 24 h também pode ser observado quando analisadas as superfícies de resposta, apresentadas na Figura 20, conforme o seguinte modelo matemático,



$$\begin{aligned} \text{Convers\~{a}o} = & 54,9738 - 0,6057S - 0,4691A - 495,1416E - 329,6403E^2 - 0,0964S^2 + \\ & 0,0006A^2 + 18,44ES + 0,0171SA + 3,268EA \end{aligned} \quad (10)$$

A mesma tendência observada para a polpa kraft também pode ser vista nos ensaios do bagaço pré-tratado, sendo que maiores produções de açúcares são vistas em maiores concentrações de complexo enzimático, de substrato e de intensidade de agitação. As superfícies de resposta são capazes de ilustrar e corroborar com estas conclusões, já detectadas ao analisar as representações em cubo dos ensaios. Para 72 h de hidrólise, as superfícies de resposta (Figura 21) seguem o seguinte modelo matemático,



$$\text{Convers\~{a}o} = 194 - 2,1S - 2,1A - 195E - 4238,3E^2 - 0,1S^2 + 18,3ES + 4,6EA \quad (11)$$

As maiores conversões, em 72 h, continuam sendo em condições experimentais idênticas às detectadas em 24 h. A Figura 21 confirma que o ótimo atingido com estes ensaios é atingido em maiores valores da concentração de substrato, complexo enzimático e de agitação. Podemos ainda atribuir a esta constatação a agressividade da Cellic CTec2 que, mesmo em menores tempos de reação (24 h), já apresentou elevadas taxas de conversão e tolerância ao acúmulo de produto no meio reacional. Especialmente quando se compara concentração de complexo enzimático e de substrato (21C), deve-se dar atenção especial a possibilidade de uso de concentrações intermediárias de complexo enzimático e de substrato, devido a uma diferença de aproximadamente 10 g.L^{-1} , com relação ao custo do processo como um todo.

Além de bons ajustes nas curvas de hidrólise (Figura 12 e Tabela 5) e nas análises de variância (Tabelas 8 e 9), os dados previstos pelo modelo matemático em relação aos dados experimentais (Figura 22) também apresentaram ajustes superiores a 0,9 na regressão linear entre os valores teóricos e experimentais, demonstrando, portanto, a representatividade estatística de suas respectivas superfícies de resposta.

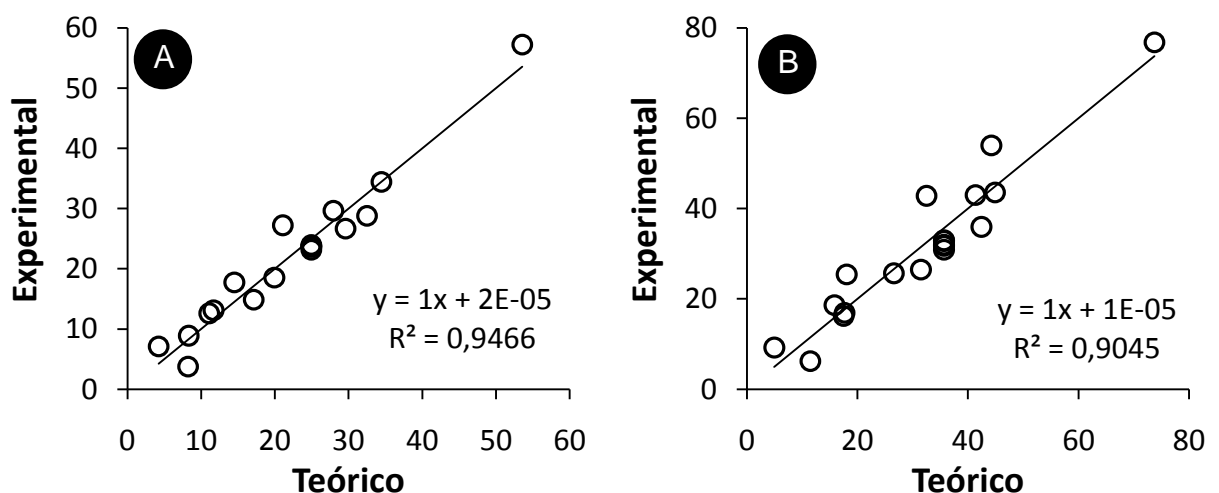


FIGURA 22 - CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS EXPERIMENTAIS E TEÓRICOS OBTIDOS DAS HIDRÓLISES DO PF USANDO BAGAÇO DE CANA PRÉ-TRATADO A VAPOR COMO SUBSTRATO, RESULTADOS DE 24 H (A) E 72 H (B).

5.7 EFEITO DO SURFACTANTE

Os surfactantes diminuem a tensão superficial do meio e, com isto, aumentam a molhabilidade do substrato. Por conseqüência, a acessibilidade das enzimas ao substrato aumenta, facilitando o processo de dessorção e aumentando a taxa de sacarificação enzimática da celulose (ZHANG, ZHANG, TANG, 2011; TJERNELD, ERIKSSON, BORJESSON, 2002). Neste trabalho, a escolha do surfactante baseou-se no fato de que surfactantes tanto aniônicos quanto catiônicos exercem um efeito negativo sobre a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, enquanto que, com o emprego de surfactantes não-iônicos, o efeito hidrolítico é potencializado (TJERNELD, ERIKSSON, BORJESSON, 2002; ANDREAUS, FERREIRA FILHO, BON, 2008). Além disso, sabe-se que a presença de excesso de surfactante no meio reacional inibe a ação enzimática através de uma provável influência sobre a sua estabilidade conformacional (ZHANG, ZHANG, TANG, 2011).

A fim de testar o efeito da adição do surfactante Lutensol ON70, atuando em conjunto com o preparado enzimático Cellic CTec2, um ensaio de hidrólise foi realizado e comparado com um ensaio controle (sem o aditivo), realizado nas mesmas condições operacionais. Este experimento controle é proveniente do ponto central realizado para o planejamento fatorial do bagaço pré-tratado a vapor, cuja cinética se encontra representada nas Figuras 12B (g.L⁻¹). A Figura 23 apresenta maiores detalhes sobre este estudo comparativo.

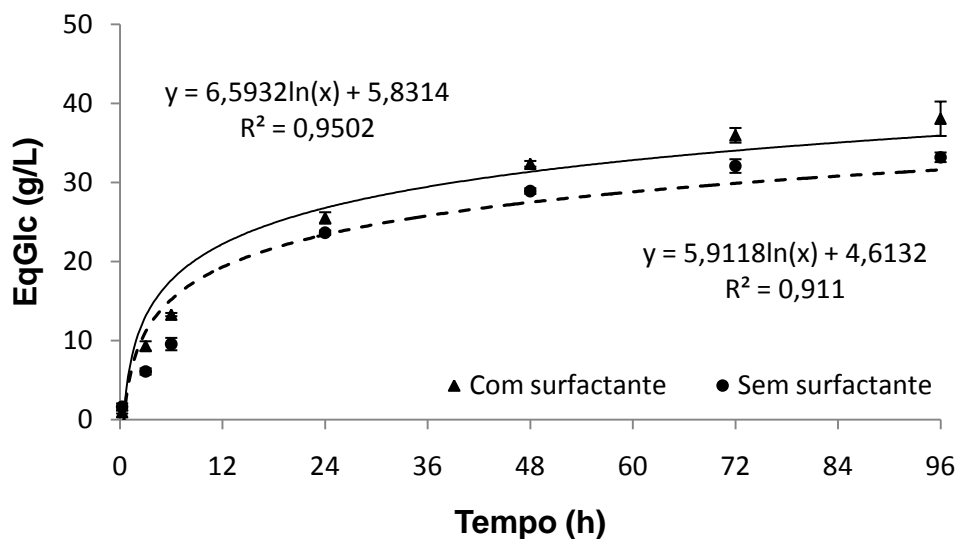


FIGURA 23 - COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DO SURFACTANTE LUTENSOL ON70 EM CONTATO COM O COMPLEXO ENZIMÁTICO CELLIC CTEC2.

Em ambos os ensaios, realizados em três replicatas, bons ajustes logarítmicos e pequenas margens de erro foram observadas, conforme demonstra a Figura 23. Desde as primeiras alíquotas, coletadas diretamente do meio de reação para a realização de análise por cromatografia a líquido, houve uma pequena diferença entre os ensaios realizados na ausência e na presença do surfactante, diferença esta que permaneceu até o final das 96 h de hidrólise. Porém, esta variação de aproximadamente 5 g.L^{-1} , particularmente no curso final da reação, representa 7 pontos percentuais entre os dados de conversão da celulose, ou seja, de 48 a 55 % de hidrólise. Em termos da produção de etanol no processo como um todo, este aumento na concentração de açúcares pode gerar cerca de 2 L a mais de etanol, ou aumentar em aproximadamente 2,5 % a produção de etanol por tonelada de cana processada, o que pode representar um ganho considerável ao final do processo. No entanto, esta diferença pode não ser assim tão significativa quando se leva em consideração o custo associado ao acréscimo de tensoativos nas concentrações previstas neste ensaio. Além disso, o efeito positivo da adição do surfactante pode não ser exclusivamente devido à sua ação tensoativa isolada, mas pela sua interação sinérgica com outros constituintes do preparado enzimático, como proteínas e outros tensoativos usualmente empregados na formulação destes produtos.

Este resultado também pode ser confrontado com o comparativo dos preparados comerciais Cellic CTec2 e Celluclast:Novozym que foi apresentado no item 5.2. Além das justificativas mencionadas naquela seção, como a eventual presença de uma maior concentração de endoglucanases no complexo enzimático de Cellic CTec2, a presença de enzimas acessórias que facilitem o acesso das celulasas ao substrato não pode ser descartada.

6 CONCLUSÃO

O estudo comparativo realizado entre os complexos enzimáticos utilizados neste trabalho demonstrou as vantagens associadas ao emprego da Cellic CTec2 para a hidrólise enzimática da celulose, particularmente quando o objetivo é a obtenção de maiores taxas de conversão em menores tempos de hidrólise. Este comportamento foi claramente observado através das cinéticas de reação, que revelaram velocidades iniciais de sacarificação duas vezes superiores para a Cellic CTec2, em comparação com a mistura entre Celluclast 1.5L FG e Novozym 188. Esta superioridade da Cellic CTec2 frente à concorrente pode ser atribuída a uma possível modificação na sua relação endo/exo, bem como na presença de uma maior concentração de enzimas ou proteínas auxiliares que visem facilitar o acesso das celulasas ao substrato.

Os delineamentos experimentais desenvolvidos neste trabalho demonstraram a possibilidade de atingir elevados rendimentos de hidrólise ou alta eficiência enzimática mesmo em experimentos de alta consistência e na presença de grandes quantidades de lignina no substrato, como no caso do bagaço de cana pré-tratado a vapor. No entanto, as conversões obtidas na ausência de lignina (ou seja, para a polpa kraft deslignificada) foram sempre superiores àquelas obtidas para o bagaço de cana pré-tratado a vapor, demonstrando o efeito negativo deste constituinte sobre hidrólise enzimática da celulose mesmo quando empregadas preparações enzimáticas de maior eficiência, como a Cellic CTec2.

Das três variáveis investigadas, respeitados os limites estabelecidos nos delineamentos, o aumento da velocidade de agitação orbital foi determinante para o aumento das taxas de conversão em experimentos realizados com materiais lignificados como o bagaço de cana pré-tratado a vapor. Isso demonstra o efeito da agitação sobre o processo de dessorção da(s) enzima(s) a partir de sua interação com complexos lignina-carboidrato, deixando-a(s) mais disponível(is) para atuar novamente sobre o seu substrato verdadeiro (celulose). De todas as condições avaliadas neste estudo, pode-se dizer que a hidrólise a 20 % de consistência e 200 rpm, empregando carga enzimática de $0,1 \text{ g.g}^{-1}$ de celulose, foi a condição mais eficiente para viabilizar a produção de açúcares fermentescíveis a partir do bagaço

de cana pré-tratado por explosão a vapor, pensando no processo de produção de etanol celulósico como um todo. Esta condição experimental chega a produzir 76,8 g.L⁻¹ de equivalentes de glucose cuja fermentação poderá gerar aproximadamente 39,2 g.L⁻¹ de etanol, ou seja, 248,1 litros de etanol a partir de 1 tonelada de bagaço processado (ZACCHI *et al.*, 2007; DOWE, McMILLAN, 2001). Com base nos dados divulgados pelo CTBE (Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol) para o etanol de primeira geração, isto representa um aumento potencial de 38,75 % na produção de etanol por tonelada de cana processada (aumento de 80 L para aproximadamente 111 L), considerando que a cana processada gera 12,5 % de bagaço (base seca). Portanto, a complexo enzimático Cellic CTec2 apresentou-se bastante eficiente na sacarificação de substratos celulósicos em alta consistência, embora a carga enzimática necessária para propiciar rendimentos máximos de açúcares fermentescíveis foi duas vezes superior à recomendada pelo fabricante para a hidrólise de substratos celulósicos pré-tratados.

Finalmente, a adição do surfactante não iônico Lutensol ON70 ao meio de reação, empregando concentrações de substrato da ordem de 12,5 % (ponto central do planejamento), causou um aumento interessante nos rendimentos de hidrólise. No entanto, as vantagens associadas ao seu uso ainda deverão ser comprovadas, particularmente em relação ao seu valor de mercado.

7 Referências

- ALVO, P., BELKACEMI, K. Enzymatic saccharification of milled Timothy (*Phleum pretense L.*) and alfafa (*Medicago sativa L.*). **Bioresource Technology**, v. 61, 1997, p. 185-198.
- ANDREAUS, J. FERREIRA FILHO, E.X., BON, E.P.S. Biotechnology of hollocelulose degrading enzymes (Cap. 11). In: Ching T. Hou e Jei-Fu Shaw. **Biocatalysis and Bioenergy**. Hoboken, NJ, EUA: John Wiley, 2008, p. 197-229.
- ARANTES, V., SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, 2010, v. 3, p. 4.
- ATTALA, R.H. The structure of native cellulose. In: **Proceedings of Tricel Symposium on *Trichoderma reesei* Cellulases and Others Hydrolases**. Helsinque, Finlândia: Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, v. 8, 1993, p. 281-290.
- BAKER, J.O., KING, M.R., ADNEY, W.S., DECKER, S.R., VINZANT, T.B., LANTZ, S.E., NIEVES, R.E., THOMAS, S.R., LI, L.C., COSGROVE, D.J., HIMMEL, M.E. Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Applied Biochemistry**, v. 84, 2000, p. 217-223.
- BALAN, V., LI, B., YUAN, Y., DALE, B.E. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 101, 2010, p. 1285-1292.
- BASTOS, V.D. **Etnol, Alcoolquímica e Biorrefinarias**. BNDES Setorial. Rio de Janeiro, nº 25, p. 5-38, mar. 2007.
- BASF, Technical information. Lutensol ON types. 2004.
- BEAZA, J., ARAQUE, E., PARRA, C., FREER, J., CONTRERAS, D., RODRÍGUES, J., MENDONÇA, R. Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radiata* D. Don to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, nº 2, 2008, p. 214-219.
- BON, E.P.S., GÍRIO, F., PEREIRA, N.J. Enzimas na produção de etanol (Cap. 10). In: BON, E.P.S., FERRARA, M.A. e CORVO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Interciência, 2008, p. 241-271.
- CAMASSOLA, M., DILLON, A.J.P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Industrial Crops and Products**, v. 29, 2009, p. 642-647.

CASTRO, E., MESA, L., GONZÁLES, E., ROMERO, I., CARA, C. e FELISSIA, F. Preliminary evaluation of organosol pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 23 experimental design. **Applied Energy**, v. 87, 2010, p. 109-114.

CAVACO-PAULO, A. **Influência da agitação mecânica e da composição enzimática no tratamento de algodão com celulases**. Universidade do Minho. 76 p., Dissertação de Doutorado, Escola de Engenharia, Braga, Portugal, 1995.

CAVACO-PAULO, A., ALMEIDA, L., BISHOP, D. Effects of agitation and endoglucanase pretreatment on the hydrolysis of cotton fabrics by a Total Cellulase. **Textile Research Journal**, v. 66, 1996, p. 287-294.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnol. Gen. Eng. Rev**, v.3, 1985, p.39-109.

COUGHLAN, M.P., HAZLEWOOD, G.P. β -1,4-D-Xylan-degrading enzymes systems: biochemistry, molecular biology and applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 17, 1993, p. 259-289.

CURRELI, N., FADDA, M.B., RESCIGNO, A., RINALDI, C.A., SODDU, G., SOLLAI, F., VACCAURGIU, S., SANJUST, E., RINALDI, A. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. **Process Biochemistry**, v. 32, 1997, p. 665-670.

D'ALMEIDA, M.L. O. Composição química dos materiais lignocelulósicos. In: **Celulose e Papel – Tecnologia de Fabricação da Pasta Celulósica**, 2ª. ed., vol.1, 1988. São Paulo: Instituto de Pesquisas do Estado de São Paulo.

DENCE, C.W., LIN, S.Y. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer Verlang, 1992.

DOWE, N., McMILLAN, J. Laboratory Analytical Procedure (LAP-008). National Renewable Energy Laboratory, NREL. Golden, CO, USA, 2001.

DUMITRIU, S. **Polysaccharides: structural diversity and functional versatility**, 2ª ed. Nova York, EUA: Marcel Dekker, 2005.

ESTEGHLALIAN, A.R., INGRENSSON, H., ZACCHI, G., YANG, B., SADDLER, J. N. The effect of shaking regime on the rate extent of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Journal of Biotechnology**, v. 88, 2001, p. 177-182.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FIORAVANTI, C. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, CTBE: O etanol que mobiliza o mundo. Acessado em: 18.out.2011. Disponível em: < <http://www.bioetanol.org.br/noticias/detalhe.php?ID=NDQz> >

GAO, D., CHUNDAWAT, S.P.S., KRISHNAN, C., BALAN, V., DALE, B. Mixture optimization of six core glycosyl hydrolases for maximizing saccharification of

ammonia fiber expansion (AFEX) pretreated corn stover. **Bioresource Technology**, v. 10, 2010, p. 2770-2781.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, 1987, p. 257- 268

GONÇALVES, A.R., SAAD, M.B.W., OLIVEIRA, L.R.M. CÂNDIDO, R.G., QUINTANA, G. e ROCHA, G.J.M. Preliminary studies on fungal treatment of sugarcane straw for organosolv pulping. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, 2008, p. 220-225.

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

GUO, G.L., HSU, T.C., CHEN, W.H., HWANG, W.S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, 2009, p.4907-4913.

HIGUCHI, T. Degradative Pathways on Lignin Model Compounds. In: HIGUTCHI T. **Biosynthesis and biodegradation of Wood Components**. Londres, Inglaterra: Academic Press Inc, 1985, p. 557-577.

HODGE, D.B., KARIM, M.N., SCHELL, D.J., McMILLAN, J.D. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 8940-8948.

HUANG, X.L., PENNER, M.H. Apparent substrate inhibition of the *Trichoderma reesei* cellulase system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, 1991, p. 2096-2100.

INOUE, H., HIDENO, A., TSUKAHARA, K., FUJIMOTO, S., MINOWA, T., INOUE, S., ENDO, T., SAWAYAMA, S. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of Rice straw. **Bioresource Technology**, v. 10, 2009, p. 2706-2711.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo, SP, v. 1.

KADAM, K. L.; RYDHOLM, E. C.; McMILLAN, J. D. Development and validation of a kinetic model for enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biotechnology**, v. 20, 2004, p. 698-705.

KIRK, T.K., FARREL, R.L. Enzymatic "Combustion": The microbial degradation of lignin. **Annual Review Microbial**, v. 41, 1987, p.465-505.

KUMAR, R., SINGH, S., SINGH, O.V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2008, p. 377-391

LADISH, M.R., KIM, Y., HENDRICKSON, R., MOISER, N.S., BALS, B., BALAN, V., DALE, B.E. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distiller's grains at high-solids loadings. **Bioresource Technology**, v. 99, 2008, p. 5206-5215.

LEE J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, 1997, p. 1-24.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, São Paulo: Sarvier, 1995.

LI, X., ZHENG, M., LI, L., YANG, X., HE, Y. Enhancing anaerobic biogasification of corn stover through wet state NaOH pretreatment. **Bioresource Technology**. v. 100, 2009, p. 5140-5145.

LYND, L.R., LASER, M., SCHULMAN, D., ALLEN, S.G., LICHWA, J., ANTAL, M.J.J. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for conversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, 2002, p. 31-44. (a)

LYND, L.R., WEIMER, P.J., van ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, 2002, p. 506-577. (b)

LYND, L.R., ZYL, W.H., MCBRIDE, J.E., LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Biochemical Engineering**, v. 16, 2005, p. 577-583.

MARTÍN, R.S., AGUILERA, J.M. Steam pretreated and enzymatic production of D-glucose from *Eucalyptus globulus*. **Biomass**, v. 15, 1988, p. 281-289.

MARTIN, C., KLINKE, H.B., THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2007, p. 426-432.

MCCABE, W.L., SMITH, J.C., HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**, 5^a ed. Nova York, EUA: McGraw-Hill, 1993, Cap. 28, p. 927-959.

MCQUEEN-MASON, S., DURACHKO, D.M., COSGROVE, D.J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. **Plant Cell**, v. 4, 1992, p. 1425-1433.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated sprucewood on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, 1996, p. 470-476.

PALONEN, H., TJERNELD, F., ZACCHI, G., TENKANEN, M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, 2004, p. 65-72.

PAN, X.J., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K., XIAO, Z.Z., ZHANG, X., SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping:

preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, 2005, p. 473-481.

PENNER, M.H., LIAW, E.T. Kinetic consequences of high ratios of substrate to enzyme saccharification systems based on *Trichoderma reesei* cellulase. In: HIMMEL, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. **Enzymatic of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, Washington, DC, 1994, p. 363-371.

PÉREZ, S., MAZEAU, K. **Conformation, Structures and Morphologies of Cellulose. Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility**. Cap. 2, 2005, p. 41-68.

PITARELO, A.P. **Avaliação da Susceptibilidade do Bagaço e da Palha de Cana-de-açúcar à Bioconversão via Pré-tratamento a Vapor e Hidrólise Enzimática**. Universidade Federal do Paraná (UFPR). 125 p., Dissertação de Mestrado, Curitiba, Brasil, 2007.

PITARELO, A.P., ZANDONÁ FILHO, A., SZCZERBOWSKI, D., RAMOS, L.P., NDIAYE, P.M. Efeito da catálise fosfórica sobre o pré-tratamento e hidrólise enzimática. In: Thulio Cícero Guimarães Pereira (Org.). Dossiê de Pesquisa: Fontes Renováveis de Energia. 1 ed. Curitiba, PR: Via Laser Gráfica e Editora, 2010, v. 1, p. 163-182.

PITARELO, A.P., SILVA, T.A., PERALTA-ZAMORA, P.G. RAMOS, L.P. Efeito do teor de umidade sobre o pré-tratamento a vapor e a hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, 2012 (no prelo).

POUTANEN, K., SUNDBERG, M. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role on the hydrolysis of acetyl xylans, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, 1988, p. 419-424.

RAMOS, L.P., BREUIL, C., SADDLER J.N. Comparison of steam pretreatment of eucalyptus, aspen, and spruce wood chips and their enzymatic hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34/35, 1992, p. 37-48.

RAMOS, L.P., BREUIL, C., SADDLER J.N. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation no cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, 1993, p. 19-25.

RAMOS, L.P. NAZHAD, M.M, SADDLER, J.N. Effect of enzymatic hydrolysis on the morphologu and fine structure of pretreated cellulosic residues. **Enzyme and Microbial Technology**, 1993, v. 15, p. 821-831.

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

RAMOS, L.P., EMMEL, A., MATHIAS, A.L., WYPYCH, F. Fraction of *Eucalyptus grandis* chips bby dilute acid-catalysed steam explosion. **Bioresource Technology**, v. 86, 2003, p. 105-115.

RAMOS, L.P., FONTANA, J.D. Enzymatic saccharification of cellulosic materials. In: Spencer, J. F. T., Spencer, A. L. R. **Methods in Biotechnology: Environmental Biology: Methods in Protocols**. Londres, Inglaterra: Humana Press, 2004, p. 221-235.

SADDLER, J.N., GREGG, D.J. Effects of sugar inhibition on cellulases and β -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113-116, 2004, p. 1115-1126.

SADDLER, J.N., CHANDREA, R.P., BURA, R., MABEE, W.E., BERLIN, A., PAN, X. Substrate Pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Biofuels**, v. 108, 2007, p. 67-93

SAMANIUK, J.R., SCOTT, C.T., ROOT, T.W., KLINGENBERG, D.J. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 4489-4494.

SCHIMIDT, A.S., THOMSEN, A.B. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 64, 1998, p. 139-151.

SHEN, J., AGBLEVOR, F.A. Optimization of enzyme loading and hydrolytic time in the hydrolysis of mixtures of cotton gin waste and recycled paper sludge for the maximum profit rate. **Biochemical Bioengineering Journal**, v. 41, 2008, p. 241-250.

SIERRA-ALVAREZ, R., MOREIRA, M.T., LEMA, J.M., FEIJOO, G., FIELD, J.A. Oxidation of lignin in eucalyptus Kraft pulp by manganese peroxidase from *Bjerkandera sp.* Strain BOS555. **Bioresource Technology**, v. 78, 2001, p. 71-79.

SILVA, L. **Estudo da hidrólise enzimática do resíduo de algodão da indústria têxtil**. Universidade Regional de Blumenau (FURB). 67 p., Trabalho de Conclusão de Curso, Blumenau, Brasil, 2009.

SINGH, S., MADLALA, A.M., PRIOR, B.A. *Thermomyces lanuginosus*: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, 2003, p. 3-16.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**, 2^a ed. San Diego, EUA: Academic Press Inc., 1992.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, 1985, p. 76-86.

SOUZA, A.S. **Análise da inserção internacional dos agentes econômicos da cadeia produtiva de etanol do Brasil: evolução recente e perspectivas futuras**. Centro Universitário da FEI. Trabalho de Iniciação Científica, São Bernardo do Campo, Brasil, 2008.

SUN, R., WANG, K., JIANG., J., XU, F. Influence of steaming explosion time on the physical-chemical properties of cellulose from *Lespedeza stalks* (*Lespedera cryptobotrya*). **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 5288-5294.

SUN, Y. **Enzymatic hydrolysis of rye straw Bermudgrass for ethanol production**. Universidade da Carolina do Norte. Tese de Phd., Biological and Agricultural engineering, Chapel Hill, EUA, 2002.

SUN, Y., CHENG, J. Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, 2002, p. 1-11.

SUNNA, A., ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, 1997, p. 39-67.

SUOMINEN, P.L., MANTYLA, A.L. KARHUNEN, T. NEVALEINEN K.M.H. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. **Molecular and General Genetics**, v. 241, 1993, p. 515-522.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, 1995, p. 367-375.

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

TEIXEIRA, L.C., LINDEN, J.C., SCHROEDER, H.A. Optimizing paraacetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**, v. 16, 1999, p. 1070-1073.

TJERNELD, F., ERIKSSON, T., BIRJESSON, J. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, 2002, p. 353-364.

TOMME, P., WARREN, R.A.J., GILKES, N.R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbiol Physiology**, v. 37, 1995, p. 1-81.

VÁZQUEZ, M., GÁMEZ, S., GONZÁLES-GABRIELES, J.J., RAMÍREZ, J.A. Study of the sugas cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, 2004, p. 143-152.

VAZQUEZ, M. GÁMES, S., GONZÁLES-GRABIALES, J.J., GARROTE, G., RAMÍREZ, J.A. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engeneering**, v. 74, 2006, p. 78-88.

TENGBORG, M.G., GALBE, M., ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, v. 17, 2001, p. 110-117.

WANG, P., JIA, H. Power-generation from biorenewable resources (Cap. 20). In: YANG, S. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**. Amsterdã, Holanda: Shang-Tian Yang, 2007, p. 507-526.

YANG, J., ZHANG, X., YONG, Q., YU, S. Three stage enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover at high substrate concentration. **Bioresource Technology**, v. 102, 2011, p. 4905-4908.

YU, Z., YU, J., ZHANG, J., HE, J. e LIU, Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rive hull. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 903-908.

ZACCHI, G., AXELSSON, A. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, 1989, p. 223-233.

ZACCHI, G., GALBE, M. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, 2007, p. 41-65.

ZACCHI, G., OHGREN, K., VEHMAANPERA, J., SIIKA-AHO, M., GALBE, M., VIIKARE, L. High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, 2007, p. 607-613.

ZHANG, X., QIN, W., PAICE, M.G., SADDLER, J.N. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, 2009, p. 5890-5897.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; TANG, L. Effect of PEG4000 on cellulase catalysis in the lignocelluloses saccharification processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, 2011, p. 115-120

APÊNDICE

Dados de conversão mássica (%) da polpa kraft deslignificada usados para a análise estatística

	Condição Experimental			Conversão em EqGlc (%)						
	Complexo enzimático	Substrato	Agitação	0,25h	3h	6h	24h	48 h	72 h	96 h
1	0,1	20	150	-	25,9	35,9	65,8	76,1	84,3	89,8
2	0,025	20	150	-	11,9	16,6	34,4	45,3	54,7	55,5
3	0,1	5	150	5,5	52,4	80,9	116,7	118,5	120,0	134,7
4	0,025	5	150	-	21,2	33,5	59,5	72,9	78,1	79,7
5	0,1	20	200	-	30,2	46,6	69,4	78,2	83,8	90,1
6	0,025	20	200	-	13,0	21,9	50,1	53,4	59,8	65,7
7	0,1	5	200	5,6	55,9	79,6	115,0	123,1	123,9	137,4
8	0,025	5	200	-	23,3	30,0	44,8	56,7	63,9	63,8
9A	0,0625	12,5	175	1,9	28,3	37,4	63,3	72,5	68,3	78,2
9B	0,0625	12,5	175	3,9	27,3	39,8	62,0	75,2	74,4	77,5
9C	0,0625	12,5	175	4,9	27,7	35,6	60,7	74,7	71,0	79,6
9D	0,0625	12,5	175	7,1	27,4	38,6	64,1	73,8	76,4	76,8
9E	0,0625	12,5	175	4,5	29,3	40,3	65,3	70,5	76,6	85,1
10	0,0625	12,5	200	9,2	32,3	39,9	70,9	90,1	87,0	88,2
11	0,0625	12,5	150	7,7	30,1	46,1	72,5	90,4	92,5	93,2
12	0,0625	20	175	-	21,2	31,5	59,7	71,1	75,8	78,5
13	0,0625	5	175	4,6	43,5	60,5	98,5	109,9	111,8	112,2
14	0,1	12,5	175	7,1	46,8	65,4	98,7	107,2	113,1	120,3
15	0,025	12,5	175	3,6	17,1	22,2	50,3	57,0	67,9	68,5

Dados de conversão (g.L⁻¹) da polpa kraft deslignificada usados para a análise estatística

	Condição Experimental			Conversão em EqGlc (g.L ⁻¹)						
	Complexo enzimático	Substrato	Agitação	0,25h	3h	6h	24h	48h	72h	96h
1	0,1	20	150	-	38,5	53,4	97,8	113,0	125,1	133,4
2	0,025	20	150	-	17,6	24,7	51,1	67,2	81,2	82,4
3	0,1	5	150	2,1	19,4	30,0	43,3	44,0	44,1	50,0
4	0,025	5	150	-	7,9	12,4	22,1	27,1	29,0	29,6
5	0,1	20	200	-	44,8	69,2	103,0	116,1	124,5	133,8
6	0,025	20	200	-	19,3	32,5	74,3	79,3	88,8	97,6
7	0,1	5	200	2,1	20,8	29,6	42,7	45,7	46,0	51,0
8	0,025	5	200	-	8,7	11,2	16,6	21,1	23,7	23,7
9A	0,0625	12,5	175	1,8	26,3	34,7	58,8	67,3	63,4	72,5
9B	0,0625	12,5	175	3,6	23,4	36,9	57,6	69,8	69,1	72,0
9C	0,0625	12,5	175	4,5	25,8	33,1	56,3	69,4	65,9	73,9
9D	0,0625	12,5	175	6,6	25,4	35,8	59,5	68,5	70,9	71,3
9E	0,0625	12,5	175	4,2	27,2	37,4	60,6	65,5	71,1	79,0
10	0,0625	12,5	200	8,5	30,0	37,1	65,8	83,6	80,7	81,9
11	0,0625	12,5	150	7,1	28,0	42,8	67,3	83,9	85,9	86,5
12	0,0625	20	175	-	21,2	46,7	88,6	105,6	112,6	116,6
13	0,0625	5	175	1,7	16,1	22,5	36,6	40,8	41,5	41,7
14	0,1	12,5	175	6,6	43,4	60,7	91,6	99,5	105,0	111,7
15	0,025	12,5	175	3,3	15,9	20,6	45,7	52,9	63,0	63,6

Dados de conversão mássica (%) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor usados para a análise estatística

	Condição Experimental			Conversão em EqGlc (%)						
	Complexo enzimático	Substrato	Agitação	0,25h	3h	6h	24h	48 h	72 h	96 h
1	0,1	20	150	-	12,7	18,3	26,0	31,5	32,4	39,7
2	0,025	20	150	-	3,2	5,2	8,0	14,8	14,6	16,2
3	0,1	5	150	2,8	16,7	24,2	47,3	63,4	67,2	69,4
4	0,025	5	150	-	3,9	6,4	13,5	20,1	22,4	24,3
5	0,1	20	200	-	9,5	14,2	51,6	62,8	69,2	76,4
6	0,025	20	200	-	6,0	6,7	13,4	18,9	23,8	29,3
7	0,1	5	200	4,4	21,7	26,4	66,8	90,1	92,5	90,5
8	0,025	5	200	0,7	6,4	12,1	25,6	35,2	33,2	32,7
9A	0,0625	12,5	175	1,9	8,9	12,7	33,4	42,4	47,3	47,8
9B	0,0625	12,5	175	1,9	14,1	14,6	34,5	41,6	45,7	46,4
9C	0,0625	12,5	175	2,4	8,0	12,5	34,2	31,0	47,5	48,5
9D	0,0625	12,5	175	3,2	8,9	14,1	34,1	41,4	44,5	48,6
9E	0,0625	12,5	175	-	9,4	15,0	34,3	41,3	46,1	47,9
10	0,0625	12,5	200	3,0	11,2	16,6	38,5	54,0	62,8	67,7
11	0,0625	12,5	150	2,5	12,2	21,2	39,2	51,6	61,7	59,1
12	0,0625	20	175	-	0,3	13,4	26,7	36,7	48,7	53,2
13	0,0625	5	175	2,7	17,0	21,3	45,4	65,5	60,9	64,7
14	0,1	12,5	175	3,2	23,5	30,3	49,6	63,0	62,0	70,2
15	0,025	12,5	175	0,8	6,6	10,9	25,6	33,4	36,6	39,5

Dados de conversão (g.L^{-1}) do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor usados para a análise estatística

	Condição Experimental			Conversão em Eq. Glc (g.L^{-1})						
	Complexo enzimático	Substrato	Agitação	0,25h	3h	6h	24h	48h	72h	96h
1	0,1	20	150	-	14,1	20,3	28,8	34,9	36,0	44,4
2	0,025	20	150	-	3,4	4,6	8,9	16,4	16,2	18,0
3	0,1	5	150	0,8	4,6	6,7	13,1	17,6	18,6	19,2
4	0,025	5	150	-	1,1	1,8	3,8	5,6	6,2	6,8
5	0,1	20	200	-	10,6	15,7	57,2	69,7	76,8	84,7
6	0,025	20	200	-	6,7	7,5	14,9	21,0	26,5	32,6
7	0,1	5	200	1,2	6,0	7,3	18,6	25,0	25,7	25,1
8	0,025	5	200	0,2	1,8	3,4	7,1	9,8	9,2	9,1
9A	0,0625	12,5	175	1,3	6,2	8,8	23,2	29,4	32,8	33,1
9B	0,0625	12,5	175	1,3	-	10,1	24,0	28,9	31,7	32,2
9C	0,0625	12,5	175	1,6	5,6	8,7	23,7	26,8	33,0	33,7
9D	0,0625	12,5	175	2,3	6,2	9,8	23,7	28,7	30,9	33,7
9E	0,0625	12,5	175	-	6,5	10,4	23,8	28,7	32,0	33,2
10	0,0625	12,5	200	2,1	7,8	11,5	26,7	37,5	43,6	46,9
11	0,0625	12,5	150	1,7	8,5	14,7	27,2	35,8	42,8	41,0
12	0,0625	20	175	-	6,5	14,9	29,7	40,7	54,0	59,0
13	0,0625	5	175	0,7	4,7	5,9	12,6	18,2	16,9	18,0
14	0,1	12,5	175	2,2	16,3	21,0	34,4	43,7	43,0	48,7
15	0,025	12,5	175	0,6	4,6	7,6	17,7	23,2	25,4	27,4