



Programa de Pós-Graduação em Engenharia
de Recursos Naturais da Amazônia

OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DA CASCA DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.): ESTUDO DO PRÉ- TRATAMENTO ALCALINO E AVALIAÇÃO CINÉTICA

LEILIANE DO SOCORRO SODRÉ DE SOUZA

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Recursos Naturais da Amazônia, PRODERNA/ITEC, da Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutora em Engenharia de Recursos Naturais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. João Nazareno Nonato Quaresma

BELÉM

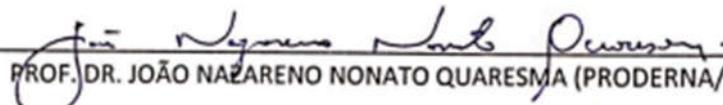
Janeiro de 2020

**“OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DA CASCA
DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.): ESTUDO DO PRÉ-
TRATAMENTO ALCALINO E AVALIAÇÃO CINÉTICA”**

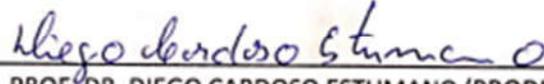
LEILIANE DO SOCORRO SODRÉ DE SOUZA

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA - PRODERNA/ITEC/UFPA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM ENGENHARIA DE RECURSOS NATURAIS.

Aprovada por:



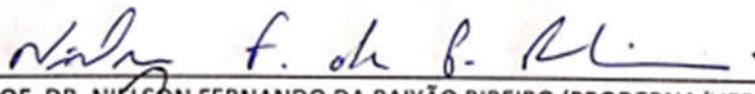
PROF. DR. JOÃO NAZARENO NONATO QUARESMA (PRODERNA/UFPA – ORIENTADOR)



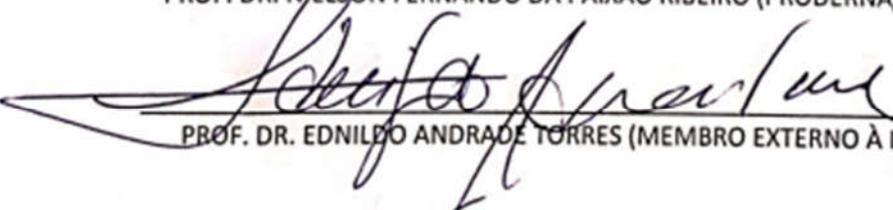
PROF. DR. DIEGO CARDOSO ESTUMANO (PRODERNA/UFPA – EXAMINADOR)



PROF. DR. EMANUEL NEGRÃO MACÊDO (PRODERNA/UFPA – EXAMINADOR)



PROF. DR. NIELSON FERNANDO DA PAIXÃO RIBEIRO (PRODERNA/UFPA – EXAMINADOR)



PROF. DR. EDNILDO ANDRADE TORRES (MEMBRO EXTERNO À INSTITUIÇÃO – UFPA)

Belém, PA - Brasil
Janeiro de 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Biblioteca do ITEC/UFPA-Belém-PA

S729 Souza, Leiliane do Socorro Sodré de, 1988-
Obtenção de açúcares fermentescíveis a partir
da casca de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.):
estudo do pré-tratamento alcalino e avaliação
cinética/ Leiliane do Socorro Sodré de Souza. -
2020.

Orientador: João Nazareno Nonato Quaresma

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do
Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Recursos Naturais
da Amazônia, Belém, 2020.

1.Tecnologia de alimentos. 2. Óleo de
andiroba. 3.Biomassa. 4.Hidrólise. I.Título.

CDD 23. ed. – 6 6 4 . 8 0 4 6

Elaborado por Kelren Cecília dos Santos Lima da Mota – CRB-2/1461

Dedico este trabalho aos meus pais, Cilene e Nonato Souza,
e ao meu marido Anderson Pereira.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais no meu caminho nos momentos mais difíceis que passei, para que eu pudesse prosseguir.

Ao meu orientador, Prof. João Nazareno Nonato Quaresma, pela atenção, confiança, incentivo e excelente orientação. A realização desse trabalho não seria possível sem sua ajuda, serei sempre grata!

Ao meu marido, Anderson Pereira, pelas sugestões, críticas construtivas, e pelo apoio e carinho de sempre.

Aos meus pais, Cilene e Nonato Souza, por todo esforço e dedicação, tudo que já alcancei na vida foi graças ao apoio de vocês.

Aos meus irmãos, Renata e Junior, pelo carinho e palavras de incentivo.

Aos colegas, Bruno Pereira, Victor Lamarão, Midian Monteiro, Virginia Giacon, Ari Hidalgo, Marco Farias, João Fernando Costa, Lúcia Alves e Rafael Oliveira, por toda a colaboração.

Ao Prof. Sérgio Duvoisin Jr., da Universidade do Estado do Amazonas, por todas as análises químicas.

Ao Laboratório de Microscopia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Ao Laboratório de Materiais da Amazônia e Compósitos (LAMAC/UFAM), pelas análises térmicas.

À Novozymes pela doação das enzimas.

À Capes pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese apresentada ao PRODERNA/UFPA como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutora em Engenharia de Recursos Naturais. (Dra. Eng.)

OBTENÇÃO DE AÇÚCARES FERMENTESCÍVEIS A PARTIR DA CASCA DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.): ESTUDO DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO E AVALIAÇÃO CINÉTICA

Leiliane do Socorro Sodré de Souza

Janeiro/2020

Orientador: Prof. Dr. João Nazareno Nonato Quaresma

Área de Concentração: Uso e Transformação de Recursos Naturais.

Neste trabalho, as cascas das sementes de andiroba foram submetidas a pré-tratamento alcalino, visando maximizar a recuperação dos açúcares redutores, avaliando o melhor desempenho de operação através das variáveis, tempo de reação (20, 60 e 100 min), concentração de NaOH (2, 3 e 4% (m/v)) e temperatura (60, 90 e 120°C), em concentração de sólidos fixa, de 5% (m/v). Foi utilizado o planejamento experimental de Box-Behnken (15 ensaios). A biomassa pré-tratada nos 15 experimentos, foi hidrolisada enzimaticamente, em condições idênticas, carga de sólidos (5%), carga enzimática (15 FPU/g de biomassa) e tempo de reação (48 horas). O material lignocelulósico foi caracterizado através das análises de celulose (36,96 %), hemicelulose (16,74 %), lignina (36,02 %), extrativos (7,49 %), umidade (9,21 %), e cinzas (1,53 %). A otimização foi realizada por meio da abordagem metodologia de superfície de resposta. O modelo forneceu um coeficiente de determinação (R^2) de 0,96, para sacarificação e 0,97, para sólidos recuperados. As condições ótimas previstas para realizar o processo foram, tempo de reação = 100 min, concentração de NaOH = 4% (m/v), temperatura = 120°C, que permitiram obter uma conversão em termos de açúcares redutores de 47,89 %. O material lignocelulósico pré-tratado nas melhores condições, foi avaliado morfológicamente, através das análises de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), onde foi possível observar a maior disponibilidade da fração celulósica. Através do pré-tratamento alcalino foi possível reduzir em 34,7 % a fração de lignina, e em 23,52 % a fração de hemicelulose. A biomassa tratada nas melhores condições determinadas através da análise estatística foi hidrolisada e a cinética de sacarificação foi acompanhada. O processo foi acompanhado por um período de 96 horas, e foi possível observar que o rendimento de 54,44 % foi alcançado para um tempo de 72 horas, após esse período não houve mais aumento significativo. Os resíduos gerados na etapa de tratamento alcalino (licor negro) e hidrólise enzimática (biomassa residual), foram caracterizados através de FTIR e análise termogravimétrica, respectivamente, o que permitiu observar a presença predominante de lignina no licor negro, e de celulose na biomassa residual. Estes resultados podem ser considerados satisfatórios no contexto da biomassa florestal e pode ser elevado em uma escala futura do laboratório para a escala piloto, com estudos sobre a etapa de hidrólise enzimática.

Palavras-chave: sacarificação, biomassa, hidrólise, glicose

Abstract of Thesis presented to PRODERNA/UFPA as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Natural Resources Engineering (D.Eng.)

OBTAINING FERMENTABLE SUGARS FROM ANDIROBA PEEL (*Carapa guianensis* Aubl.): STUDY OF ALKALINE PRETREATMENT AND KINETIC EVALUATION

Leiliane do Socorro Sodr  de Souza
Janeiro/2020

Advisor: Prof. Dr. João Nazareno Nonato Quaresma

Research Area: Use and Transformation of Natural Resources.

In this study, andiroba seed peels were subjected to alkaline pretreatment, to maximize the recovery of reducing sugars, evaluating the best operating performance through the variables, reaction time (20, 60 and 100 min), NaOH concentration (2, 3 and 4 % (m / v)) and temperature (60, 90 and 120  C), at a fixed solids concentration of 5% (m/v). Box-Behnken experimental design (15 runs) was used. The pretreated biomass in the 15 experiments was enzymatically hydrolyzed, under identical conditions, solids loading (5%), enzymatic loading (15 FPU / g of biomass) and reaction time (48 hours). Lignocellulosic material was characterized by cellulose analysis (36.96 %), hemicellulose (16.74 %), lignin (36.02 %), extractives (7.49 %), moisture (9.21%), and ashes (1.53 %). The optimization was performed using the response surface methodology approach. The model provided a coefficient of determination (R^2) of 0.96 for saccharification and 0.97 for recovered solids. The predicted optimal conditions for the process were: reaction time = 100 min, NaOH concentration = 4% (m / v), temperature = 120 C, which resulted in a conversion in terms of reducing sugars of 47.89%. Pretreated lignocellulosic material under the best conditions was morphologically evaluated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyzes. Through alkaline pretreatment it was possible to reduce the lignin fraction by 34.7% and the hemicellulose fraction by 23.52%.

The biomass treated under the best conditions determined by statistical analysis was hydrolyzed and the saccharification kinetics was followed. The process was followed for a period of 96 hours, and it was observed that the 54.44% yield was achieved for a time of 72 hours, after which there was no further significant increase. The residues generated in the alkaline treatment step (black liquor) and enzymatic hydrolysis (residual biomass) were characterized by FTIR and thermogravimetric analysis. Respectively, which allowed us to observe the predominant presence of lignin in black liquor and cellulose in residual biomass. These results can be considered satisfactory in the context of forest biomass and can be raised at a future laboratory scale to the pilot scale, with studies on the enzymatic hydrolysis step.

Keywords: saccharification, biomass, hydrolysis, glucose

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE NOMENCLATURAS.....	IX
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO TRABALHO.....	4
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	5
2.2 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	7
2.2.1 Celulose.....	8
2.2.2 Hemicelulose.....	9
2.2.3 Lignina.....	10
2.3 PRÉ-TRATAMENTO.....	11
2.3.1 Pré-tratamento químico.....	13
2.3.1.1 Pré-tratamento ácido.....	13
2.3.1.2 Pré-tratamento alcalino	14
2.3.2 Pré-tratamento físico	16
2.3.3 Tratamento físico-químico	17
2.3.4 Tratamento biológico.....	18
2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	19
2.4.1 Cinética da hidrólise enzimática da celulose.....	20
2.5 CELULASES.....	21
2.6 ANDIROBA	22
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	26
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	27
3.2.1 Teor de umidade	27
3.2.2 Determinação dos extrativos	27
3.2.3 Determinação do teor de cinzas totais.....	28

3.2.4 Determinação de celulose, hemicelulose e lignina	28
3.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier (FTIR)	30
3.2.6 Análise elementar	31
3.2.7 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
3.2.8 Análise termogravimétrica e termogravimetria diferencial (TG/DTG)	31
3.3 OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO	32
3.3.1 Condições do pré-tratamento alcalino	32
3.3.2 Planejamento experimental estatístico	33
3.4 ATIVIDADE DA ENZIMA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	37
3.4.1 Determinação da atividade enzimática da celulase.....	37
3.4.2 Método do ácido dinitrosalicílico (DNS).....	38
3.4.3 Cálculo do volume de coquetel enzimático	38
3.4.4 Hidrólise enzimática	39
3.5 CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	40
3.5.1 Análise dos dados da cinética	41
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO.....	42
4.2 ANÁLISE ELEMENTAR.....	43
4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE	44
4.4 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL	45
4.4.1 Anova e coeficientes de regressão (sacarificação).....	47
4.4.2 Anova e coeficientes de regressão (sólidos recuperados).....	52
4.4.3 Análise das superfícies de resposta e contornos	56
4.4.4 Desejabilidade global	60
4.5 COMPOSIÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO TRATADO.....	62
4.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	62
4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	64
4.8 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SACARIFICAÇÃO	66
4.9 ANÁLISE DO RESÍDUO LÍQUIDO (LICOR NEGRO) PROVENIENTE DO PRÉ- TRATAMENTO ALCALINO.....	69
4.10 ANÁLISE TÉRMICA DO RESÍDUO SÓLIDO PROVENIENTE DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA.....	70
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÃO	72
CAPÍTULO 6 – SUGEST PARA TRABALHOS FUTUROS.....	73
REFERÊNCIAS	74

ANEXOS.....	88
PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BIORESOURCES.....	89
PRIMEIRA PÁGINA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Compostos químicos obtidos a partir da celulose.	6
Figura 2.2: Substâncias obtidas a partir das hemiceluloses.	6
Figura 2.3: Prontos da degradação de lignocelulose como resultado do pré-tratamento sob condições ácidas.....	8
Figura 2.4: Estrutura da celulose.	9
Figura 2.5: Representação esquemática da hemicelulose.	10
Figura 2.6: Os três precursores primários na formação da lignina.	11
Figura 2.7: Desenho esquemático do pré-tratamento.	12
Figura 2.8: (A) Árvore de andiroba de pequeno porte, (B) Ramo de folhas da árvore de andiroba, (C) Fruto.	23
Figura 2.9: Sementes da espécie <i>Carapa guianensis</i>	23
Figura 3.1: Casca de andiroba (esquerda) e seca e triturada (direita).....	26
Figura 3.2: Etapas do pré-tratamento alcalino.....	33
Figura 3.3: Gráfico prismático.	34
Figura 3.4: Processo de obtenção dos açúcares fermentescíveis.....	39
Figura 4.1: Determinação da atividade enzimática para a enzima Cellucast 1.5 L.....	44
Figura 4.2: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados.	48
Figura 4.3: (a) Gráfico normal dos resíduos e (b) Valores previstos <i>versus</i> resíduo.....	50
Figura 4.4: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados.	53
Figura 4.5: (a) Gráfico normal dos resíduos e (b) Valores previstos <i>versus</i> resíduo... ..	55
Figura 4.6: Superfície de resposta (sacarificação)	57
Figura 4.7: Superfície de resposta (sólidos recuperados).	59
Figura 4.8: Perfil de valores previstos e desejabilidade.....	61
Figura 4.9: Espectro de FTIR do material lignocelulósico não-tratado.	63
Figura 4.10: Imagens de MEV da casca de andiroba não tratada e pré-tratada antes da hidrólise enzimática	65
Figura 4.11: Ajuste dos modelos 1, 2 e 3 aos dados cinéticos obtidos na hidrólise enzimática da casca de andiroba.....	67
Figura 4.12: Espectro de FTIR do licor negro proveniente do pré-tratamento alcalino.....	69
Figura 4.13: Termograma do resíduo sólido da hidrólise enzimática.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Efeitos de vários métodos de pré-tratamento nas três frações de material lignocelulósico	16
Tabela 3.1: Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC.	34
Tabela 3.2: Variáveis independentes e seus valores codificados.	35
Tabela 3.3: Delineamento Fatorial de Box-Behnken.....	35
Tabela 3.4: Modelos empíricos para a cinética da hidrólise da celulose.....	41
Tabela 4.1: Composição do material lignocelulósico <i>in natura</i>	42
Tabela 4.2: Análise elementar	43
Tabela 4.3: Variáveis estudadas na matriz experimental de Box-Behnken e resultados para a variável resposta.....	45
Tabela 4.4: Análise de variância (sacarificação).....	47
Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos (sacarificação).....	49
Tabela 4.6: Análise de variância (sacarificação – recalculado).....	49
Tabela 4.7: Estimativa dos coeficientes (sacarificação – recalculado).....	51
Tabela 4.8: Análise de variância (sólidos recuperados).....	52
Tabela 4.9: Estimativa dos efeitos (sólidos recuperados).....	53
Tabela 4.10: Análise de variância (sólidos recuperados – recalculado).....	54
Tabela 4.11: Estimativa dos coeficientes (sólidos recuperados).....	55
Tabela 4.12: Composição do material lignocelulósico tratado	62
Tabela 4.13: Dados experimentais obtidos na cinética de sacarificação	66
Tabela 4.14: Análise de variância do ajuste dos modelos	67
Tabela 4.15: Parâmetros determinados e coeficientes de correlação dos modelos avaliados	68

LISTA DE NOMENCLATURAS

IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
ART	Açúcares redutores totais
AOAC	Associação de Métodos e Análises Oficiais
FPU	Unidade de Papel de Filtro
AR	Açúcares redutores
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
TG	Termogravimetria
DTG	Termogravimetria Derivada
ANOVA	Análise de variância
mM	Milimolar
nm	Nanômetros

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A redução de recursos fósseis e o aumento da poluição ambiental relacionados à exploração do petróleo e do carvão torna necessário considerar uma transição gradual para uma economia de base biológica (FITZPATRICK *et al.*, 2010).

Hoje, quase todo o mundo depende de combustíveis fósseis para fontes de energia. Com o aumento da população, haverá uma preocupação de que esses combustíveis fósseis sejam consumidos em breve. Portanto, há a necessidade de procurar fontes alternativas de energia na biosfera. A biomassa é composta por 75 % de carboidratos, e é a única fonte renovável amplamente disponível, com potencial para substituir os atuais recursos fósseis não renováveis. Hoje em dia, a abordagem mais atraente e promissora é converter carboidratos derivados de biomassa em aldeídos furânicos, como o HMF (hidroximetilfurfural), por ser um candidato promissor como composto de plataforma para produtos químicos finos, plastificantes e polímeros (THOMBAL e JADHAV, 2015).

A biomassa lignocelulósica da agricultura e silvicultura, que inclui resíduos agroindustriais, resíduos industriais florestais, cultivos energéticos, resíduos sólidos urbanos e outros materiais, é o recurso mais abundante a considerar como matéria-prima para biorrefinarias (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

Em países como o Brasil, com o foco econômico principal na produção agrícola, a geração de resíduos é inevitável (CARVALHO e FERREIRA, 2014).

As matérias-primas celulósicas oferecem várias vantagens sobre as matérias-primas à base de amido e açúcar. São produtos residuais ou cultivos energéticos cultivados propositadamente, colhidos em terras marginais, não adequadas para outras culturas. Menos energia de combustível fóssil é necessária para crescer, coletar e convertê-los, e eles não são usados para alimentação humana (EERE, 2019).

Geralmente, a biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose (38-50%), hemiceluloses (23-32%) e lignina (15–25%), bem como pequenas quantidades de extrativos (MCKENDRY, 2002). Estes componentes são fortemente entrecruzados e ligados, formando a matriz lignocelulósica. Enquanto os objetivos do pré-tratamento são tornar acessível a celulose para a sacarificação enzimática e fracionamento dos principais componentes da matéria-prima, o pré-tratamento freqüentemente envolve reações colaterais resultando em subprodutos derivados da lignocelulose que são inibitórios aos processos bioquímicos a jusante. Os problemas de inibição tornam-se mais significativos à medida que os subprodutos se acumulam como resultado da recirculação da água do processo, ou à medida que sua concentração

aumenta quando altas cargas de sólidos são usadas para alcançar fluxos concentrados de açúcar e altos títulos de produto (JÖNSSON e MARTÍN, 2016). Até o momento, vários processos de pré-tratamento foram desenvolvidos, que podem ser categorizados em físicos, químicos, processos físico-químicos, biológicos e também por algumas combinações destes processos. Como cada processo de pré-tratamento tem vantagens e desvantagens, algumas combinações de processos de pré-tratamento podem não apenas aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose, mas também facilitar a recuperação das ligninas e hemiceluloses associadas para a produção de produtos de alto valor (SUN *et al.*, 2016). A área superficial específica acessível é um fator crucial que afeta a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. O tamanho de partícula e o volume de poros (ou porosidade) mostram grande influência na área de superfície específica acessível de materiais lignocelulósicos. Uma taxa de hidrólise enzimática relativamente alta e o rendimento de glicose podem ser alcançados com a redução do tamanho das partículas de lignocelulose (YEH *et al.*, 2010).

O pré-tratamento alcalino é o método mais comumente usado para remover lignina e hemiceluloses de materiais lignocelulósicos. Durante o pré-tratamento com álcali, as ligações éster nas hemiceluloses e na lignina são facilmente decompostas em condições alcalinas. As ligações éter nas hemiceluloses e na lignina também podem ser destruídas a uma temperatura relativamente alta. As clivagens dessas ligações promovem significativamente a solubilização das hemiceluloses e lignina, resultando na exposição de celulose a enzimas. Vários reagentes alcalinos, tais como NaOH, Ca(OH)₂, KOH, Na₂CO₃ e amônia aquosa, têm sido usados para o pré-tratamento de muitos materiais lignocelulósicos. Entre esses reagentes alcalinos, NaOH e Ca(OH)₂ são os mais comumente usados (SUN *et al.*, 2016). Um processo de pré-tratamento de biomassa eficiente envolve muitas vezes a combinação de vários fatores, por esse motivo, as técnicas de modelagem e otimização podem ser empregadas para melhorar a eficiência do processo. Além disso, o método de alterar uma variável de cada vez enquanto mantém a outra constante nem sempre representa o efeito abrangente de todas as variáveis e suas interações (BETIKU e TAIWO, 2015). No cenário atual, tendências estão sendo direcionadas para a biotecnologia de lignocelulose e engenharia genética para processos e produtos melhorados. Para superar os problemas energéticos atuais, é esperado que a biomassa lignocelulósica, além da biotecnologia verde, seja o foco principal da pesquisa futura (ANWAR *et al.*, 2014).

Carapa guianensis é uma árvore pertencente à família Meliaceae e é popularmente conhecida como andiroba. Sua ocorrência é preferencialmente em florestas úmidas e essas espécies geralmente produzem 180-200 kg de sementes por planta/ano, contendo aproximadamente 60% em peso de óleo (EMBRAPA, 2004). O processamento dessas sementes gera produtos e coprodutos, importantes. Entre os coprodutos, a casca da andiroba precisa de maior atenção, pois possui potencial para se tornar um produto alternativo, como para produção de ácidos orgânicos a partir da quebra da lignina, hemicelulose e celulose, que a compõe. A andiroba já apresenta potencial para o desenvolvimento sócio-econômico-ambiental, pois o óleo obtido por extração das sementes tem sua aplicação estabelecida na indústria farmacêutica e de cosméticos, logo, associar aplicações aos resíduos destes processos fecha o ciclo de sustentabilidade e desenvolvimento econômico para esta matéria-prima.

Dentro deste contexto, encontrar formas de obter fontes alternativas aos derivados de petróleo a partir de biomassa, sem que essas culturas estejam associadas a cultivos agressivos ao meio ambiente como a cana-de-açúcar é a base para o crescimento industrial na região amazônica, sem que o desmatamento e a poluição sejam o preço para o desenvolvimento.

Diante da importância do desenvolvimento sustentável na região Amazônica, é necessário avaliar o uso dos resíduos dos mais diversos tipos de processos de produção realizados nesta região, assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de açúcares fermentescíveis estudando o pré-tratamento alcalino da casca da andiroba através do processo de hidrólise enzimática seguindo planejamento experimental do tipo Box-Behnken, e estudar a cinética de sacarificação, e a composição dos resíduos gerados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estudar o pré-tratamento alcalino da casca da semente de andiroba, visando a maximização da produção de açúcares redutores.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar química e morfológicamente a biomassa avaliada antes e após a etapa de pré-tratamento.

- Estudar o tratamento alcalino da casca da andiroba através do planejamento experimental de Box-Behnken, com o objetivo de selecionar condições operacionais que resultem em maior rendimento de açúcares redutores.
- Realizar experimentos de hidrólise enzimática das amostras *in natura* e pré-tratadas empregando condições semelhantes (tempo, concentração de sólidos, e carga enzimática), para comparação eficiente dos resultados obtidos.
- Investigar a liberação de açúcares fermentescíveis utilizando metodologia de superfície de resposta.
- Avaliar a cinética do processo de sacarificação do material lignocelulósico tratado.
- Avaliar a composição dos resíduos gerados no pré-tratamento alcalino, e na hidrólise enzimática.

1.2 ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DO TRABALHO

Esse trabalho é composto pelos seguintes capítulos:

O **Capítulo 1** versará sobre a introdução, onde mostrará os objetivos e organização estrutural do trabalho.

No **Capítulo 2** será apresentada a revisão bibliográfica. Este capítulo abordará as definições de biomassa e bioenergia, assim como as características dos materiais lignocelulósicos. Tópicos sobre os pré-tratamentos mais utilizados em biomassa lignocelulósica são apresentados, com destaque para o pré-tratamento alcalino. Os microrganismos utilizados no processo de hidrólise enzimática serão abordados, com o objetivo de destacar as melhores condições para a sua atuação. Características importantes sobre a andiroba (*Carapa guianensis*), como espécie, ocorrência e aplicações também serão apresentadas na Revisão Bibliográfica.

Os Materiais e Métodos serão abordados no **Capítulo 3**, onde será descrito o processo de pré-tratamento alcalino, que seguiu um planejamento de experimentos e as análises físico-químicas realizadas, no material lignocelulósico *in natura*, pré-tratado e hidrolisado. Neste capítulo também é descrito o processo de hidrólise enzimática.

O **Capítulo 4** abordará os resultados e as discussões sobre os experimentos de pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática e a caracterização da fração sólida e líquida obtidas.

O **Capítulo 5** apresentará as conclusões referentes ao trabalho e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

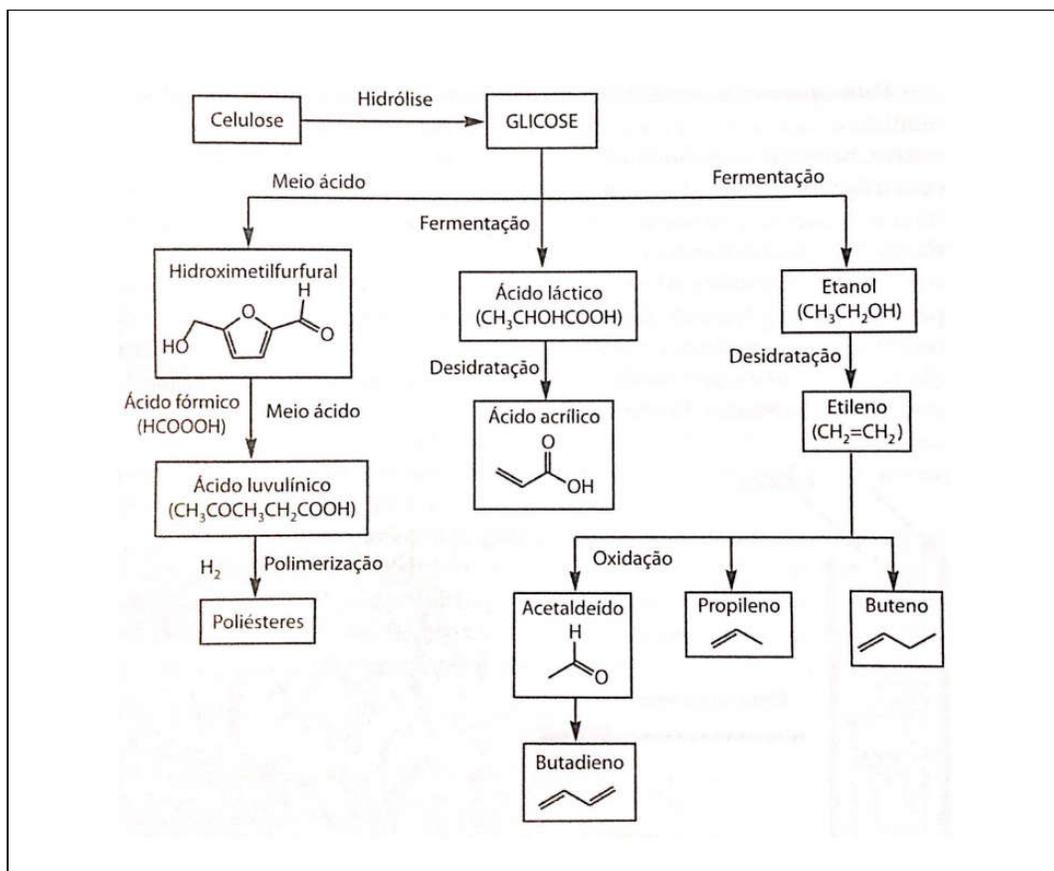
Processos térmicos, químicos e biotecnológicos já estão disponíveis para a transformação de certas biomassas em moléculas úteis, da mesma forma que a química orgânica fez com o petróleo, no século passado. Apesar de ainda serem em número reduzido, é possível antecipar que neste século observaremos o crescimento das indústrias químicas baseadas em biomassa, paralelamente ao declínio da indústria petroquímica, o que ocorrerá com significativas vantagens ambientais. Diante desse cenário, o Brasil deveria desenvolver suas próprias tecnologias capazes de transformar as suas biomassas renováveis e abundantes em intermediários de química fina ou insumos básicos para a indústria química (FERREIRA *et al.*, 2014; SCHUCHARDT *et al.*, 2001).

Na reação de hidrólise, por exemplo, com o uso de enzimas (celulase), a celulose pode ser hidrolisada à D-glicose e esta pode ser utilizada na produção de etanol, bem como na produção de substâncias químicas (insumos) como: etileno, buteno (dimerização de etileno), propileno (metátese de buteno com etileno), butadieno e ácido acrílico. Com a utilização de outros processos de fermentação pode-se obter ainda butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico. A hidrólise da glicose com ácidos diluídos leva ainda ao hidroximetilfurfural (HMF), que pode ser quebrado em ácido levulínico (um interessante insumo para obter poliésteres) e ácido fórmico (WASTOWSKI, 2018).

A desidratação da frutose em HMF é muito fácil e eficiente, no entanto, a frutose não é abundante na natureza e muito cara, portanto, o HMF não pode ser fabricado a partir de frutose em larga escala. No entanto, a glicose é a matéria-prima mais abundante para a produção de HMF (Figura 2.1) (HU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2011; TONG *et al.*, 2010).

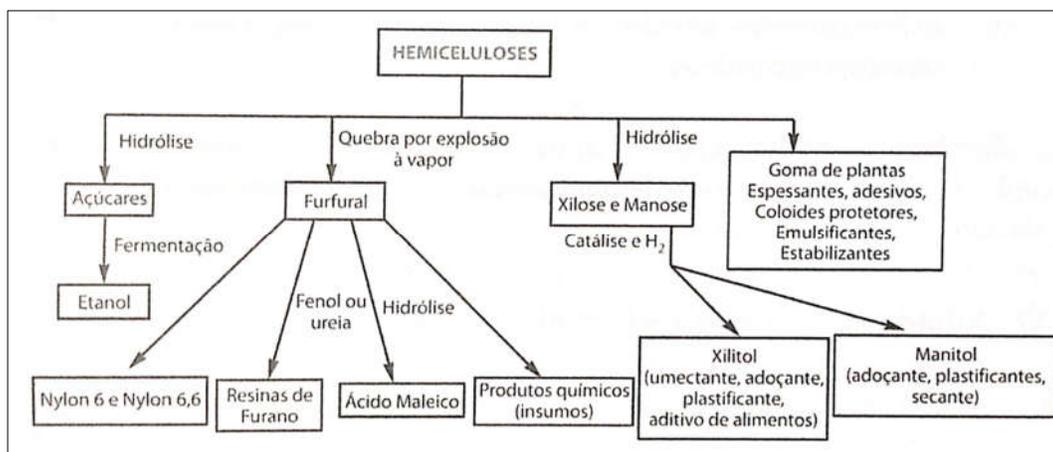
Furfural é tipicamente derivado da xilose (Figura 2.2), presente principalmente como xilano na hemicelulose (LANGE *et al.*, 2011). Os processos tradicionais para a produção de furfural foram baseados em catalisadores ácidos como HCOOH, CH₃COOH, HCl, H₂SO₄, HNO₃ e H₃PO₄ em solução aquosa (YONG *et al.*, 2008).

Figura 2.1: Compostos químicos obtido a partir da celulose



Fonte: WASTOWSKI (2018) e SCHUCHARDT *et al* (2001).

Figura 2.2: Substâncias obtidas a partir das hemiceluloses.



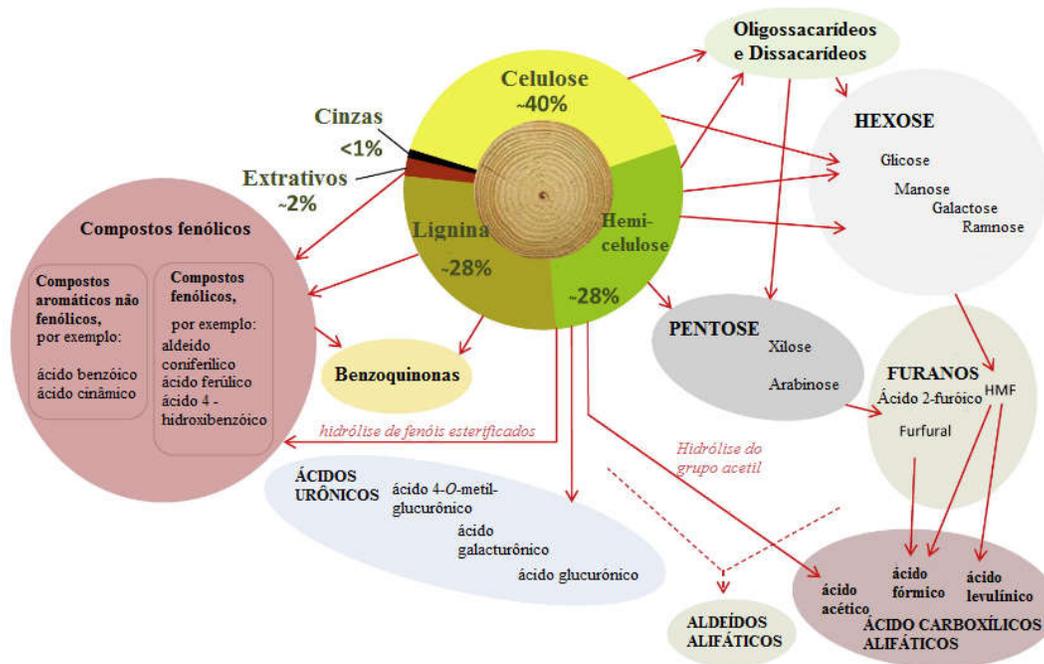
Fonte: WASTOWSKI (2018); SCHUCHARDT *et al* (2001); KAMM *et al*. (2006).

2.2 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

RESENDE *et al.* (2016) ressalta que os materiais lignocelulósicos possuem histórico desde a Antiguidade, sendo utilizados como fonte de energia térmica luminosa, pela queima de galhos e folhas. No século XVII, durante a Revolução industrial, o carvão passou a ser a principal fonte de energia de origem mineral. A partir do século XX, o petróleo assumiu a função principal como matéria-prima para obtenção de energia e combustíveis. No entanto, problemas ambientais (também econômicos e políticos) decorrentes do uso do carvão mineral e do petróleo chamam novamente a atenção para o uso de matérias-primas celulósicas, as biomassas, como fornecedor de energia e de outras biomoléculas de valor econômico.

A composição dos materiais lignocelulósicos (Figura 2.3) difere de uma espécie para outra. No entanto, os principais constituintes são do mesmo tipo: cerca de 50 e 60% de carboidratos na forma de celulose e hemicelulose e cerca de 20 e 35% de lignina. A celulose é o principal componente na parede celular das células vegetais, consistindo de cadeias lineares de unidades de glicose ligadas e é a macromolécula mais abundante na terra. O grau de polimerização (isto é, o número de unidades de glicose) varia entre 2.000 e 20.000. Devido à forte ligação de hidrogênio intra e intercadeias, a celulose é insolúvel na maioria dos solventes comuns, incluindo a água, e também é muito resistente à hidrólise (enzimática). A hemicelulose consiste em cadeias curtas, altamente ramificadas, de várias pentoses, principalmente xilose e arabinose, e hexoses, por exemplo, manose, galactose e glucose (LUNDQVISTA *et al.*, 2003). A lignina é um polímero fenil-propano tridimensional heterogêneo e reticulado, que se associa intimamente com celulose e hemiceluloses (MUSSATTO *et al.*, 2008).

Figura 2.3: Produtos de degradação de lignocelulose como resultado do pré-tratamento sob condições ácidas.



Fonte: JÖNSSON e MARTÍN (2016).

Para melhorar a acessibilidade da enzima e para liberar os monômeros desta rede, certos pré-tratamentos são necessários para alterar a microestrutura, macroestrutura e composição química da lignocelulose (JÖNSSON e MARTÍN, 2016).

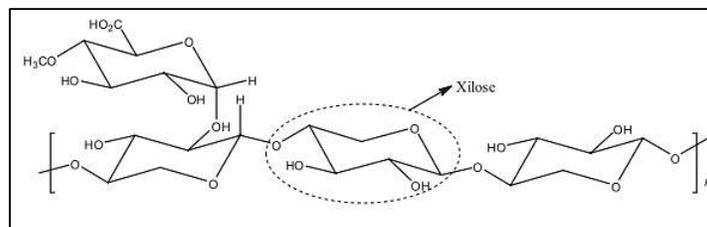
A biomassa lignocelulósica é categorizada em quatro grupos principais com base em sua fonte: (1) biomassa lenhosa, (2) resíduos agrícolas (arroz/trigo/palha de cevada, palha de milho, bagaço de cana), (3) culturas energéticas (folhas de rotação curta cultivadas especificamente para a produção de biocombustível) e (4) de resíduos celulósicos (resíduos sólidos urbanos, fábricas de celulose e resíduos de moagem). Em relação à taxonomia de plantas, essas fontes são simplesmente classificadas como espécies de árvores de madeira dura ou macia, ou espécies de gramíneas (KIM *et al.*, 2016).

2.2.1 Celulose

O principal componente dos materiais lignocelulósicos é a celulose, polissacarídeo formado por moléculas de glicose unidas através de ligações β -1,4-glicosídicas. Cadeias de celulose são estabilizadas e ligadas entre si por pontes de

xilose (SUN *et al.*, 2005). Devido à sua natureza ramificada de hemiceluloses, hemiceluloses provavelmente existem em plantas em forma amorfa (SUN *et al.*, 2016).

Figura 2.5: Representação esquemática da hemicelulose.



Fonte: SANTOS *et al.* (2012).

A estrutura ramificada da hemicelulose diminui as energias de ligações e a cristalinidade tornando mais facilmente hidrolisada que a celulose (CANETTIERE, 2004). Conforme RABELO (2010), a hemicelulose forma cadeias curtas e ramificadas, diferindo da celulose principalmente por constituir diferentes unidades de açúcares.

2.2.3 Lignina

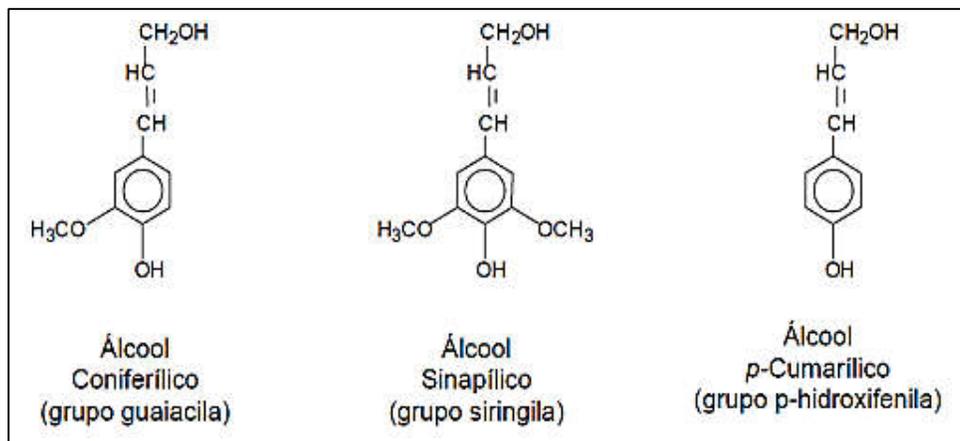
A lignina é a única matéria-prima aromática renovável de grande volume, que é encontrado na maioria das plantas (GILLET *et al.*, 2017; LUPOI *et al.*, 2015). A lignina é geralmente a fração mais complexa e menor, representando cerca de 10 a 25% da biomassa em peso. Tem um polímero heterogêneo de cadeia longa composto em grande parte unidades de fenil-propano mais comumente ligadas por ligações de éter. A lignina age como uma cola, preenchendo a lacuna entre e em torno da tez de celulose e hemicelulose com os polímeros. Está presente em toda a biomassa vegetal; portanto, é considerado subproduto ou como resíduo no processo de produção de bioetanol (HAMELINCK *et al.*, 2005).

Considerada por BRISTOW e KOLSETH (1986) a substância responsável pela rigidez nas paredes das células, na madeira é um agente de ligação, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e dobra. Também sendo responsável pelo transporte interno de água, nutrientes e metabólitos.

A lignina é um polifenol construído de unidades de fenil-propanas (C6-C3). Diferente da celulose, a lignina não tem estrutura cristalina e é considerado um polímero amorfo, cuja estrutura principal, provém da polimerização dehidrogenativa (iniciada por enzimas) dos seguintes precursores primários: álcool trans-coniferílico, álcool trans-sinapílico e álcool trans-p-cumárico, (representados na Figura 2.6). É considerada como um dos materiais mais resistentes na natureza. Portanto, a lignina não deve ser

considerada como uma substância química única, mas sim, como uma classe de materiais correlatos (CASTRO, 2009).

Figura 2.6: Os três precursores primários na formação da lignina.

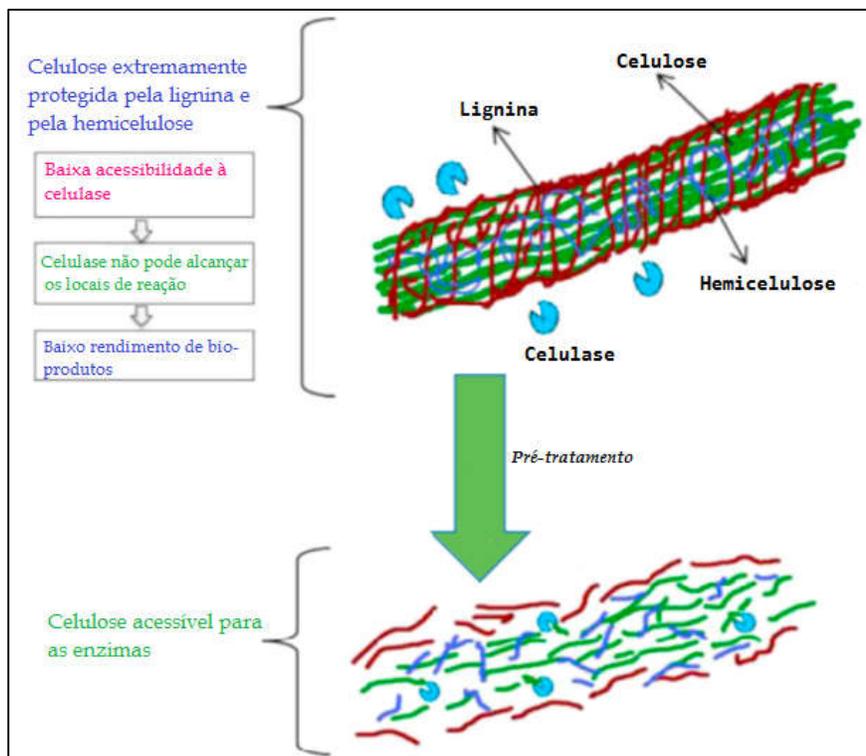


Fonte: FENGEL e WEGENER (1989).

2.3 PRÉ-TRATAMENTO

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica compreende as seguintes etapas principais: hidrólise de celulose e hemicelulose, fermentação de açúcar, separação do resíduo de lignina e, finalmente, recuperação e purificação do etanol para atender às especificações de combustível. A tarefa de hidrólise de lignocelulose a monossacarídeos fermentescíveis ainda é tecnicamente problemática porque a digestibilidade da celulose é dificultada por muitos fatores físico-químicos, estruturais e composicionais. Devido a estas características estruturais, o pré-tratamento é um passo essencial para a obtenção de açúcares potencialmente fermentáveis no passo de hidrólise. O objetivo do pré-tratamento é decompor a estrutura da lignina e romper a estrutura cristalina da celulose para melhorar a acessibilidade das enzimas à celulose durante a etapa de hidrólise (Figura 2.7) (MOSIER *et al.*, 2005; KARIMI E TAHERZADEH, 2016).

Figura 2.7: Desenho esquemático do pré-tratamento.



Fonte: TIAN *et al.* (2018).

O pré-tratamento é um passo necessário para alterar algumas características da lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina), estes componentes são fortemente entrelaçados e ligados através de ligações covalentes ou não covalentes, formando a matriz lignocelulósica. As características estruturais de materiais lignocelulósicos formam forte recalcitrância nativa para enzimas e resultam em digestibilidade relativamente baixa de materiais lignocelulósicos *in natura*. Um método de pré-tratamento adequado é necessário para superar essa recalcitrância e torna os polissacarídeos facilmente disponíveis para a digestão enzimática. Até o momento, vários processos de pré-tratamento foram desenvolvidos, que podem ser categorizados em processos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos e também por algumas combinações desses processos. Como cada processo de pré-tratamento tem suas vantagens e desvantagens, algumas combinações de processos de pré-tratamento podem não apenas aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose, mas também facilitar a recuperação das ligninas e hemiceluloses associadas para a produção de produtos de alto valor (SUN *et al.*, 2016).

Durante as últimas décadas, várias abordagens de pré-tratamento foram desenvolvidas para gerar açúcar fermentável de baixo custo a partir da maioria dos

materiais lignocelulósicos de celulose agrícola e hemicelulose (YANG e WYMAN, 2008). A análise composicional da lignocelulose, antes e depois do pré-tratamento, é usada em quase todos os estudos de produção de biocombustíveis de segunda geração, exceto em algumas investigações sobre a produção de biogás que usam sólidos voláteis. Análises precisas e confiáveis são importantes para avaliar a produção de biocombustíveis. O rendimento do produto, recuperações, avaliações técnico-econômicas e estudos de viabilidade são tipicamente baseados no conteúdo de carboidratos (SLUITER *et al.*, 2010; TEMPLETON *et al.*, 2010).

A eficiência do pré-tratamento é relatada por BAUDEL (2006), em termos de rendimento, seletividade, funcionalidade, simplicidade operacional, segurança, higiene industrial e atributos ambientais, além do reduzido consumo de insumos químicos, energia e utilidades.

2.3.1 Pré-tratamento Químico

2.3.1.1 Pré-tratamento ácido

De acordo com BEHERA *et al.* (2014), este tipo de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica proporciona a modificação do arranjo do material lignocelulósico, conduzindo-o adequadamente para uma consecutiva hidrólise enzimática. A eficácia do procedimento necessita do conhecimento da concentração do ácido, da razão sólido/líquido e da temperatura. O pré-tratamento com ácido geralmente envolve a adição de ácidos concentrados ou diluídos de 0,2% p/p a 2,5% p/p para a biomassa, e continuamente misturando a 130°C a 210°C. A hidrólise ácida diluída é realizada em duas condições diferentes, a saber, alta temperatura ($T > 160^{\circ}\text{C}$) em modo contínuo para baixa carga de sólidos e baixa temperatura ($T \leq 160^{\circ}\text{C}$) em modo batelada para alta carga de sólidos (NASEERUDDIN *et al.*, 2013).

Como as ligações glicosídicas das hemiceluloses e celulose são suscetíveis ao ácido, o pré-tratamento ácido pode ser aplicado para solubilizar hemiceluloses parciais de materiais lignocelulósicos e melhorar ainda mais a acessibilidade das enzimas à celulose. Ácidos concentrados e diluídos foram usados para o pré-tratamento de vários materiais lignocelulósicos. No entanto, os pré-tratamentos ácidos concentrados provavelmente causam degradação severa da celulose, alta concentração de inibidores e corrosão de equipamentos sérios, assim os ácidos concentrados são menos atraentes (ALVIRA *et al.*, 2010). O pré-tratamento com ácido diluído tem algumas vantagens sobre a hidrólise ácida concentrada para resolver problemas como recuperação de ácido,

toxicidade e manutenção especial contra materiais corrosivos (SIVERS e ZACCHI, 1995; SUN e CHEN, 2007).

O pré-tratamento ácido diluído aparece como o método mais favorável para aplicações industriais e tem sido estudado para pré-tratamento ampla gama de biomassa lignocelulósica. Diferentes tipos de reatores, como percolação, batelada, batelada e contracorrente, foram aplicados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2008). No entanto, dependendo da temperatura do processo, alguns compostos de degradação do açúcar, como furfural e hidroximetilfurfural, e compostos de degradação da lignina aromática são detectados, e afetam o metabolismo do microrganismo na etapa de fermentação (SAHA *et al.*, 2005).

Foram relatados altos rendimentos de hidrólise ao pré-tratamento de materiais lignocelulósicos com H₂SO₄ diluído, que é o ácido mais estudado. Ácido clorídrico, ácido fosfórico e ácido nítrico também tem sido estudados (MOSIER *et al.*, 2005). Ácidos orgânicos, como os ácidos fumárico ou maleico, aparecem como alternativas para melhorar a hidrólise da celulose para a produção de etanol. Neste contexto, ambos os ácidos foram comparados com o ácido sulfúrico em termos de rendimentos de hidrólise da palha de trigo e formação de compostos de degradação do açúcar durante o pré-tratamento. Resultados mostraram que os ácidos orgânicos podem ser pré-tratados com alta eficiência, embora o ácido fumárico tenha sido menos efetivo que o ácido maleico. Além disso, uma menor quantidade de furfural foi formada nos pré-tratamentos ácido maléico e fumárico do que com ácido sulfúrico (KOOTSTRA *et al.*, 2009).

2.3.1.2 Pré-tratamento alcalino

A ação do pré-tratamento alcalino, que pertence a métodos químicos, é eficaz no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Consiste em reações de solvatação e saponificação que têm dois efeitos principais na matriz lignocelulósica: ao mesmo tempo o tratamento permite a solubilização parcial da lignina e o inchaço das fibras, com conseqüente diminuição da cristalinidade e grau de polimerização (RABEMANOLONTOA e SAKA, 2016; GALBE e ZACCHI, 2012). Neste método, a biomassa é embebida em soluções alcalinas, tais como hidróxido de cálcio, potássio, sódio e amônio e depois misturada a uma temperatura adequada durante um determinado período de tempo (IBRAHIM *et al.*, 2011).

O pré-tratamento alcalino surgiu como um dos mais eficazes pré-tratamentos, dada a sua natureza pouco poluente, não corrosiva, que requer condições menos intensivas em comparação com outras tecnologias (KIM *et al.*, 2016). É considerado por

PENG *et al.* (2012), que pela desacetilação da hemicelulose, há geração de ácido acético em solução, o que pode afetar nos rendimentos, tornando uma das principais desvantagens de se utilizar pré-tratamento alcalino. Porém, é possível tornar o processo mais rentável dependendo de condições como tempo, concentração, temperatura e álcali a ser utilizado. JUNG *et al.* (2011) considera que outras desvantagens estão nos períodos de tratamento, que podem durar de horas até dias, e caso seja necessário, precisa-se realizar a neutralização do hidrolisado.

Pré-tratamentos alcalinos são realizados em condições mais amenas, algumas até em temperatura ambiente, evidenciadas por imersão em hidróxido de sódio ou em hidróxido de amônio. Tais métodos podem eliminar a necessidade de materiais caros e projetos especiais para lidar com a corrosão e condições de reação severas. Também é possível recuperar e reutilizar reagentes químicos em alguns dos métodos de pré-tratamentos alcalinos (KIM *et al.*, 2016).

Pré-tratamentos alcalinos mostram menor degradação do açúcar e formação de derivados de furano (GONZALEZ *et al.*, 1986) do que pré-tratamentos térmicos e ácidos (FENGEL e WEGENER, 1989).

O pré-tratamento utilizando hidróxido de cálcio (“lime”) apresenta vantagens em termos de custo do reagente, segurança do processo e possibilidade de recuperar o álcali sob a forma de carbonato de cálcio mediante reação com dióxido de carbono produzido na etapa de fermentação alcoólica. No entanto, ao contrário da catálise ácida o “lime” pode ocasionar reações irreversíveis na biomassa, formando sais que são incorporados durante o pré-tratamento (MOISER *et al.*, 2005).

O hidróxido de sódio é um dos catalisadores de base mais fortes, a eficácia do pré-tratamento é evidenciada por um maior grau de hidrólise enzimática do que com outros pré-tratamentos alcalinos (KIM *et al.*, 2016).

O hidróxido de sódio ataca eficazmente a ligação entre lignina e hemicelulose em complexos de lignina-carboidrato (LCC – Lignin carbohydrate complexes); em particular, cliva as ligações éter e éster na estrutura LCC. O hidróxido de sódio também é eficaz para a clivagem das ligações éster e carbono-carbono (C-C) em moléculas de lignina (ácido ferúlico). Durante a reação de pré-tratamento com NaOH, o hidróxido de sódio é dissociado em íon hidróxido (OH⁻) e íon sódio (Na⁺) e, à medida que a concentração iônica de hidróxido aumenta, a velocidade da reação de hidrólise aumenta em conformidade (MODENBACH, 2013).

O pré-tratamento alcalino pode desempenhar um papel importante na biorrefinaria da biomassa lignocelulósica porque os tratamentos alcalinos podem ser aplicados não apenas para o pré-tratamento, mas também como método de

fracionamento da biomassa lignocelulósica. Fracionamento de biomassa lignocelulósica em lignina, carboidratos e outros componentes pode ser o primeiro passo para a realização da biorrefinaria. Os reagentes alcalinos usados no pré-tratamento são altamente seletivos para a separação da lignina. Eles podem ser usados para recuperar uma grande fração de lignina com pureza relativamente alta. O pré-tratamento alcalino retém mais hemicelulose do que pré-tratamentos ácidos ou neutros (ácido diluído ou tratamento com vapor). O pré-tratamento com ácido diluído ou água quente é eficaz para a recuperação da hemicelulose. Com a seleção adequada de pré-tratamentos e sua seqüência de operação, o fracionamento efetivo pode ser alcançado (Tabela 2.1). Este é um atributo importante do conceito de biorrefinaria, pois oferece flexibilidade na utilização de biomassa. Se o tratamento alcalino for aplicado no primeiro estágio, a biomassa com pouca lignina e a lignina, serão obtidas como produtos. A lignina produzida em pré-tratamento alcalino é livre de enxofre, ao contrário da produzida pelos processos de polpação (KIM *et al.*, 2009).

Tabela 2.1: Efeitos de vários métodos de pré-tratamento nas três frações de material lignocelulósico

Pré-tratamento	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros efeitos
Ácido diluído	Pouca solubilização	Alta solubilização	Condensação e precipitação	-
Água quente líquida (LHW)	Pouca solubilização	Alta solubilização	Delignificação	-
Explosão de vapor	Leve degradação	Leve degradação	Redistribuição	Aumenta o tamanho dos poros
Alcalino	Redução do grau de polimerização e cristalinidade	Hidrólise parcial	Alguma solubilização	Aumento na área superficial
AFEX	-	Rompimento de ligações com a lignina	Rompimento de ligações com carboidratos	-

Fonte: MODENBACH (2013).

2.3.2 Pré-tratamento Físico

Os pré-tratamentos físicos visam aumentar o acesso área superficial específica de materiais lignocelulósicos para enzimas, reduzindo seu tamanho de partícula ou interrompendo sua regularidade estrutural. Diferentes tipos de processos físicos, como

a comutação mecânica (lascar, triturar ou moer) e irradiação (raios gama, feixe de elétrons ou microondas) têm sido utilizados para melhorar a digestibilidade dos materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2008).

A moagem pode reduzir significativamente o tamanho das partículas e o grau de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos e, conseqüentemente, melhorar sua hidrólise enzimática, estendendo o tempo de moagem (YEH *et al.*, 2010).

A irradiação também tem sido aplicada para melhorar a hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Como a irradiação não pode remover hemiceluloses ou lignina dos materiais lignocelulósicos ou reduzir seu tamanho de partícula, a irradiação é geralmente usada como auxílio a outros processos de pré-tratamento. Foi relatado que os pré-tratamentos químicos assistidos por microondas são mais eficazes do que os pré-tratamentos químicos de aquecimento convencional (MORETTI *et al.*, 2014).

O processo de extrusão é um novo e promissor método de pré-tratamento físico para conversão de biomassa em produção de etanol. Na extrusão, os materiais são submetidos a aquecimento, mistura e corte, resultando em modificações físicas e químicas durante a passagem através da extrusora. Acredita-se que a velocidade do parafuso e a temperatura do cilindro perturbem a estrutura da lignocelulose, causando desfibrilação, fibrilação e encurtamento das fibras e, no final, aumentando a acessibilidade dos carboidratos ao ataque enzimático (KARUNANITHY *et al.*, 2008). Os diferentes parâmetros do biorreator devem ser levados em consideração para alcançar a mais alta eficiência no processo. Em estudos recentes, a aplicação de enzimas durante o processo de extrusão está sendo considerada uma tecnologia promissora para a produção de etanol (ALVIRA *et al.*, 2010).

Exceto a trituração preliminar e/ou moagem, outros processos físicos são raramente utilizados devido aos seus altos custos (SUN *et al.*, 2016).

2.3.3 Tratamento Físico-químico

Nos pré-tratamentos físico-químicos são utilizados agentes químicos ácidos, alcalinos ou água, conjuntamente com processos físicos tais como: incremento de temperatura ou pressão, processos de descompressão rápida, ultrassom, entre outros, para atingir dois propósitos: aumentar a área superficial do material sólido e hidrolisar parcial ou totalmente a biomassa (RESENDE *et al.*, 2016). Essa categoria inclui grande parte dos métodos de pré-tratamentos, como a explosão a vapor, hidrotermólise (LHW), explosão da fibra por amônia (AFEX), oxidação úmida, percolação da amônia recirculada, uso de solventes orgânicos e explosão com CO₂ (MOOD *et al.*, 2013).

A explosão a vapor é o pré-tratamento físico-químico mais amplamente empregado para a biomassa lignocelulósica. Trata-se de um pré-tratamento hidrotérmico no qual a biomassa é submetida a vapor pressurizado por um período de tempo que varia de segundos a vários minutos, e então subitamente despressurizado. Este pré-tratamento combina forças mecânicas e efeitos químicos devido à hidrólise (auto-hidrólise) de grupos acetil presentes na hemicelulose. Auto-hidrólise ocorre quando as altas temperaturas promovem a formação de ácido acético a partir de grupos acetilo; além disso, a água também pode agir como um ácido a altas temperaturas. Os efeitos mecânicos são causados porque a pressão é subitamente reduzida e as fibras são separadas devido à descompressão explosiva. Em combinação com a hidrólise e solubilização parcial da hemicelulose, a lignina é redistribuída e, em certa medida, removida do material (PAN *et al.*, 2005).

Os resultados mostraram que o rendimento máximo da hidrólise enzimática foi obtido após o vapor explodir a 210°C por 10 min. Embora o rendimento semelhante de glicose também possa ser alcançado em condições mais severas, inibidores como compostos aromáticos e subprodutos de desidratação se formaram sob condições de explosão de vapor, o que impactou ainda mais o processo de fermentação subsequente. Assim sendo, é necessário um passo de lavagem para desintoxicação. Lavagem com água pode reduzir eficazmente o conteúdo do inibidor no vapor explodiu materiais lignocelulósicos, o que é benéfico para os seguintes processos de hidrólise enzimática e fermentação (SUN *et al.*, 2016).

O processo AFEX (*Ammonia* Fiber Explosion), explosão da fibra com amônia, foi introduzido como um método de pré-tratamento para a biomassa lignocelulósica (DALE *et al.*, 1985). A amônia líquida causa o inchaço da lignocelulose e a alteração da estrutura cristalina da celulose. A rápida liberação de pressão causaria a ruptura física e a redução da cristalinidade dos materiais lignocelulósicos. O pré-tratamento com AFEX remove pouca lignina e hemiceluloses de materiais lignocelulósicos, mas pode melhorar a eficiência da hidrólise enzimática de vários materiais lignocelulósicos a baixas cargas enzimáticas (LEE *et al.*, 2010).

2.3.4 Tratamento Biológico

RESENDE *et al.* (2016) afirma que são utilizados microrganismos que degradam de forma seletiva a lignina e a hemicelulose, mantendo preferencialmente intacta a celulose, para o processo conhecido como biopolpação, que consiste na obtenção da polpa de celulose a partir do material lignocelulósico. Microrganismos ou enzimas

também foram aplicados para pré-tratar vários materiais lignocelulósicos antes da hidrólise enzimática (SÁNCHEZ, 2009).

Durante o processo de biopolpação o grau de polimerização da celulose pode ser reduzido aumentando a proporção de regiões terminais, que é mais suscetível à hidrólise. Grande quantidade de hemicelulose é hidrolisada, enquanto a lignina também é em grande parte retirada ou degradada (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

SUN (2002) destaca que os fungos de degradação “branca” são os principais basidiomicetos seletivos na quebra da lignina e da hemicelulose, utilizados no tratamento biológico de resíduos agroindustriais.

O uso de fungos em projetos de degradação biológica é atraente devido ao seu baixo custo e ao seu sistema de hidrólise enzimática da lignocelulose. Como vantagens do pré-tratamento biológico podemos ressaltar: a baixa exigência de consumo de energia, pouca exigência química, condições ambientais suaves, produção de baixa quantidade de compostos inibidores da fermentação em relação a outros tipos de pré-tratamentos (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

É comumente utilizado os microrganismos (bactérias e fungos) no tratamento biológico, sendo que MTUI (2009) destaca que também podem ser utilizadas somente as enzimas produzidas por estes microrganismos, que são comercializadas contendo preparações de enzimas hidrolíticas e oxidativas.

2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática é considerada a técnica mais promissora para a conversão de compostos lignocelulósicos em açúcares fermentáveis (WOOLEY *et al.*, 1999). O processo de hidrólise enzimática depende de vários fatores, como pH, tempo, temperatura, substratos e atividades enzimáticas, etc. A sacarificação enzimática é feita separadamente da fermentação conhecida como hidrólise e fermentação separadas (SHF). Quando a hidrólise e a fermentação da celulose são realizadas simultaneamente, o fenômeno é conhecido como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Hoje em dia, esse processo de sacarificação simultânea de celulose e hemicelulose é obtido por co-fermentação de hexoses e açúcares de pentoses (SSCF) com a ajuda de microrganismos geneticamente modificados que fermentam xilose e glicose no mesmo meio, onde ambas as enzimas para celulose e hemiceluloses estão disponíveis. A principal vantagem dessa tecnologia é que o SSF e o SSCF podem ser realizados no mesmo tanque, o que torna todo o processo barato, viável e de baixo custo (reduz o capital e o investimento operacional). Métodos biológicos, físicos e químicos têm sido

empregados para desintoxicação (remoção de compostos inibitórios na fermentação) de hidrolisados lignocelulósicos (OLSSON e HAHN-HAGERDAL, 1996).

A carga da enzima no passo de sacarificação também determina a taxa e extensão da hidrólise do polissacarídeo. As etapas de pré-tratamento e sacarificação são intimamente acoplado. Os efeitos de um mau pré-tratamento podem ser superados, até certo ponto, por cargas enzimáticas mais elevadas. Da mesma forma, um pré-tratamento eficaz pode reduzir a enzima necessária carregando substancialmente (TEYMOURI *et al.*, 2005).

Após a realização do pré-tratamento, a hidrólise utilizando enzimas apropriadas representa o método mais eficaz para liberar monossacáridos da lignocelulose. Três enzimas principais, a endoglucanase, a exoglucanase e a β -glicosidase estão envolvidas na hidrólise da celulose para a glicose e suas ações são sinérgicas. Endoglucanase ataca regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose e cria extremidades livres da cadeia. A exoglucanase degrada ainda mais a molécula removendo as unidades de celobiose das extremidades da cadeia livre, que é então clivada em glicose pela ação da β -glicosidase. A hidrólise enzimática pode ser influenciada pelas concentrações de substrato e produto final, atividade enzimática e condições de reação (GALBE e ZACCHI, 2012). O uso da enzima celulase suplementada com outras enzimas pode aumentar a taxa de hidrólise enzimática. Isto é bem conhecido que suplementar celulases com hemicelulases pode resultar em uma maior produção final de açúcar. Dosagem de celulase de 10 e 30 FPU/g de celulose é freqüentemente usada em estudos; no entanto, as cargas de enzimas podem variar dependendo do pré-tratamento, tipo e concentrações de matérias-primas (QING e WAYMAN, 2011).

2.4.1 Cinética da hidrólise enzimática da celulose

A celulose é degradada sinérgicamente em glicose por três tipos de celulase: endoglucanases, que clivam aleatoriamente ligações β -1,4-glicosídicas nas cadeias de celulose longe das extremidades; celobiohidrolases, que produzem celobiose atacando a celulose das extremidades da cadeia; e β -glucosidases, que convertem celobiose em glicose. Além do complexo enzimático celulase, a natureza do substrato (caráter superficial, reatividade, acessibilidade e presença de lignina etc.) torna o processo de sacarificação enzimática ainda mais complexo. Mais importante, a sacarificação enzimática da celulose é uma reação heterogênea. Antes da reação, a celulase deve ser adsorvida nas superfícies do substrato e depois difundida nas superfícies do

substrato para um local reativo. Assim, as condições de difusão, como a composição da solução aquosa e a condição de agitação, etc., também afetam fortemente a cinética da reação (ZHANG e LYND, 2004; WANG e FENG, 2010).

A cinética de Michaelis-Menten é observada na reação enzimática numa solução aquosa ideal. Assim, a sacarificação enzimática da celulose em uma solução aquosa ideal deve seguir a cinética de primeira ordem (Equação 2.1).

$$\frac{dC}{dt} = -kC \quad (2.1)$$

Onde C é a concentração de celulose, t é o tempo e k é a taxa constante na cinética tradicional.

A sacarificação enzimática heterogênea da celulose é comumente submetida à análise cinética clássica de Michaelis-Menten, apesar de ser desenvolvida apenas para reações homogêneas. Alguns deles são estendidos para incluir a adsorção da celulose por Langmuir na celulose insolúvel, enquanto os fatos experimentais indicam que a ligação à celulase não cumpre com as premissas implícitas no modelo de Langmuir. Assim, os modelos podem ser amplamente divididos em quatro classes: modelos empíricos, modelos baseados em Michaelis-Menten, modelos de contabilização da adsorção e os modelos desenvolvidos para substratos solúveis. Além dos modelos baseados em interferência e cinética fractal (ZHANG e LYND, 2004; BANSAL *et al.*, 2009).

2.5 CELULASES

A hidrólise enzimática da celulose é realizada mediante a presença de enzimas altamente específicas, chamadas celulases, que operam em condições brandas de pH (4-5) e temperatura (40 – 60°C). Basicamente, as enzimas atuam como catalisadoras da reação, hidrolisando as cadeias de celulose em monômeros de glicose (DE CASTRO e PEREIRA JUNIOR, 2010).

Para uma hidrólise total, RESENDE *et al.* (2016) considera que por ser um substrato complexo, a degradação da biomassa lignocelulósica necessita de um conjunto de enzimas que atuam sinergicamente. Sendo necessário três ou mais grupos de diferentes enzimas, que incluem as celulases, hemicelulases e ligninases, que dependem do produto esperado ou o grau de hidrólise a ser obtida. Afirma ainda, que os microrganismos mais utilizados na produção de enzimas celulolíticas incluem: espécies de fungos *Trichoderma*, *Humicola*, *Penicillium* e *Aspergillus*; bactérias *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Cellulomonas* e actinomicetos *Streptomyces* e *Actinomucor*, sendo que o *Trichoderma reesei* é o principal produtor inclusive industrialmente.

Há algumas enzimas que fazem a degradação eficaz do polímero de lignina, especificamente: manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), lacase, glicol-oxidase, oxidase de açúcar, álcool oxidase e quinona oxidoreductase (SARIKAYA e LADISCH, 1997).

Enzimas ligninolíticas têm diversas aplicações biotecnológicas potenciais, dentre os quais podemos citar: indústria de alimentos (remoção de compostos fenólicos de alimentos e da cerveja, fonte natural de aromas); indústria de polpa e papel (despolimerização da lignina, deslignificação da polpa e branqueamento de polpa Kraft); indústria têxtil (degradação de corantes e branqueamento); biorremediação (biodegradação de xenobióticos); síntese orgânica; aplicações médicas, farmacológicas, em cosméticos e em nanotecnologia (produção de polímeros, biossensores, síntese de compostos funcionais, entre outros) (MACIEL *et al.*, 2010).

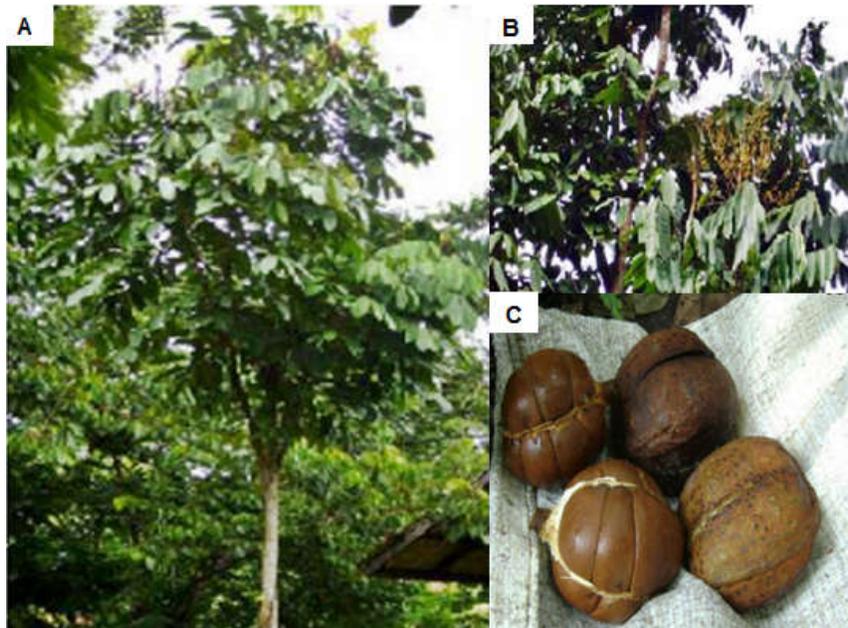
2.6 ANDIROBA

Diante do que expõe LEITE (1997), a origem da *Carapa guianensis Aubl.*, que pertence à família *Meliceae*, conhecida popularmente como “andiroba”, vem das palavras “nhandi” que significa óleo e “rob” que quer dizer amargo. No estado do Amazonas, o nome andiroba é atribuído a duas espécies: *Carapa guianensis Aubl.* com ocorrência em toda a bacia Amazônica, preferencialmente em ambiente de várzea e *Carapa procera D.C.* espécie mais restrita a algumas áreas na Amazônia, porém com ocorrência também na África (FERRAZ *et al.*, 2002).

A *Carapa guianensis Aubl.* é uma árvore de grande a pequeno porte, podendo atingir até 55 metros de altura com copa de tamanho média, alta densidade e presença de ramos eretos ou com leve curvatura. Suas folhas são compostas, alternadas e paripinadas com média de 30-90 cm de comprimento, os folíolos são opostos ou subpostos em 3 a 10 pares com 10 a 50 cm de comprimento e 4 a 18 cm de largura. A espécie possui nectários extraflorais na ponta das folhas, responsáveis pela atração de formigas (LORENZI, 2002).

É considerado por LORENZI (2002) e REVILLA (2001), que o tronco é reto, cilíndrico e possui sapopemas em sua base. A casca é analisada como grossa e de sabor amargo. Suas flores são uma panícula axilar, particularmente na extremidade de seus galhos, subglobosas de cor creme. O fruto consiste em uma cápsula globosa a subglobosa, com o número de quatro valvas que se separam quando caem ao solo, liberando de quatro a doze sementes, que em média pesam cerca de 21 g. Como pode ser observado na Figura 2.8.

Figura 2.8: (A) Árvore de andiroba de pequeno porte, (B) Ramo de folhas da árvore de andiroba, (C) Fruto.



Fonte: (A) e (B) PANTOJA (2007); (C) PEREIRA (2010).

Segundo SILVA (2005), as sementes da andiroba possuem até 60% de óleo, e sua árvore é capaz de render em média de 180 a 200 kg de sementes ao longo do ano. As sementes são de coloração marrom, com laterais anguladas devido a compressão mútua que ocorre no desenvolvimento do fruto. As sementes de um mesmo fruto podem variar de tamanho e forma (Figura 2.9). Os cotilédones formam uma massa de reserva única, pois são fundidos, impossibilitando a percepção e a separação das duas partes (LORENZI, 2002).

Figura 2.9: Sementes da espécie *Carapa guianensis*.



Fonte: Autor (2019).

É possível diferenciar as duas espécies de andiroba através das sementes, afirma MENDONÇA (2007), que podem ser identificadas por meio do tamanho e da forma do hilo. As sementes de *C. guianensis* possuem tamanho médio maior e rendimento no processo de extração do óleo fixo superior quando assemelhado ao das sementes de *C. Procera*.

A andiroba pode ser encontrada no Brasil, ao longo de toda a bacia Amazônica, particularmente nas várzeas e áreas alagáveis (FERRAZ *et al.*, 2003). RAPOSO *et al.* (2003), diz que também são encontradas em locais bem drenados de terra firme.

De acordo com CAVALCANTE *et al.* (1986), a andirobeira está associada com a ucúba (*Virola guianensis*) e a seringueira (*Hevea brasiliensis*). FERRAZ *et al.*, (2002), identificaram que na região de amazônica este tipo de espécie possui floração no período de dezembro a março e frutificação no período de março, abril e maio.

É considerado por GUERRA (2008), que os Produtos Florestais Não-Madeiros – PFNMs regionais possuem papel de suma importância na economia local e na vida das comunidades rurais e urbanas, uma vez que são usados como medicamentos, alimentos, entre outros.

A madeira, moderadamente pesada, é considerada nobre, fácil de trabalhar, permitindo bom acabamento sendo muito procurada no mercado interno e externo para a fabricação de móveis, lâminas, compensados, caixotaria fina e acabamentos internos de barcos e navios (LOUREIRO *et al.*, 1979). Porém, a partir de 1º de junho de 2005, com o Decreto N° 25.044, o corte, transporte e comercialização da madeira das espécies de andirobeiras e copaibeiras no Amazonas é restrito.

Conforme expõe RODRIGUES (1989), FAZOLIN *et al.*, (2000), FERRAZ *et al.*, (2002), SHANLEY (2005) e QUEIROZ (2007), o óleo que é extraído da andiroba possui alta demanda internacional. O chá oriundo da casca e das folhas é aplicado como remédio para combater infecções e na intervenção de doenças da pele.

Existem duas formas de fabricar o óleo da andiroba, uma artesanal e outra industrial. Um método da extração do óleo de andiroba é feito de forma mais mecânica, consiste na quebra das sementes, que são deixados em estufa na temperatura de 60 °C a 70 °C até atingir 8% de umidade, logo após são prensadas na temperatura de 90 °C, por meio de prensas hidráulicas. Raramente é excedido 30% do peso das sementes com 8% de umidade por meio industrial com prensagem dupla. Outra forma é popularmente feita pelas comunidades indígenas e caboclas da Região Norte, de forma mais trabalhosa e manual, consiste em cozinhar as sementes e deixá-las descansar por alguns dias na sombra. O óleo começa a se desvincular, então é separado a casca da amêndoa e soca-se em pilão até que o material esteja bastante amassado (conhecido

como pão-de-andiroba), após isso é exposto ao sol para que por meio de gotejamento libere gradativamente o óleo. Depois de extraído o óleo a massa é utilizada na fabricação de repelentes.

Diante do que expõe ROCHA *et al.* (2006), mesmo que o óleo seja o principal produto da andirobeira, esta vem sendo estudada com outros objetivos, como exemplo o aditivo para prevenir a formação de depósitos em sistemas de exploração de petróleo. Segundo COSTA *et al.* (2006) e ABREU *et al.* (2004), também pode ser usado como matéria-prima para a produção de biotensoativo por processos microbiológicos, ou ainda utilizado no estudo de sistemas de produção de biodiesel.

O óleo contido na amêndoa é amarelo-claro e extremamente amargo. Quando submetido à temperatura inferior a 25 °C solidifica-se, ficando com consistência parecida com a da vaselina. Contém substâncias como a oleína, palmitina e glicerina. A amêndoa contém proteínas (40%), glicídios (33,9%), fibras (6,1%), minerais (1,8%) e lipídios (6,2%) (REVILLA, 2001). O óleo da semente de andiroba foi anteriormente estudado quanto a sua capacidade analgésica, antibactericida, anti-inflamatória, anticancerígena, anti-tumoral e anti-fúngica, e propriedades anti-alérgicas, e também foi eficaz contra feridas, contusões, reumatismo, infecções de ouvido e picadas de insetos como um repelente (TANAKA *et al.*, 2012; MIRANDA JÚNIOR *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018; INOUE *et al.*, 2015; DE MORAES *et al.*, 2018).

Muitas pesquisas atualmente estão relacionadas ao aproveitamento de resíduos lignocelulósicos da agroindústria para a produção de insumos químicos, mas ainda muito deve ser feito para que esses processos se tornem viáveis do ponto de vista energético e econômico, desafios já conhecidos durante a etapa de implantação de processos inovadores.

Diante das lacunas relacionadas a aplicação de resíduos provenientes de matérias-primas características da região amazônica na produção de produtos químicos de maior valor agregado, este trabalho surgiu da motivação em contribuir através do estudo técnico relacionado ao aproveitamento de resíduo do processo de extração do óleo de andiroba.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

As sementes de andiroba foram coletadas na zona rural do município de Novo Airão, no estado do Amazonas. Após a coleta, as sementes foram transportadas até o Laboratório de Processos de Separação (LABPROS), da Faculdade de Ciências Agrárias na Universidade Federal do Amazonas, onde foram conduzidos os ensaios experimentais.

No laboratório as sementes inicialmente foram lavadas em água corrente, com o objetivo de retirar sujidades, tais como areia, folhas, galhos e similares. As sementes foram submetidas à secagem em estufa com recirculação de ar a uma temperatura de 50 °C, para não danificar a estrutura da celulose e comprometer os experimentos de pré-tratamento e de hidrólise enzimática posteriores, por um período de 48 horas. Após esse procedimento as sementes foram descascadas, então as cascas foram trituradas em moinho de facas (Tecnal, TE 650), sendo selecionadas as partículas com diâmetro menor que 1 mm (mesh 18); para a seleção da granulometria este estudo tomou como base o trabalho desenvolvido por GU *et al.* (2018), que relaciona a melhores resultados de pré-tratamento e de sacarificação, menores diâmetro de partícula de material lignocelulósico (Figura 3.1)

Figura 3.1: Casca de andiroba (esquerda) e seca e triturada (direita).



3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

As análises foram realizadas na semente *in natura*, após o pré-tratamento alcalino e após a hidrólise enzimática. No material *in natura* foi determinado o teor de umidade, extrativos, cinzas, celulose, hemicelulose, lignina, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise elementar (CNH) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). No material submetido ao pré-tratamento alcalino foram feitas as análises de celulose, hemicelulose, lignina, FTIR e MEV. Já no material hidrolisado, as análises realizadas foram: FTIR, MEV e Termogravimetria (TG).

3.2.1 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado utilizando o método tradicional de secagem do material em estufa. Foi pesado em torno de 2 g da amostra em cadinho de porcelana e colocado em estufa com recirculação de ar a 105 °C, até peso constante. O teor de umidade foi calculado através da Equação 3.1.

$$\% \text{ Umidade} = \left(1 - \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1}\right) * 100 \quad (3.1)$$

Sendo: M_1 a massa do cadinho vazio (g); M_2 a massa do cadinho (g) + amostra úmida (g) e M_3 a massa do cadinho (g) + amostra seca (g) (até peso constante).

3.2.2 Determinação dos extrativos

A determinação dos extrativos na biomassa foi baseada nos procedimentos padrões do NREL "Determination of Extractives in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2016). Adicionou-se aproximadamente 2 g da amostra seca ao cartucho de extração tendo sua massa devidamente anotada. Após montagem do extrator, o cartucho contendo a biomassa foi introduzido no tubo de extração do soxhlet (SLUITER *et al.*, 2016). Adicionou-se 100 mL de ciclohexano-etanol em cada balão do extrator, a análise foi feita em triplicata. Os balões foram colocados no extrator e o aquecimento ajustado para que fornecesse no mínimo 4 a 5 sifonações por hora, durando 6 horas de extração. Após a extração com o solvente, as amostras foram submetidas à lavagem, utilizando aproximadamente 100 mL de água destilada. Após a lavagem, os sólidos resultantes foram transferidos para uma estufa a 105 °C até massa constante, determinada em balança analítica (SLUITER *et al.*, 2016).

A determinação do teor de extrativos foi calculada de acordo com a Equação 3.2.

$$\% \text{ Extrativos} = \left(1 - \left[\frac{M_1 - M_2}{M_a} \right] \right) * 100 \quad (3.2)$$

Sendo: M_1 a massa do conjunto (cartucho + amostra) após a extração e posterior a secagem (g); M_2 a massa do cartucho (g) e M_a a massa de amostra inicial inserida no cartucho (g).

3.2.3 Determinação do teor de cinzas totais

O teor de cinzas totais da biomassa foi baseado no procedimento padrão do NREL "Determination of Ash in Biomass" (SLUITER *et al.*, 2016). Esta análise visa à determinação da quantidade de material inorgânico na biomassa, seja estrutural ou extraída, como parte da composição total.

Para a determinação do teor de cinzas totais, pesou-se 2 g de biomassa seca em cadinho de porcelana previamente tarado. A amostra foi calcinada a 300 °C por 30 minutos e, em seguida, a 550 °C por 2 horas. Por diferença de massa, o teor de cinzas totais foi determinado conforme a Equação 3.3.

$$\text{Cinzas}_{\text{Totais}} (\%) = \frac{M_{\text{Cinzas totais}}}{M_{\text{amostra seca}}} * 100 \quad (3.3)$$

Onde: $M_{\text{cinzas totais}}$ corresponde a diferença entre a massa do cadinho com as cinzas e a massa do cadinho vazio, ambos em gramas (g) e $M_{\text{amostra seca}}$ é a massa de amostra seca em gramas (g).

3.2.4 Determinação da celulose, hemicelulose e lignina

A celulose, hemicelulose e lignina foram quantificadas através das análises de fibra em detergente neutro (FDN = celulose + lignina + hemicelulose), fibra em detergente ácido (FDA = celulose + lignina) e lignina em detergente ácido de acordo com as metodologias descritas por VAN SOEST (1963).

- Fibras em detergente neutro

A determinação de fibra em detergente neutro foi realizada pesando 1 g de amostra seca em cadinho de porcelana previamente limpo e seco. Após a pesagem das

amostras, os cadinhos foram colocados no aparelho digestor de fibras. Em seguida adicionou-se 100 mL da solução de detergente neutro e 50 mL da solução de α -amilase termoestável, aquecendo-se até ebulição em 10 minutos, reduzindo a temperatura e adicionando-se três gotas de ácido octanóico para evitar a formação de espuma durante a ebulição. Após 1h de extração, as amostras foram filtradas aplicando-se o vácuo do próprio aparelho. O resíduo desta etapa foi lavado com água quente (90 - 100°C), deixando-as submersas em água por dois minutos após agitação. Em seguida, o vácuo foi aplicado para remover a água, sendo a operação repetida quatro vezes. Após a lavagem com água, foram adicionados 40 mL de acetona deixando as amostras embebidas por dois minutos, removendo a acetona com a filtração a vácuo, e realizando-se a lavagem com acetona mais uma vez. Após lavagem com acetona, o resíduo foi seco em estufa (105°C) durante uma noite para posterior pesagem. O resíduo obtido foi, então, encaminhado para a etapa de extração de fibra em detergente ácido.

- Fibras em detergente ácido

O resíduo obtido na análise do detergente neutro foi submerso em água destilada (por duas horas) sendo a água adicionada em cada cadinho. Em seguida os cadinhos foram novamente colocados no aparelho digestor e a água foi removida pela aplicação de vácuo. À temperatura ambiente, 100 mL da solução de detergente ácido foram adicionados, aquecendo-se até ebulição por 10 minutos, em seguida a temperatura foi reduzida e adicionado três gotas de ácido octanóico, para evitar a formação de espuma. As amostras, em ebulição, continuaram com a extração por 60 minutos. Após a extração, a solução de detergente ácido foi removida pela aplicação de vácuo, e repetidas às etapas de lavagem do resíduo com água aquecida (90 – 100 °C) e com acetona, levando-se o resíduo para secagem em estufa (105 °C) e posterior pesagem.

- Determinação de lignina insolúvel em ácido

Para esta análise uma hidrólise com ácido concentrado foi realizada. Pesou aproximadamente 0,30 g de amostra de matéria seca. Adicionou-se 3,0 mL de ácido sulfúrico a 72 % (m/m) em cada bécker devidamente identificado. Estes foram encubados em um banho termostático a 30 °C por 1 hora. Utilizando-se um bastão de vidro, as amostras foram agitadas a cada 5 min sem serem removidas do banho (SLUITER *et al.*, 2016). Após a hidrólise ácida concentrada, as amostras foram

removidas do banho termostático e o conteúdo transferido quantitativamente para erlenmeyers de 250 mL, utilizando para isso, 84,0 mL de água destilada, sendo a concentração ácida do meio diluída para 4 %. Para a completa hidrólise, os erlenmeyers foram fechados com papel alumínio e elásticos e depois colocados em uma autoclave. As amostras foram autoclavadas por 1 h a 121 °C. Após a decompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente antes de remover o papel alumínio (SLUITER *et al.*, 2016). A mistura reacional de cada erlenmeyer foi filtrada a vácuo em funil de buchner, previamente seco em estufa a 105 °C com papel de filtro de massa conhecida. Todo o sólido do erlenmeyer foi coletado e lavado com 100 mL de água destilada. Os sólidos coletados foram secos em estufa (105 °C) e pesados para serem encaminhados para a etapa de mineralização, em mufla (575 °C / 180 minutos).

3.2.5 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (4000-400 cm^{-1}) é uma técnica de grande importância na análise orgânica qualitativa, sendo muito utilizada na área de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas. A espectroscopia na região do infravermelho e demais métodos espectroscópicos modernos constituem hoje os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. São, também, de alta relevância na determinação da pureza e quantificação de substâncias orgânicas, bem como no controle e acompanhamento de reações e processos de separação (MARABEZI, 2009).

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi aplicada para determinar quais os grupos funcionais presentes na biomassa e no resíduo líquido.

As análises de FTIR foram feitas no espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier, marca Shimadzu, modelo IRAffinity-1S com acessório ATR-8000 acoplado. O espectro foi obtido por reflexão total atenuada horizontal com prisma de ZnSe com 64 varreduras. Os espectros foram obtidos no modo de transmitância, com faixa de medição de 500 a 4000 cm^{-1} . Para a análise, as amostras foram colocadas “in natura” diretamente no equipamento.

3.2.6 Análise elementar

A análise elementar é uma técnica para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. Seu funcionamento é baseado no

método de Pregl-Dumas, em que as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica). As análises foram realizadas em duplicata. Utilizou-se o equipamento da marca Perkin-Elmer, modelo 2400 Series II.

3.2.7 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta análise foi desenvolvida no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), e analisada por meio de elétrono-micrografias de varredura. As amostras secas foram fixadas com uma fita de carbono junto aos *stubs*, estrutura cilíndrica metálica utilizada como suporte para as amostras. Posteriormente, estas foram metalizadas, através do equipamento BAL-TEC 050 Sputter Coater, com uma fina camada de ouro, deixando as mesmas eletricamente condutivas e possibilitando sua visualização. Em seguida procedeu-se a avaliação por meio de observação no microscópio eletrônico de varredura (MEV), o aparelho utilizado foi o TESCAN - MEV VEGA 3. Neste estudo, optou-se pelo uso do aumento de 1.000, 5.000 e 10.000 vezes. Foi selecionada uma imagem representativa para cada um dos tratamentos.

3.2.8 Análise termogravimétrica e termogravimétrica diferencial (TG/DTG)

A termogravimetria (TG) é a técnica na qual a perda de massa é acompanhada pela curva decrescente em função do aumento da temperatura a cada instante, enquanto esta é submetida a uma programação controlada. A análise térmica (TG/DTG) foi realizada com o intuito de conhecer a estabilidade térmica e o processo de vaporização e decomposição da biomassa residual da hidrólise enzimática. As curvas termogravimétricas foram obtidas por meio de uma termobalança, Marca Ta Instrument, Modelo SDT Q600, a amostra foi aferida com aproximadamente 10 mg, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até 800 °C, com fluxo de gás N 5.0 de 30 ml/min e o cadinho utilizado na análise foi o de alumina de 90 microlitros sem tampa.

3.3 OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO

3.3.1 Condições do pré-tratamento alcalino

Para remover a lignina das cascas de andiroba, estas foram submetidas a um

pré-tratamento alcalino com NaOH. As cascas de andiroba moídas (5 g) foram adicionadas a 100 ml (concentração de sólidos de 5 %) de soluções de NaOH, com diferentes concentrações (2, 3 e 4 %), e submetidos a um tratamento térmico com diferentes temperaturas (60, 90 e 120 °C) em diferentes tempos (20, 60 e 120 minutos). Ao final do processo, a mistura reacional teve o pH corrigido até 5,0; visando a etapa posterior de hidrólise enzimática, ácido ou álcali livre podem alterar o pH da solução para valores fora da faixa de atividade enzimática e o hidrolisado pode conter produtos de degradação inibitória. Em seguida, as cascas após o tratamento, foram filtradas (em papel de filtro com tamanho médio de poros de 28 µm) a vácuo, e o sólido recuperado foi lavado com 100 mL de água destilada (Figura 3.2). Glucose, xilose e outros açúcares presentes em biomassa tratada não lavada podem influenciar o resultado final.

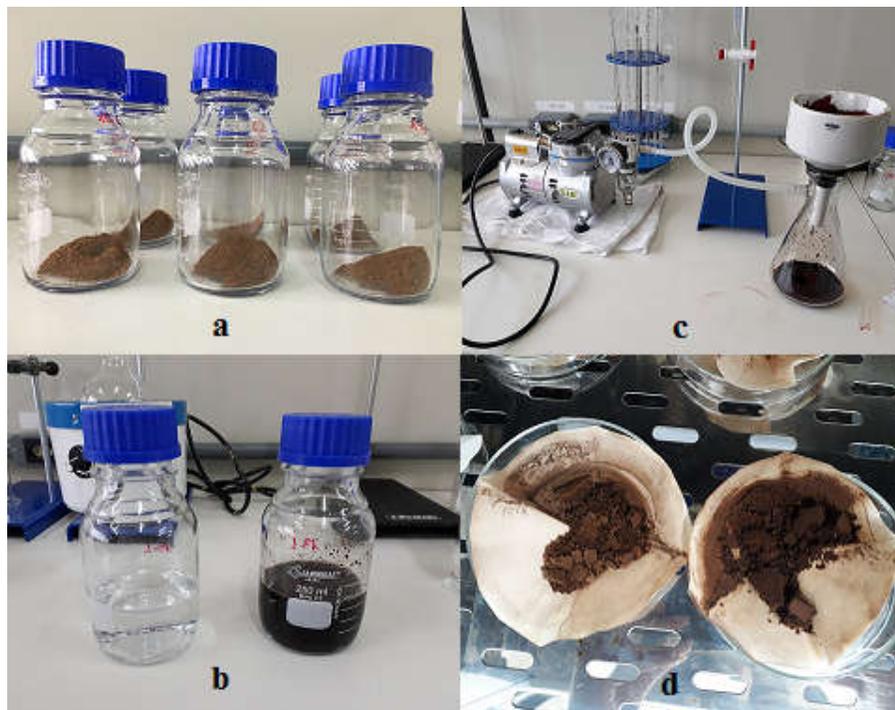
Após o procedimento de tratamento alcalino, o percentual de sólidos recuperados foi calculado de acordo com a Equação 3.4:

$$\text{Sólidos recuperados (\%)} = \frac{M_{PFA} - M_{PF}}{M_A} \times 100 \quad (3.4)$$

Sendo: M_{PFA} a massa de sólidos recuperados somado a massa do papel de filtro; M_{PF} a massa do papel de filtro; M_A a massa de amostra antes do pré-tratamento.

Os efeitos da concentração de NaOH, da temperatura e do tempo do tratamento alcalino na quantidade de sólidos recuperados (%) e na sacarificação (%), foram estudados de acordo com um planejamento experimental estatístico.

Figura 3.2: Etapas do pré-tratamento alcalino.



a – Biomassa seca; b – à esquerda solução de NaOH e à direita solução de NaOH contendo a biomassa, após o pré-tratamento; c – filtração à vácuo e d – sólidos recuperados.

3.3.2 Planejamento experimental estatístico

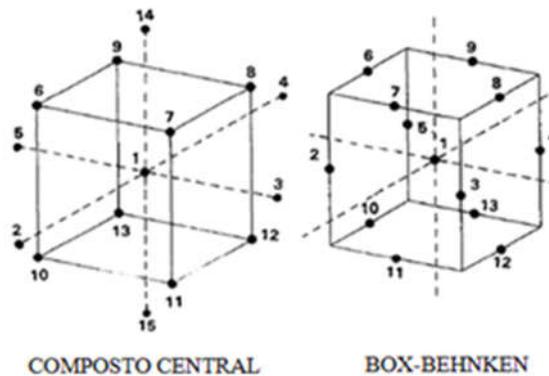
Nos últimos anos, as ferramentas quimiométricas têm sido frequentemente aplicadas para a otimização dos métodos analíticos, considerando-se as suas vantagens, tais como uma redução no número de experiências que necessitam de ser executado, resultando em menor consumo de reagente e trabalho de laboratório consideravelmente menor (FERREIRA *et al.*, 2007). BOX e BEHNKEN (1960) desenvolveram um novo arranjo de três níveis (3^k) para o estudo da quantificação de variáveis, em um planejamento de experimentos. Esse arranjo é formado pela combinação fatorial 2^k e um delineamento de bloco incompleto, o que resulta em um projeto que faz uso eficiente das unidades experimentais e que também é rotacional (MASON *et al.*, 1989).

O número de experimentos necessários para o desenvolvimento do planejamento de Box e Behnken (PBB) é definido através da Equação 3.5, onde N é o número de experimentos, k é o número de variáveis, e C_0 é o número de pontos centrais (FERREIRA *et al.*, 2007).

$$N = 2k \cdot (k - 1) + C_0 \quad (3.5)$$

O PBB diferencia-se do planejamento composto central (PCC), porque não contém pontos nos extremos da região cúbica, criado pelos dois níveis fatoriais, e contém um ponto central (MASON *et al.*, 1989) (Figura 3.3). Possui maior eficiência, já que a eficiência de um planejamento é definida pela divisão entre o número de coeficientes estimados pelo modelo e o número de experimentos (FERREIRA *et al.*, 2007). A Tabela 3.1 mostra a eficiência dos planejamentos PBB e PCC.

Figura 3.3: Gráfico prismático.



Fonte: CAMPAÑA *et al.* (1997).

Tabela 3.1: Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC.

Variáveis (k)	Número de coeficientes (p)	Número de experimentos (N)		Eficiência (p/N)	
		PCC	PBB	PCC	PBB
2	6	9	-	0,67	-
3	10	15	13	0,67	0,77
4	15	25	25	0,60	0,60
5	21	43	41	0,49	0,61
6	28	77	61	0,36	0,46
7	36	143	85	0,25	0,42
8	45	273	113	0,16	0,40

Fonte: FERREIRA *et al.* (2007).

Segundo FERREIRA *et al.* (2007), Box-Behnken é um bom planejamento para a metodologia de superfície de resposta, pois permite: (i) a estimativa dos parâmetros do modelo quadrático, (ii) construção de projetos sequenciais, (iii) a detecção de falta de ajuste do modelo, e (iv) utilização de blocos.

A otimização tomou como base o planejamento experimental de Box-Behnken (PBB), aplicado a procedimentos de otimização. O modelo consiste na repetição do ponto central, para se medir a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX e BEHNKEN, 1960).

A seleção de níveis fatoriais (Tabela 3.2) foi baseada em trabalhos realizados com materiais de constituição similar. Os três fatores de pré-tratamento foram escolhidos como X_1 , X_2 , X_3 , que são definidos em três níveis codificados como -1, 0 e +1.

Tabela 3.2: Variáveis independentes e seus valores codificados.

Níveis	Tempo de reação (min)	Concentração de NaOH (%)	Temperatura (°C)
	X_1	X_2	X_3
-1	20	2	60
0	60	3	90
1	100	4	120

O projeto experimental consiste em 15 execuções (Tabela 3.3) e esses experimentos permitem determinar o efeito de cada variável de processo independente (tempo de reação, concentração de NaOH e temperatura) e a interação entre essas variáveis nas variáveis dependentes (Sacarificação - % e Sólidos Recuperados - %).

Tabela 3.3: Delineamento Fatorial de Box-Behnken.

Ensaio	Tempo de reação (minutos)	Concentração de NaOH (%)	Temperatura (°C)
1	-1	-1	0
2	+1	-1	0
3	-1	+1	0
4	+1	+1	0
5	-1	0	-1
6	+1	0	-1
7	-1	0	+1
8	+1	0	+1
9	0	-1	+1
10	0	-1	-1
11	0	+1	+1
12	0	+1	-1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

O software Statistica 7.0 foi utilizado para realizar análise de variância (ANOVA) (considerando um intervalo de confiança de 95%) e gerar superfícies de resposta. Os dados experimentais foram avaliados usando a regressão da superfície de resposta, que é dada pelo seguinte polinômio (Equação 3.6).

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 \quad (3.6)$$

Onde, y é a variável dependente; X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes; β_1 , β_2 e β_3 são os coeficientes lineares β_{12} , β_{13} e β_{23} são coeficientes de interação e β_{11} , β_{22} e β_{33} são de segunda ordem ou coeficientes quadráticos. A superfície de resposta e os gráficos de contorno foram desenhados usando a equação polinomial obtida a partir da equação de regressão.

A avaliação da qualidade do modelo proposto será realizada através da tabela Anova (*Análise de variância*). Esta tabela permite relacionar diversos parâmetros do modelo proposto, como: a soma quadrática (SQ) devida aos coeficientes de regressão gerados (Soma Quadrática da Regressão, SQR), soma quadrática dos resíduos (SQres), soma quadrática total (SQT), soma quadrática do erro puro (SQep), e soma quadrática da falta de ajuste (SQfaj). Para cada SQ está associado um número de graus de liberdade (GL), e ao dividir esses valores por seus respectivos GL, temos a média quadrática (MQ) dos parâmetros do modelo. Esses valores de MQ (variâncias) podem ser utilizados para verificar a qualidade de um modelo que foi gerado. Para isso, é necessário efetuar uma comparação das variâncias calculadas (MQ) por meio de um teste F. Ao comparar as MQR (média quadrática da regressão) e MQres (média quadrática dos resíduos), o desejável é que a primeira seja maior que a segunda, preferencialmente o valor de F calculado deve ser algumas vezes maior que F tabelado, ou seja, essas variâncias devem ser estatisticamente diferentes. Outro teste F que deve ser analisado é aquele proveniente da comparação das MQfaj (média quadrática da falta de ajuste) e MQep (média quadrática do erro puro), neste caso o ideal é que essas MQ sejam estatisticamente iguais (se confundem), situação considerada ideal para um modelo (PEREIRA FILHO, 2017). Dessa forma, é possível afirmar que o modelo proposto não apresenta falta de ajuste e a incapacidade do mesmo em se ajustar aos valores reais se confundem com o erro intrínseco das réplicas autênticas do ponto central.

3.4 ATIVIDADE DA ENZIMA E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

3.4.1 Determinação da atividade enzimática da celulase

A enzima utilizada foi a Celluclast 1.5 L, doada pela Novozymes. Foi determinada a atividade da celulase como atividade de papel de filtro e expressa em unidade de papel de filtro (FPU) por volume de enzima original. Para a determinação da atividade de celulase seguiu o procedimento padrão do NREL Measurement of Cellulase Activities (ADNEY e BAKER, 2008), que aplica as diretrizes da IUPAC, descrita por GHOSE (1987).

O procedimento baseia-se em encontrar a concentração de uma solução da enzima de interesse que libere 2,0 mg de açúcares redutores a partir de 50 mg de papel de filtro Whatman nº 1 durante 60 minutos usando uma alíquota de 0,5 mL da solução de enzima. A reação enzimática foi conduzida em tubos de ensaio de 30 mL contendo 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, uma tira de papel de filtro 1 cm x 5 cm (aproximadamente 50 mg) e 0,5 mL de extrato enzimático, diluído nas seguintes proporções: 1:100, 1:200, 1:300 e 1:400. Os tubos de ensaios foram aquecidos em banho-maria a 50 °C por 60 min. Após esse tempo, adicionou-se 3 mL de DNS e a mistura foi fervida por 5 min. Foram adicionados então 20 mL de água destilada em cada tubo e agitou-se a mistura para sua completa homogeneização. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540 nm. Foram feitos controles para cada diluição, adicionando o reagente de DNS antes do extrato enzimático. Para o branco foi adicionada água destilada no lugar da amostra. Os valores de absorbância foram convertidos em massa de glicose através de curva de calibração com padrão autêntico de glicose e usados para construir um gráfico correlacionando o inverso das diluições do extrato enzimático versus a quantidade de glicose liberada. A equação da reta obtida foi usada para determinar o valor da diluição da enzima que correspondesse a liberação de 2,0 mg de glicose. O valor de 0,37 foi dividido por esse valor de diluição e o resultado obtido foi definido como atividade de celulasas totais do extrato em FPU.mL⁻¹. Uma curva de calibração foi usada no cálculo da atividade de FPU e foi preparada a partir de uma solução padrão de glicose de 10 mg.mL⁻¹. Alíquotas de 1 mL dessa solução foi adicionado aos tubos de ensaio de 30mL com diferentes volumes de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8 (0,5, 1,0, 2,0 e 4,0) o que culminou nas seguintes concentrações de glicose (6,7; 5,0; 3,3 e 2,0 mg.mL⁻¹, respectivamente). De cada solução obtida foram adicionados 0,5 mL de padrão, 1mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4,8, 3 mL de DNS e fervidos por 5min. Após a etapa de fervura foram adicionados então 20 mL de água destilada em cada tubo, agitando-se a mistura para completa homogeneização.

A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 540nm.

3.4.2 Método do ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS)

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método colorimétrico DNS, descrito por MILLER (1959). Este método baseia-se na redução, em meio alcalino, do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar redutor é oxidado a grupo carboxílico. O reagente DNS apresenta uma coloração alaranjada e ao misturar o reagente DNS com uma solução contendo açúcares redutores, ocorre desenvolvimento de uma coloração vermelha-alaranjado na solução, cuja absorbância no comprimento de onda 540 nm apresenta dependência linear com a concentração dos açúcares redutores.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 5g de ácido dinitro-3,5-salicílico em 100 mL de NaOH (2M). Misturou-se 150 g de tartarato de sódio e potássio em 250 mL de água destilada, sendo essa mistura aquecida até completa dissolução. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e completou-se o volume para 500 mL com água destilada. Por fim, aqueceu-se a solução de DNS em banho-maria a 40 °C até total dissolução dos sólidos. O reagente foi filtrado e guardado em frasco âmbar para proteger da luz. Para quantificação dos açúcares redutores liberados durante a reação construiu-se uma curva padrão de glicose versus absorbância. Para a construção da curva de padrão, foi preparada uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL. Partindo dessa solução, foram produzidas outras cinco soluções padrão por meio de novas diluições em tampão citrato 50 mM (pH 4,8), abrangendo na faixa de concentração 2,0; 3,3; 5,0; e 6,7 g.L⁻¹.

3.4.3 Cálculo do volume de coquetel enzimático

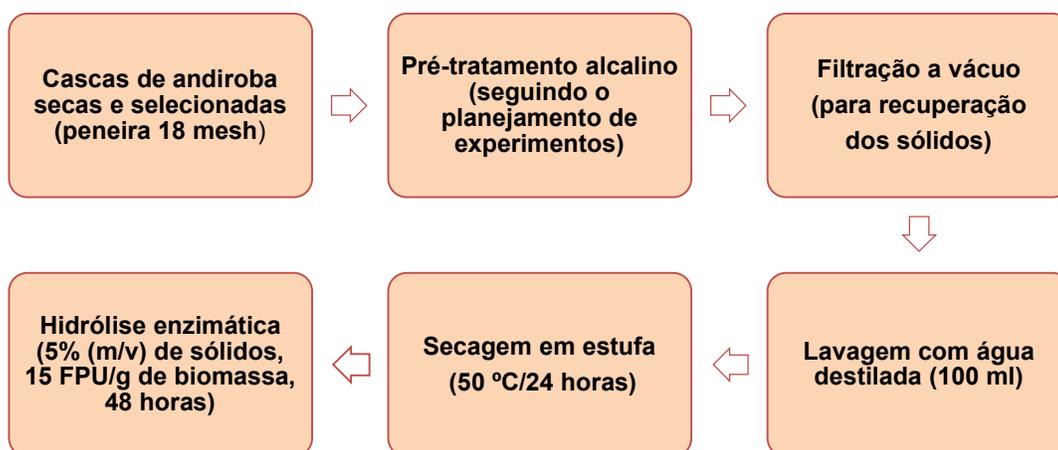
Para as reações de hidrólise envolvendo coquetéis enzimáticos, é necessário especificar a carga enzimática (FPU/g de biomassa seca). Assim, o volume da mistura enzimática foi calculado como mostra a Equação 3.7:

$$V_{coquetel} = \frac{FPU/g\ biomassa * massa_{biomassa} (g)}{FPU/ml_{coquetel}} \quad (3.7)$$

3.4.4 Hidrólise enzimática

Após o pré-tratamento, o material obtido foi submetido à hidrólise enzimática para liberação e quantificação dos açúcares (Figura 3.4). Posteriormente a secagem do resíduo resultante do pré-tratamento dos materiais, a hidrólise enzimática foi realizada, utilizando uma concentração de 5 % (m/v) de sólidos e carga enzimática de 15 FPU/g de biomassa seca. O pH das amostras foi ajustado para 4,8 (pH ótimo) e os erlenmeyers de 250 mL foram fechados e encubados em estufa microbiológica, com agitações periódicas. A temperatura utilizada durante a hidrólise foi de 50 °C, temperatura ótima para a enzima utilizada.

Figura 3.4: Processo de obtenção dos açúcares fermentescíveis.



Após o período de 48 horas, os erlenmeyers contendo o material hidrolisado foram fervidos por 10 minutos para a inativação das enzimas. Posteriormente, este material foi filtrado, o líquido foi coletado e congelado, para a quantificação dos açúcares fermentescíveis, e o sólido foi lavado com água destilada (100 ml) e seco em estufa com circulação de ar, para a determinação do percentual de sólidos recuperados.

A sacarificação foi calculada através da Equação 3.8:

$$\text{Sacarificação (\%)} = \frac{\text{açúcares redutores (g)}}{\text{celulose (g)}} \times 100 \quad (3.8)$$

3.5 CINÉTICA DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Após a determinação das melhores condições para o pré-tratamento alcalino, um ensaio foi realizado com o objetivo de levantar a curva cinética de produção de açúcares redutores, obtidos a partir da biomassa tratada nas condições ótimas.

Para determinar a cinética da hidrólise enzimática, um experimento foi realizado em duplicata, em citrato 0,05 M tampão, pH $5,0 \pm 0,1$. A concentração de sólidos foi 5%. A carga enzimática utilizada correspondeu a 15 FPU, com o experimento sendo desenvolvido a 50 °C, sem agitação, em estufa microbiológica. O tempo de reação foi de 96 horas, e as amostras foram analisadas nos tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

Visando um menor nível de contaminação microbiana esta corrida foi realizada num conjunto de 20 erlenmeyers de 250 ml, e cada par de recipientes correspondiam a um ponto da cinética.

Todos os erlenmeyers seguiram para estufa incubadora DBO. Nos intervalos preestabelecidos dois frascos eram retirados da estufa incubadora, e seguiam para um banho-maria a 100 °C, com o objetivo de inativar as enzimas e parar o processo de sacarificação, após este processo a mistura hidrolisada era filtrada a vácuo, e do líquido coletado uma alíquota de 10 ml era retirada para análise dos açúcares fermentescíveis produzidos. A análise de açúcares (método DNS) foi realizada imediatamente após a etapa de filtração.

3.5.1 Análise dos dados da cinética

Os parâmetros para os modelos cinéticos que descrevem a produção de açúcares redutores a partir da hidrólise enzimática da casca de andiroba (Tabela 3.4) foram estimados através de regressão não-linear no software Origin 8.0.

Tabela 3.4: Modelos empíricos para a cinética da hidrólise da celulose.

Modelo	Equação	Metodologia e parâmetros	Referências
1	$P = C_0(1 - e^{-k*t})$	Modelo cinético empírico de primeira ordem (Suposição de estado quase estacionário). k corresponde a constante de velocidade (tempo ⁻¹).	AIBA <i>et al.</i> (1973)
2	$P = C_0(1 - e^{-k*t^{(1-h)}})$	Modelo de cinética fractal [#] (pseudo primeira ordem - produção de celobiose). k e h são dois parâmetros, chamados de constante de velocidade e expoente fractal, respectivamente.	KOPELMAN (1988) VALJAMAE <i>et al.</i> (2003) WANG e FENG (2010) WANG <i>et al.</i> (2011)
3	$P(t) = a * (1 - e^{-b*t}) + c * (1 - e^{-d*t})$	Modelagem da hidrólise da celulose por celulasas (a, b, c e d são constantes empíricas)	VÄLJAMÄE <i>et al.</i> (1998)

Sendo: P, t e C₀, correspondem a produto, tempo e concentração inicial de substrato, para todas as equações acima.

A análise cinética fractal fornece um novo ponto de vista sobre reação química heterogênea, que acredita que um meio de reação não precisa ser um fractal geométrico para exibir a cinética fractal.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

As sementes foram secas a 50 °C por 48 horas, e então as cascas foram separadas das amêndoas, trituradas e classificadas (Diâmetro de partícula < 1 mm), deste material foi obtida a umidade e a composição percentual (base seca) da Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Composição do material lignocelulósico *in natura*.

Análise	% (*)
Cinzas	1,53 ± 0,28
Extrativos	7,49 ± 0,03
Celulose	36,96 ± 1,00
Lignina	36,02 ± 1,05
Hemicelulose	16,74 ± 0,65

* Resultados expressos base seca através de média ± desvio padrão

O teor de umidade da amostra correspondeu a 9,21 ± 0,08 %, e está dentro do padrão indicado pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL), inferior a 10 %, para garantir a preservação da estrutura da celulose (SLUITER *et al.*, 2016).

Os resultados mostraram que a casca apresenta uma grande quantidade de celulose (36,96 ± 1,00 %), seguido pela lignina (36,02 ± 1,05 %) e pela hemicelulose (16,74 ± 0,65 %). O alto teor de celulose contido na casca indica que o material apresenta grande potencial para a conversão enzimática sendo, portanto, um material com potencial para a produção de furfural, HMF e ácido levulíco, e entre outros produtos químicos base. A lignina e/ou seus componentes resultantes do processo de pré-tratamento alcalino podem ser usados para gerar vários outros produtos, por exemplo, como uma fonte de combustível sólido que pode ser queimada para produzir calor e eletricidade para a biorrefinaria ou distribuída à rede, para uso residencial ou comercial (MODENBACH, 2013). A maioria das biorrefinarias gera lignina em quantidades tão altas que atende às necessidades energéticas desse processo, assim, a conversão de lignina para combustíveis de maior valor e produtos químicos aumentará

significativamente a competitividade geral da biorefinaria. A lignina tem uma maior relação carbono/oxigênio (acima de 2:1) e tem maior densidade de energia do que a celulose, o que a torna uma promissora candidata à produção de combustíveis, e aromáticos (por exemplo, fenol, benzeno, tolueno e xileno) (LASKAR *et al.*, 2013; SCHUTYSER *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019).

Diversos resíduos lignocelulósicos já foram avaliados e possíveis aplicações foram devidamente direcionadas, estes apresentam composição semelhante aos resíduos gerados no processo de extração de óleo de andiroba, como é possível observar no estudo de BURATTI *et al.* (2018), onde foi avaliada a composição química de poda de pessegueiros, visando à otimização da hidrólise enzimática deste material lignocelulósico, e foi obtida uma composição de 31,30 % de celulose, 16,69 % de hemicelulose, 22,70 % de lignina e 12,08 % de extrativos. Para a composição do bagaço de cana-de-açúcar foram encontrados os valores para celulose e lignina, de 36 e 21 %, respectivamente (LI *et al.*, 2019). O bagaço do tronco de palma foi caracterizado por BUKHARI *et al.* (2019), e este material apresentou 30,86 % de celulose, 25,84 % de hemicelulose, 24,29 % de lignina, 2,29 % de cinzas e 9,46 % de umidade.

4.2 ANÁLISE ELEMENTAR

A Tabela 4.2 apresenta o percentual de carbono, hidrogênio e nitrogênio na composição da casca de andiroba. Os valores encontrados são próximos aos determinados por BURATTI *et al.* (2018), para a poda do pessegueiro, que correspondem a, 49,14 % para carbono, 6,85 % para hidrogênio e 0,22 % para o nitrogênio. Para a madeira de eucalipto foram encontrados os valores de carbono, hidrogênio e nitrogênio, de 41,62 % 4,88 % e 0,38 %, respectivamente; e para a casca de pinheiro, o carbono corresponde a 50,12 %, hidrogênio a 6,14 %, e nitrogênio a 0,44 % (LÓPEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2013).

Tabela 4.2: Análise elementar.

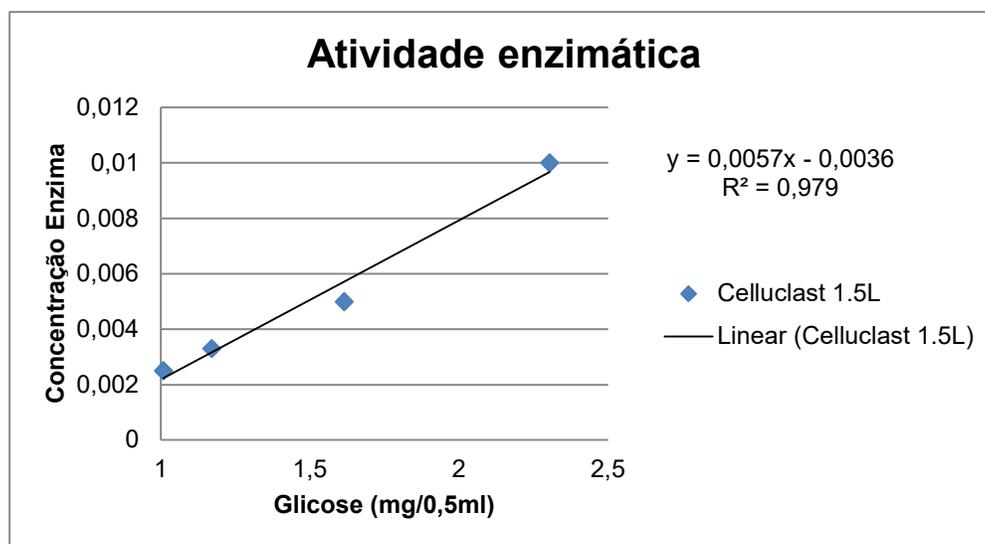
Elementos	% (*)
Carbono	48,64 ± 0,09
Hidrogênio	6,08 ± 0,15
Nitrogênio	0,52 ± 0,03

* Resultados expressos em média ± desvio padrão.

4.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

Neste estudo, utilizou-se a enzima Celluclast 1.5L, e sua atividade foi medida através leitura da absorbância da curva padrão de glicose (DNS), sendo assim foi possível traçar um gráfico linear da concentração de glicose em função da absorbância (Figura 4.1), obtendo uma equação que relaciona as duas grandezas. A partir das leituras das absorbâncias obtidas após hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida através da curva padrão de glicose foi possível determinar a concentração dos ART liberada pela enzima em cada um dos ensaios. Traçou-se uma reta relacionando a concentração da enzima em cada uma das diluições em função da massa de glicose liberada por 0,5 mL dessa enzima diluída, determinando-se a atividade enzimática. O termo "concentração" é utilizado para representar a proporção da solução enzimática original presente na diluição adicionada à mistura de ensaio.

Figura 4.1: Determinação da atividade enzimática para a enzima Celluclast 1.5L.



Para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de 2,0 mg de glicose, ou seja, 2,0/0,18016 μmol de 50 mg de papel de filtro por 0,5 mL de enzima diluída em 60 minutos de reação. Neste experimento, a atividade da enzima foi determinada como aproximadamente 47,0 FPU/ml. SRITRAKUL *et al.* (2017), ao avaliar o pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar, encontrou um valor de atividade enzimática para Celluclast 1.5 L, de 58 FPU/ml. ZULKEFLI *et al.* (2017) e MUSSATTO *et al.* (2008), determinaram a atividade enzimática para este coquetel, e encontraram os valores de 53 e 74 FPU/ml, respectivamente. Com o valor

obtido da atividade do complexo enzimático, foi possível calcular o volume necessário de coquetel enzimático a ser adicionado nos experimentos de hidrólise.

4.4 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL

No presente trabalho, a relação entre a Sacarificação (%), os Sólidos Recuperados (%) e as três variáveis de processo (tempo de reação, concentração de NaOH e temperatura) foi desenvolvida por metodologia de superfície de resposta. Os resultados em cada ponto baseados no modelo experimental de Box-Behnken são apresentados na Tabela 4.3, assim como os valores experimentais de Sacarificação (%) e Sólidos Recuperados (%). O software Statistica 7.0 foi empregado para determinar e avaliar os coeficientes da equação modelo de regressão adquirida, a tabela Anova (análise de variância) e a avaliar a desejabilidade global.

Para avaliar a eficiência do pré-tratamento alcalino na casca de andiroba, os sólidos pré-tratados resultantes foram hidrolisados enzimaticamente em condições idênticas. No geral, os maiores valores das variáveis do pré-tratamento favoreceram a digestibilidade enzimática da biomassa.

Tabela 4.3: Variáveis estudadas na matriz experimental de Box-Behnken e resultados para a variável resposta.

Ensaio	Variáveis independentes			Variável resposta	
	Tempo de reação (min)	NaOH (%)	Temperatura (°C)	Sacarificação (%)	Sólidos Recuperados (%)
1	20	2	90	17,88 ± 0,08	74,62 ± 0,22
2	100	2	90	25,33 ± 0,07	67,71 ± 0,46
3	20	4	90	23,47 ± 0,09	70,64 ± 0,50
4	100	4	90	32,12 ± 0,10	65,57 ± 0,60
5	20	3	60	11,50 ± 0,08	80,55 ± 0,76
6	100	3	60	11,51 ± 0,06	77,78 ± 0,76
7	20	3	120	32,12 ± 0,09	64,98 ± 0,84
8	100	3	120	46,09 ± 0,09	62,60 ± 0,05
9	60	2	120	22,78 ± 0,10	68,34 ± 0,30
10	60	2	60	9,91 ± 0,11	81,52 ± 0,41
11	60	4	120	39,70 ± 0,15	61,91 ± 1,10
12	60	4	60	12,89 ± 0,06	76,79 ± 0,71
13	60	3	90	25,47 ± 0,10	69,88 ± 0,57
14	60	3	90	25,45 ± 0,08	69,70 ± 0,18
15	60	3	90	24,14 ± 0,09	70,29 ± 0,74

De acordo com a Tabela 4.3, três experimentos (ensaios 13 a 15) foram realizados nas condições do ponto central, para verificar qualquer alteração no procedimento de estimativa.

Em cada experimento a quantidade de sólidos recuperados foi determinada e os resultados variaram de 61,90% a 81,52%, os menores valores foram associados a maiores valores de temperatura, nas condições do pré-tratamento. BURATTI *et al.* (2018) desenvolveu estudo sobre pré-tratamento alcalino de material lignocelulósico, para isso uma variação da concentração de NaOH foi realizada, e como resultado da avaliação da recuperação de sólidos, observou-se que maiores valores de concentração de NaOH são acompanhados por menores valores de recuperação de sólidos, fato que foi atribuído a uma degradação da hemicelulose e uma remoção parcial da lignina. O pré-tratamento com hidróxido de sódio resulta em várias modificações estruturais na lignocelulose, benéficas para a hidrólise enzimática. Ligações entre a barreira protetora de lignina com hemicelulose são quebradas. Dependendo das condições de pré-tratamento, a lignina é parcialmente ou totalmente solubilizada, e a degradação da fração hemicelulósica pode ocorrer, pois a hemicelulose possui estrutura amorfa, heterogênea e ramificada com pouca resistência, o que a torna mais suscetível à solubilização do que a celulose em condições alcalinas (MODENBACH, 2013; XU e CHENG, 2011). Os ensaios 8 e 11, apresentaram menor recuperação de sólidos, e associados a esses, observa-se maiores rendimentos de sacarificação, obtidos após hidrólise enzimática, fato que corrobora com a teoria da acessibilidade da fração celulósica às celulasas, devido a remoção das estruturas de proteção do material vegetal.

Assim, os piores desempenhos da hidrólise enzimática foram determinados na corrida 10 (60 min, 2% e 60°C), com aproximadamente 9,91 % de sacarificação, e na corrida 5 (20 min, 3% e 60°C) com 11,50 %, sugerindo que as condições de pré-tratamento não foram suficientes para tornar a celulose acessível para as enzimas. As soluções com maior concentração de açúcares redutores foram obtidas nos ensaios 8 e 11, com 46,09 e 39,70 %, respectivamente, ambas os ensaios foram realizadas na temperatura de 120°C.

4.4.1 Anova e coeficientes de regressão (sacarificação)

Após a obtenção dos resultados previstos foi possível efetuar uma análise de variância e, dessa forma, construir a tabela Anova para a Sacarificação. Nesta são apresentadas as somas quadráticas (SQ), os graus de liberdade (GL), as médias quadráticas e valores de F e p. A situação desejável é que a média quadrática da regressão (MQR) seja muito maior que a média quadrática dos resíduos (MQres). Idealmente, a razão entre MQR e MQres deve ser alta para afirmar que o modelo calculado possui uma adequada condição estatística, permitindo a sua utilização para previsões. O cálculo desta razão representa a variância do modelo, em que os valores de F calculado e F tabelado são comparados. Outro teste F analisado é proveniente da comparação das médias quadráticas da falta de ajuste (MQfaj) e do erro puro (MQep), e neste caso valores altos de MQfaj/MQep significarão muita falta de ajuste, e vice-versa.

Em uma primeira análise para a variável resposta Sacarificação (%), o valor de F calculado para a razão MQR/MQres fornece um valor de 20,80, que é superior ao $F_{9(GL, regressão), 5(GL, resíduos)}$ tabelado de 4,77. No entanto o modelo apresenta falta de ajuste, o que pode ser observado através das MQfaj e MQep apresentadas na Tabela 4.4, onde p-valor < 0,05.

Tabela 4.4: Análise de variância (sacarificação).

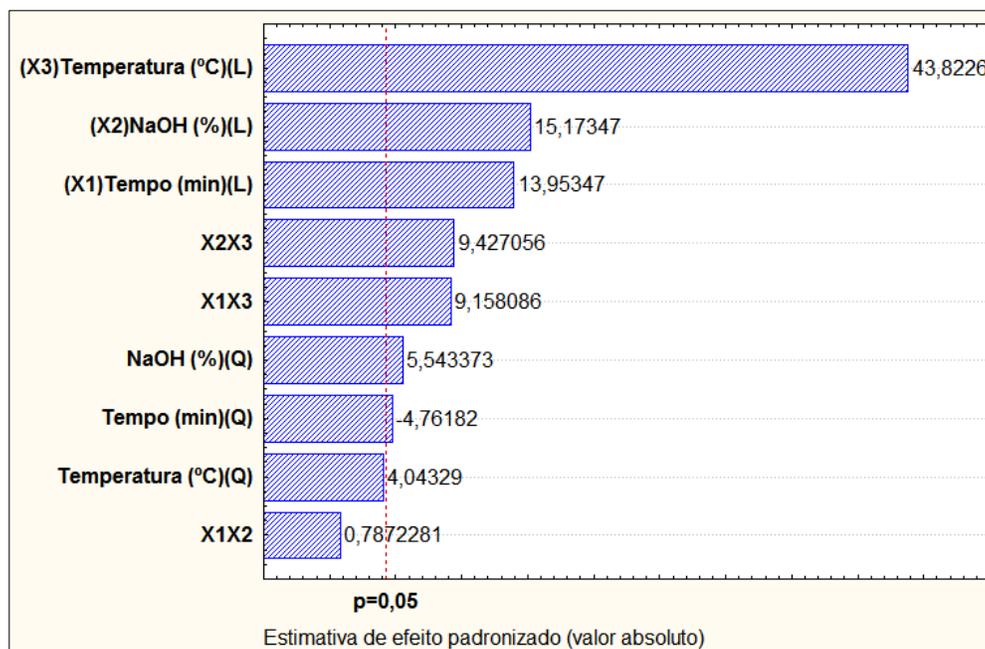
Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	p
(X ₁) Tempo (min) (L)	113,101	1	113,101	194,699	0,005097
Tempo (min) (Q)	13,172	1	13,172	22,675	0,041383
(X ₂) NaOH (%) (L)	133,743	1	133,743	230,234	0,004315
NaOH (%) (Q)	17,850	1	17,850	30,729	0,031036
(X ₃) Temperatura (°C) (L)	1115,573	1	1115,573	1920,421	0,000520
Temperatura (°C) (Q)	9,497	1	9,497	16,348	0,056073
X ₁ X ₂	0,360	1	0,360	0,620	0,513624
X ₁ X ₃	48,720	1	48,720	83,871	0,011714
X ₂ X ₃	51,624	1	51,624	88,869	0,011066
Falta de ajuste	40,183	3	13,394	23,058	0,041853
Erro puro	1,162	2	0,581		
Total	1547,384	14			

X₁, X₂ e X₃, correspondem a: tempo de reação (min), NaOH (%) e temperatura (°C), respectivamente; (L): linear; (Q): quadrático.

Através do gráfico de Pareto, apresentado na Figura 4.2, é possível realizar uma comparação visual entre os efeitos gerados pelas variáveis independentes. As variáveis com significância estatística são apresentadas como aquelas que chegam ao lado direito do gráfico. As colunas representam a magnitude dos efeitos.

A eficiência de diferentes fatores operacionais na sacarificação da casca de andiroba ocorreu na seguinte ordem, a temperatura da reação > concentração de hidróxido de sódio > tempo de reação. Apenas o efeito quadrático da temperatura e a interação X_1X_2 não apresentam efeito estatisticamente significativo.

Figura 4.2: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados.



Os efeitos podem ser observados através da Tabela 4.5. Como os efeitos da interação X_1X_2 (Tempo e Concentração de NaOH) e quadrático da temperatura não são significativos, é possível recalculer o modelo utilizando apenas os coeficientes válidos, aqueles considerados estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.5: Estimativa dos efeitos (sacarificação).

Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p	-95,00%	95,00%
Média	23,74417	0,220019	107,919	<0,0001	22,7975	24,6908
(X ₁) Tempo (min) (L)	7,52	0,538934	13,9535	0,0051	5,20115	9,83885
Tempo (min) (Q)	-1,88875	0,396645	-4,7618	0,04138	-3,5954	-0,1821
(X ₂) NaOH (%) (L)	8,1775	0,538934	15,1735	0,00432	5,85865	10,4964
NaOH (%) (Q)	2,19875	0,396645	5,5434	0,03104	0,49213	3,90537
(X ₃) Temperatura (°C) (L)	23,6175	0,538934	43,8226	0,00052	21,2987	25,9364
Temperatura (°C) (Q)	1,60375	0,396645	4,0433	0,05607	-0,1029	3,31037
X ₁ X ₂	0,6	0,762168	0,7872	0,51362	-2,6793	3,87934
X ₁ X ₃	6,98	0,762168	9,1581	0,01171	3,70066	10,2593
X ₂ X ₃	7,185	0,762168	9,4271	0,01107	3,90566	10,4643

Após recalculer o modelo utilizando apenas os coeficientes válidos, foram obtidos os dados da Anova (Tabela 4.6). Observa-se através desta tabela que o valor de F calculado (MQR/MQres) foi da ordem de 16,79. O valor de $F_{7,7}$ tabelado corresponde a 3,79 com 95% de confiança e a razão entre o valor calculado e o tabelado é de 4,43. É possível concluir que o modelo calculado apresenta uma boa regressão, e não apresenta falta de ajuste (p-valor > 0,05), pois os valores de MQfaj e MQep se confundem estatisticamente (F calculado < F tabelado). Assim, pode-se concluir que o modelo previsto é válido e confiável em um intervalo de confiança de 95 %.

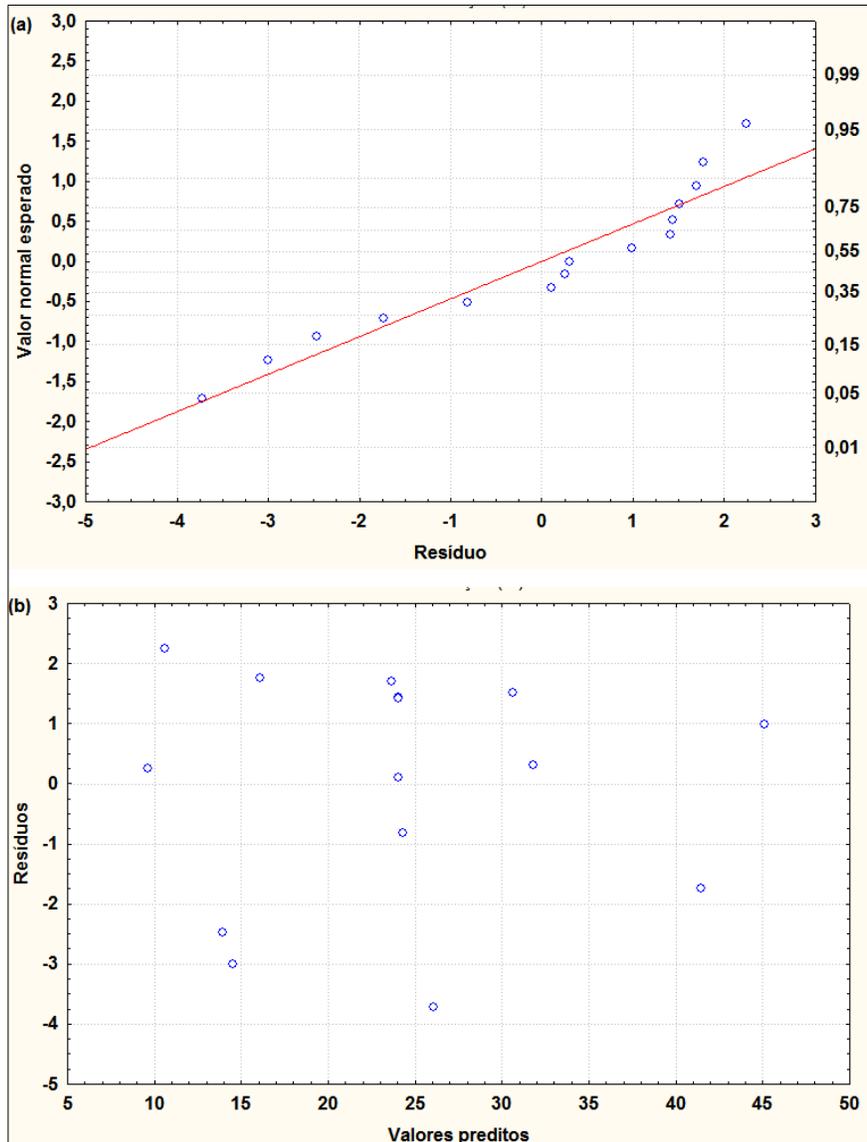
Tabela 4.6: Análise de variância (sacarificação - recalculado).

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	p
(1) Tempo (min) (L)	113,101	1	113,101	194,699	0,005097
Tempo (min) (Q)	15,038	1	15,038	25,887	0,036526
(2) NaOH (%) (L)	133,743	1	133,743	230,234	0,004315
NaOH (%) (Q)	15,998	1	15,998	27,540	0,034445
(3) Temperatura (°C) (L)	1115,573	1	1115,573	1920,421	0,000520
X ₁ X ₃	48,720	1	48,720	83,871	0,011714
X ₂ X ₃	51,624	1	51,624	88,869	0,011066
Falta de ajuste	50,039	5	10,008	17,228	0,055765
Erro puro	1,162	2	0,581		
Total	1547,384	14			

Na Figura 4.3 (a) é possível observar a distribuição normal dos resíduos para sacarificação, neste caso a variância também pode ser considerada constante. A Figura 4.3 (b) apresenta os valores previstos versus os resíduos, sendo estes distribuídos

aleatoriamente e próximos do zero, confirmando a adequação do modelo apontada pela tabela Anova.

Figura 4.3: (a) Gráfico normal dos resíduos e (b) Valores previstos *versus* resíduo.



A Tabela 4.7, apresenta os coeficientes para as variáveis significativas na análise da variável resposta sacarificação.

Tabela 4.7: Estimativa dos coeficientes (sacarificação – recalculado).

Fator	Coefficiente	Desvio padrão	-95,00%	+95,00%
Média	23,99090	0,211387	23,08137	24,90042
(X1) Tempo (min) (L)	3,76000	0,269467	2,60058	4,91942
Tempo (min) (Q)	-1,00606	0,197735	-1,85684	-0,15527
(X2) NaOH (%) (L)	4,08875	0,269467	2,92933	5,24817
NaOH (%) (Q)	1,03769	0,197735	0,18691	1,88848
(X3) Temperatura (°C) (L)	11,80875	0,269467	10,64933	12,96817
X1X3	3,49000	0,381084	1,85033	5,12967
X2X3	3,59250	0,381084	1,95283	5,23217

O modelo polinomial desenvolvido para a otimização da produção de açúcar fermentescível através da variável Sacarificação (%) é apresentado na Equação 4.1, e relaciona a Sacarificação (%) com o tempo, a concentração de NaOH e a temperatura. O valor de R² foi de aproximadamente 96,69% e R²_{ajustado} correspondeu a 93,38, o que indica que o modelo quadrático representa bem a relação entre os efeitos e a resposta. O coeficiente de correlação (R²) reparametrizado foi satisfatório indicando que o modelo é adequado para representar a relação entre as variáveis independentes e a variável resposta. A equação reparametrizada torna-se mais simples, mas sem perder qualidade no modelo matemático.

$$\text{Sacarificação} = 23,9909 + 3,7600X_1 - 1,0060X_1^2 + 4,0887X_2 + 1,0377X_2^2 + 11,8087X_3 + 3,4900X_1X_3 + 3,5925X_2X_3 \quad (4.1)$$

Esta equação pode ser utilizada para prever a conversão de celulose em açúcares redutores através da sacarificação. Além de explicar os efeitos lineares e quadráticos e as interações do tempo, da concentração de NaOH e da temperatura, sobre a produção de açúcares fermentescíveis.

A eficiência de diferentes fatores operacionais na sacarificação da casca de andiroba ocorreu na seguinte ordem, a temperatura da reação > concentração de hidróxido de sódio > tempo de reação.

4.4.2 Anova e coeficientes de regressão (sólidos recuperados)

Para o caso da análise da resposta correspondente a Sólidos Recuperados (%), o valor de F foi da ordem de 30,29. O valor de $F_{9,5}$ tabelado com é 4,77 com 95% de confiança, e a razão entre o valor calculado e o tabelado é de 6,35. O modelo calculado apresenta uma boa regressão, porém é a tabela Anova (Tabela 4.8) indica falta de ajuste.

Tabela 4.8: Análise de variância (sólidos recuperados).

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	p
(X1) Time (min) (L)	36,6689	1	36,6689	407,161	0,002447
Time (min) (Q)	0,8771	1	0,8771	9,739	0,089160
(X2) NaOH (%) (L)	37,3071	1	37,3071	414,247	0,002405
NaOH (%) (Q)	0,1088	1	0,1088	1,208	0,386344
(X3) Temperatura (°C) (L)	432,3652	1	432,3652	4800,854	0,000208
Temperatura (°C) (Q)	14,9438	1	14,9438	165,931	0,005973
X1X2	0,8492	1	0,8492	9,429	0,091703
X1X3	0,0391	1	0,0391	0,435	0,577476
X2X3	0,7258	1	0,7258	8,059	0,104914
Falta de ajuste	9,8890	3	3,2963	36,601	0,026712
Erro puro	0,1801	2	0,0901		
Total	534,5145	14			

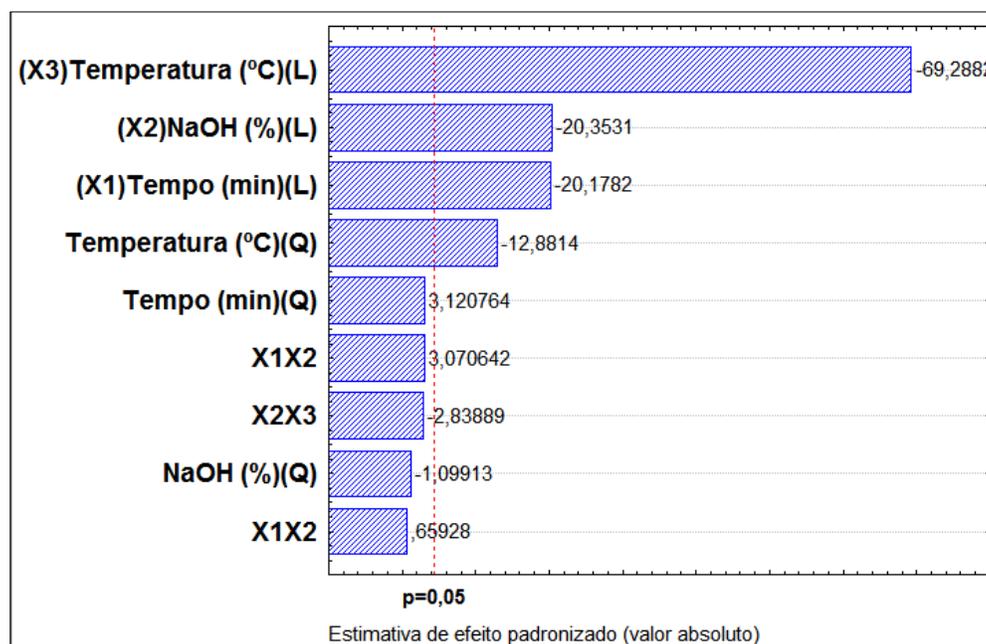
Os efeitos para a análise do processo em relação a variável sólidos recuperados podem ser observados através da Tabela 4.9. Os efeitos quadráticos do tempo e da concentração de NaOH, e de todas as interações não são significativos, assim é possível recalculer o modelo utilizando apenas os coeficientes válidos, aqueles considerados estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4.9: Estimativa dos efeitos (sólidos recuperados).

Fator	Efeito	Desvio padrão	t (2)	p	-95,00%	95,00%
Média	71,0872	0,086631	820,5709	0,000001	70,7145	71,4600
(X ₁) Tempo (min) (L)	-4,2819	0,212203	-20,1782	0,002447	-5,1949	-3,3688
Tempo (min) (Q)	0,4874	0,156177	3,1208	0,089160	-0,1846	1,1594
(X ₂) NaOH (%) (L)	-4,3190	0,212203	-20,3531	0,002405	-5,2320	-3,4059
NaOH (%) (Q)	-0,1717	0,156177	-1,0991	0,386344	-0,8436	0,5003
(X ₃) Temperatura (°C) (L)	-14,7032	0,212203	-69,2882	0,000208	-15,6162	-13,7901
Temperatura (°C) (Q)	-2,0118	0,156177	-12,8814	0,005973	-2,6838	-1,3398
X ₁ X ₂	0,9215	0,300100	3,0706	0,091703	-0,3697	2,2127
X ₁ X ₃	0,1979	0,300100	0,6593	0,577476	-1,0934	1,4891
X ₂ X ₃	-0,8519	0,300100	-2,8389	0,104914	-2,1432	0,4393

A ordem de influência dos fatores operacionais na recuperação de sólidos no processo de pré-tratamento alcalino da casca de andiroba, é apresentada na Figura 4.4, e esta ocorreu da seguinte forma: temperatura da reação > concentração de hidróxido de sódio > tempo de reação, neste caso os efeitos são negativos, ou seja, valores maiores dessas variáveis promovem maior retirada de massa, e conseqüentemente tornam mais suscetível a porção de celulose, que a mais interna entra as três frações componentes, celulose, hemicelulose e lignina.

Figura 4.4: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados.



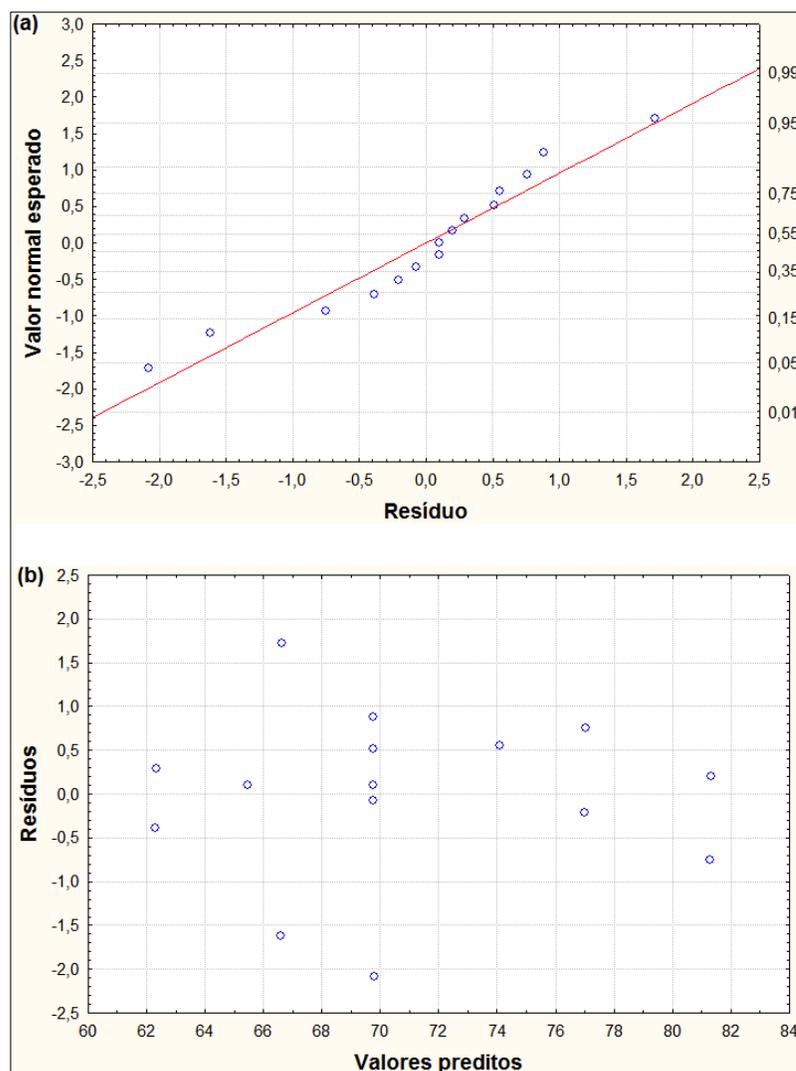
Utilizando apenas os coeficientes válidos, foram obtidos os dados da Anova (Tabela 4.10). Observa-se através desta tabela que o valor de F calculado (MQR/MQres) foi da ordem de 23,97. O valor de $F_{4,10}$ tabelado corresponde a 3,48 com 95% de confiança e a razão entre o valor calculado e o tabelado é de 6,88. É possível concluir que o modelo calculado apresenta uma boa regressão, e não apresenta falta de ajuste (p-valor > 0,05), pois os valores de MQfaj e MQep se confundem estatisticamente (F calculado < F tabelado).

Tabela 4.10: Análise de variância (sólidos recuperados - recalculado)

Fonte da variação	SQ	GL	MQ	F	p
(X ₁) Tempo (min) (L)	36,6689	1	36,6689	407,161	0,002447
(X ₂) NaOH (%) (L)	37,3071	1	37,3071	414,247	0,002405
(X ₃) Temperatura (°C) (L)	432,3652	1	432,3652	4800,854	0,000208
Temperatura (°C) (Q)	15,4505	1	15,4505	171,558	0,005778
Falta de ajuste	12,5427	8	1,5678	17,409	0,055438
Erro puro	0,1801	2	0,0901		
Total	534,5145	14			

Na Figura 4.5 (a) é possível observar a distribuição normal dos resíduos para sólidos recuperados, neste caso a variância pode ser considerada constante. A Figura 4.5 (b) apresenta os valores previstos versus os resíduos, sendo estes distribuídos aleatoriamente.

Figura 4.5: (a) Gráfico normal dos resíduos e (b) Valores previstos versus resíduo.



A Tabela 4.11, apresenta os coeficientes para as variáveis significativas na análise da variável resposta sólidos recuperados.

Tabela 4.11: Estimativa dos coeficientes (sólidos recuperados).

Fator	Coefficiente	Desvio padrão	-95,00%	+95,00%
Mean/Interc.	71,13234	0,080205	70,78724	71,47743
(X ₁) Tempo (min) (L)	-2,14094	0,106101	-2,59745	-1,68442
(X ₂) NaOH (%) (L)	-2,15949	0,106101	-2,61600	-1,70297
(X ₃) Temperatura (°C) (L)	-7,35158	0,106101	-7,80809	-6,89506
Temperatura (Q)	-1,01717	0,077658	-1,35130	-0,68303

O modelo polinomial foi desenvolvido para avaliar a recuperação de sólidos (%) e é apresentado na Equação 4.2, relacionando esta com as variáveis independentes: tempo, a concentração de NaOH e a temperatura.

O valor de R^2 foi de aproximadamente 97,62% e R^2_{ajustado} correspondeu a 96,66, o que indica que o modelo quadrático representa bem a relação entre os efeitos e a resposta.

$$\begin{aligned} \text{Sólidos Recuperados} = & 71,1323 - 3,7600X_1 - 1,0060X_1^2 + 4,0887X_2 + 1,0377X_2^2 + \\ & 11,8087X_3 + 3,4900X_1X_3 + 3,5925X_2X_3 \end{aligned} \quad (4.2)$$

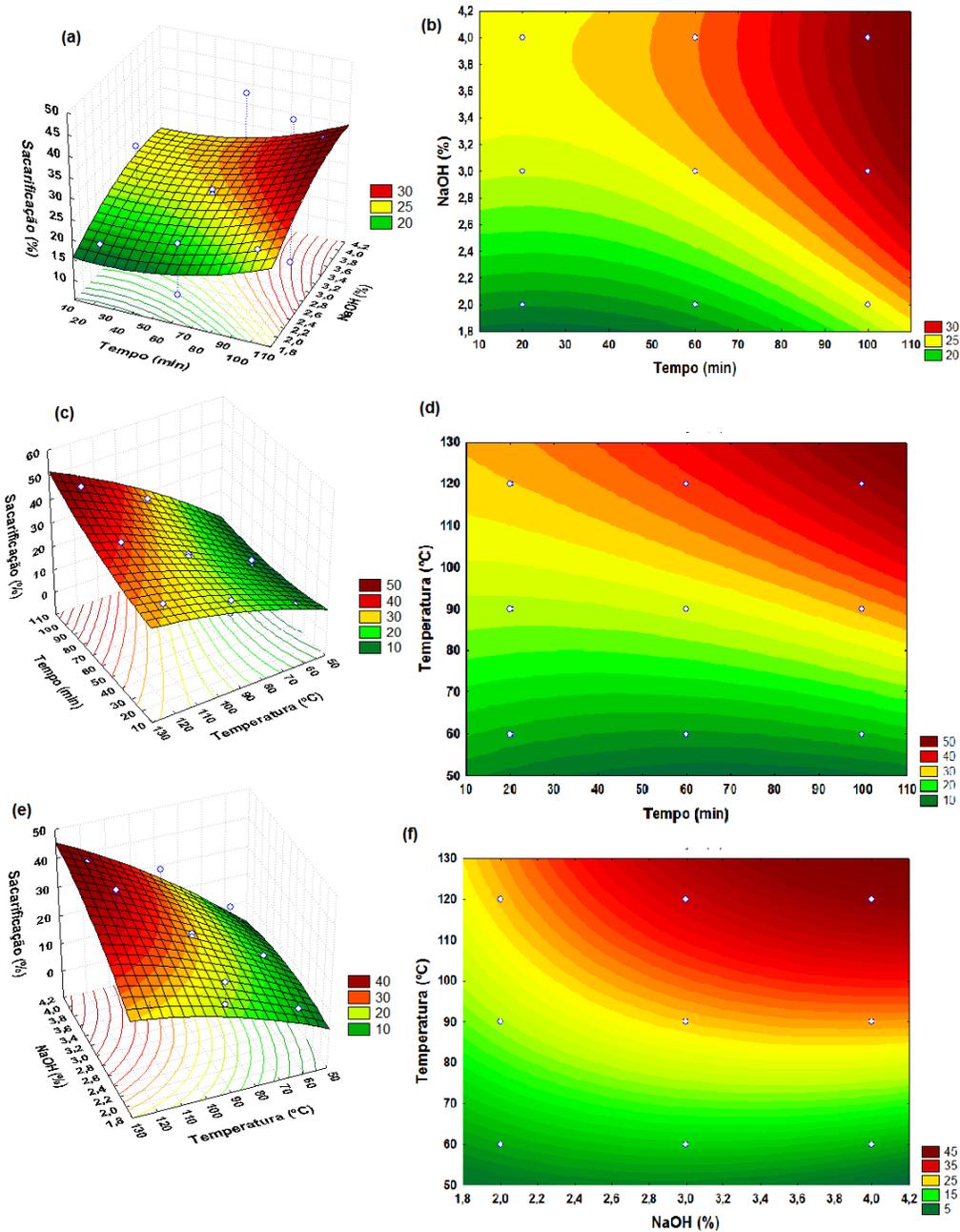
Esta equação pode ser utilizada para prever e explicar a recuperação de sólidos no processo de pré-tratamento alcalino da casca de andiroba.

A eficiência de diferentes fatores operacionais na recuperação de sólidos no pré-tratamento realizado na casca de andiroba ocorreu na seguinte ordem, a temperatura da reação > concentração de hidróxido de sódio > tempo de reação.

4.4.3 Análise das superfícies de resposta e contornos

Os resultados experimentais foram visualizados em gráficos de superfície tridimensional de resposta indicando a correlação entre duas variáveis com uma variável sendo mantida constante em sua condição ideal, conforme Figura 4.6 e 4.7.

Figura 4.6: Superfície de resposta (sacarificação).



(a), (c) e (e), correspondem às superfícies de resposta para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , e X_2 e X_3 , respectivamente; e (b), (d) e (f), correspondem às curvas de contorno para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , e X_2 e X_3 , respectivamente.

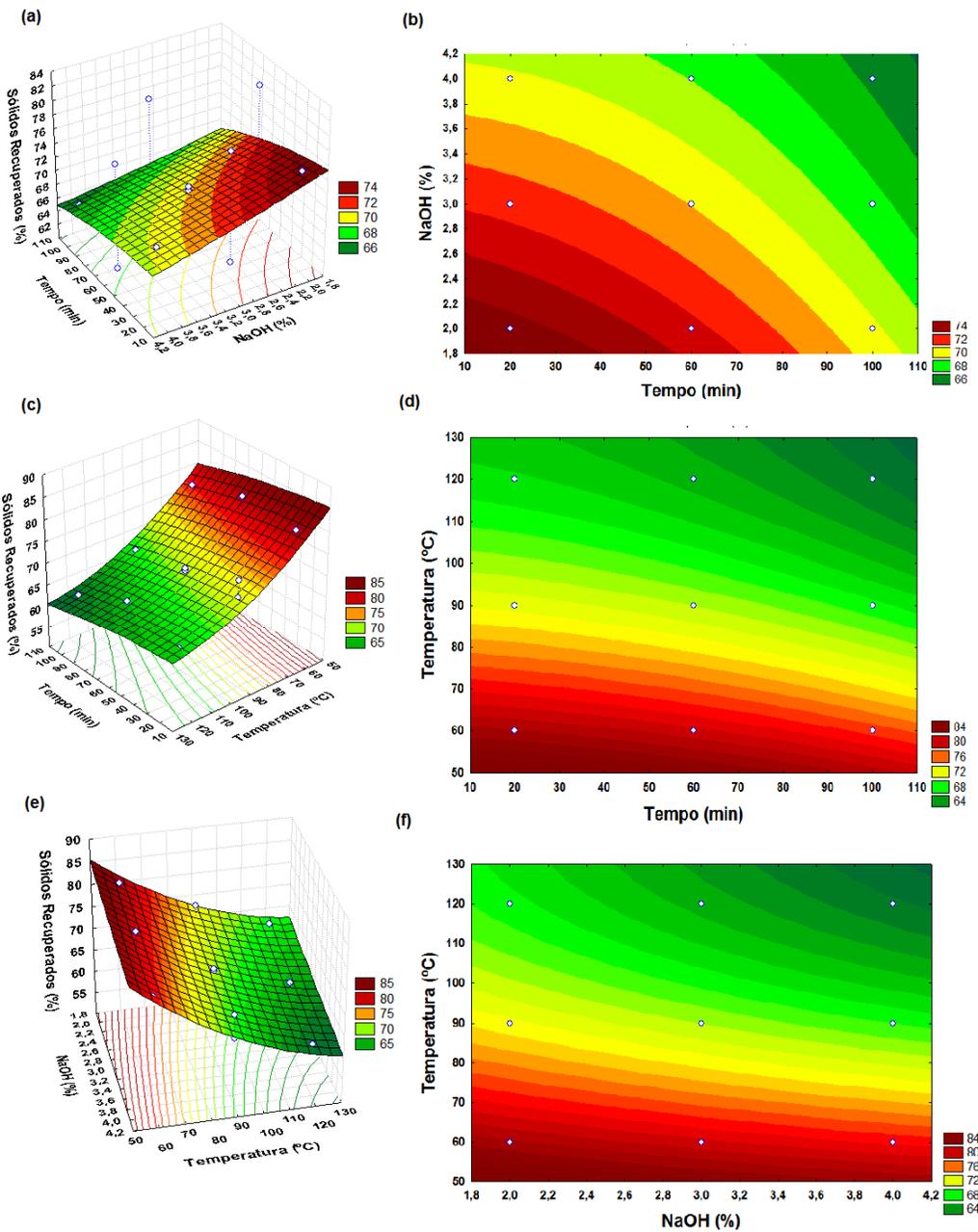
Através das Figuras 4.6 (a) e 4.6 (b), observou-se que para alcançar a região de maior sacarificação, um tempo de reação superior a 90 min é necessário, mesmo em faixas de concentração de NaOH no nível intermediário (3%). A partir das Figuras 4.6 (b) e 4.6 (d), o efeito da temperatura fica evidente, a variável independente de maior

efeito sobre a variável resposta deste estudo, melhora a eficiência do pré-tratamento em seu nível mais alto (120 °C), esta faixa de maior sacarificação é observada principalmente entre os tempos de reação de 60 e 100 min. Dados da literatura confirmam a importância da temperatura durante o pré-tratamento alcalino; valores entre 100 e 120 °C, correlacionados com diferentes concentrações e tempos de reação, de uma forma geral, conduzem a maiores concentrações e rendimentos de açúcares redutores (KIM *et al.*, 2016; BURATTI *et al.*, 2018; QING e WYMAN, 2011).

Nas Figuras 4.6 (e) e 4.6 (f), são apresentadas a superfície resposta e as correspondentes curvas de níveis ou contornos que foram geradas a partir dos modelos propostos, sendo que estes gráficos correspondem a superfície formada pela interação das variáveis X_2 (% NaOH) e X_3 (% NaOH), com a variável $X_1 = 60$ min. A região de maior conversão de celulose em açúcares redutores está relacionada com valores de concentração da solução de NaOH entre 3 e 4%. Como a temperatura tem maior influência no processo, os maiores valores de sacarificação só são produzidos em maiores valores de temperatura. Em geral, o pré-tratamento alcalino da biomassa é altamente eficaz para a remoção de hemicelulose e lignina, mas o resultado depende da concentração do catalisador (KANG *et al.*, 2013).

A importância de avaliar a forma como a temperatura influencia no processo de sacarificação consiste em determinar em que valores, esta pode exercer efeito negativo sobre a resposta. Valores mais altos de temperatura de pré-tratamento podem causar aumento de teor de lignina Klason, e conseqüentemente redução no rendimento do processo de hidrólise enzimática, fato que está associado à recondensação da lignina, o que acaba em uma menor acessibilidade para a enzima (KIM e HAN, 2012; TYE *et al.*, 2017). A elevação da temperatura de 100 °C para 120 °C, independentemente da concentração alcalina, pode aumentar o teor de α -celulose. No entanto, quando a fibra foi pré-tratada a 140 °C, o teor de celulose foi menor, enquanto o de γ -celulose foi maior. Este achado indicou que parte da α -celulose foi degradada em β -celulose, ou diretamente dissolvido no licor esgotado (TYE *et al.*, 2013).

Figura 4.7: Superfície de resposta (sólidos recuperados).



(a), (c) e (e), correspondem às superfícies de resposta para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , e X_2 e X_3 , respectivamente; e (b), (d) e (f) correspondem às curvas de contorno para X_1 e X_2 , X_1 e X_3 , e X_2 e X_3 , respectivamente.

É importante avaliar a quantidade de sólidos recuperados após o pré-tratamento, pois se pode quantificar a quantidade total de biomassa que pode eventualmente ser convertida em açúcares via hidrólise enzimática (ZHANG, 2012).

No geral, 61,90% a 81,51% de sólidos foram recuperados quando as cascas de andiroba foram pré-tratadas com NaOH, dependendo da intensidade do pré-tratamento.

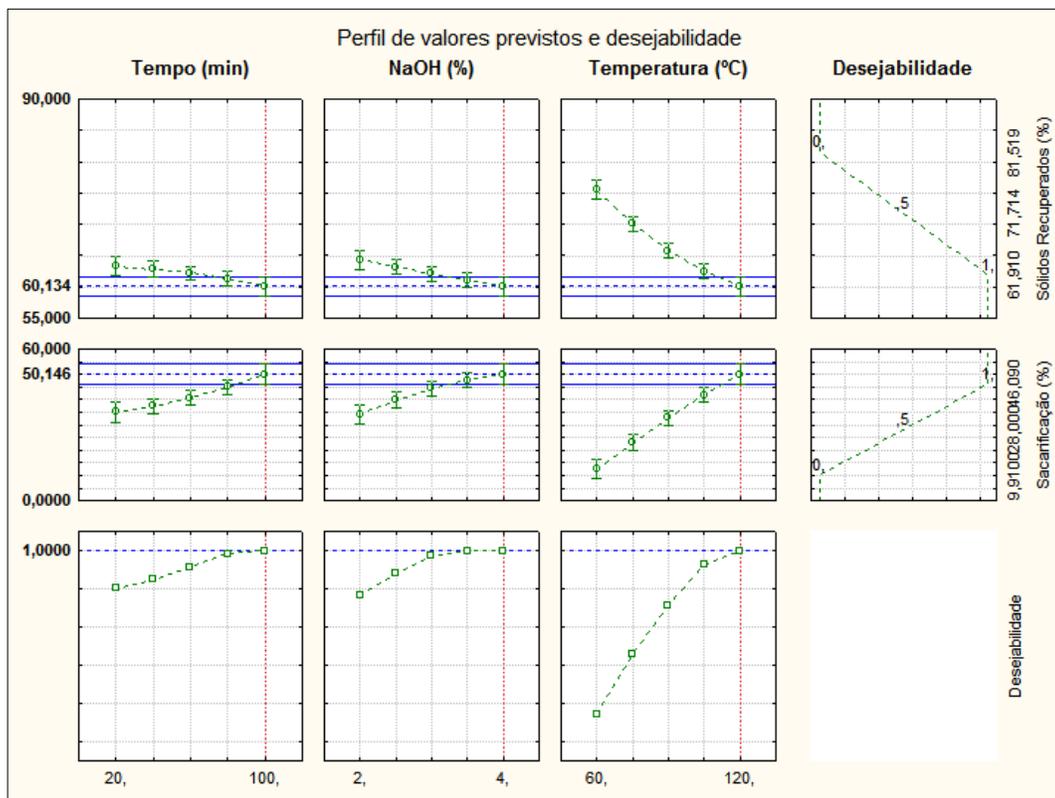
Através de avaliação dos resultados observa-se que menores valores de recuperação de sólidos estão diretamente relacionados à maiores valores de sacarificação, este fato pode estar relacionado ao principal efeito do pré-tratamento alcalino em materiais lignocelulósicos que é a redução da lignina na biomassa (CHANG e HOLTZAPPLE, 2000).

De acordo com as Figuras 4.7 (a) e 4.7 (b), as maiores perdas de sólidos ou menores recuperações de sólidos são observadas em faixas de concentração de NaOH acima de 3%, apenas quando combinadas com maiores tempos de reação. Nas Figuras 4.7 (c) e 4.7 (d), é possível comprovar a importância da temperatura no pré-tratamento, visto que essa foi a única variável independente que tem os efeitos lineares e quadráticos apontados como estatisticamente significativos na análise dos efeitos. Fato também comprovado através das Figuras 4.7 (e) e 4.7 (f), pois em uma faixa ampla de concentração de NaOH é possível observar menor recuperação de sólidos, mas só quando estas estão associadas a maiores valores de temperatura.

4.4.4 Desejabilidade global

Através dos gráficos da resposta prevista pelo modelo e os perfis de desejabilidade global (Figura 4.8) pode-se observar como as mudanças nos níveis de cada variável independente influenciam em cada variável resposta e na desejabilidade global, respectivamente.

Figura 4.8: Perfil de valores previsto e desejabilidade.



Perfis das respostas previstas pelo modelo (1ª linha, sólidos recuperados, e 2ª linha, sacarificação) e perfis de desejabilidade global (3ª linha) em função das variáveis independentes (cada uma das colunas, respectivamente).

Considerando a maximização da produção de açúcares redutores, situação que está diretamente relacionada a menores recuperações de sólidos, como critério de otimização, o modelo mostra que os melhores resultados estariam localizados a 120°C, 4% (m/v) de NaOH, e tempo de 100 min, para a carga de sólidos de 5%.

As melhores condições para o pré-tratamento alcalino, visando a maximização da sacarificação da casca da andiroba, ocorrem em condições que o planejamento experimental do tipo Box-Behnken não foi capaz de testar. Nesse sentido, realizou-se um experimento extra para avaliar essas condições e confirmou-se o que o modelo previu.

A sacarificação da matéria-prima *in natura* e da amostra tratada nas melhores condições definidas neste estudo foram comparadas em condições idênticas de hidrólise enzimática (concentração de sólidos de 5%, carga enzimática de 15 FPU/g de celulose e tempo de 48 h) e o resultado variou de $4,14 \pm 0,05\%$ (matéria-prima *in natura*) para $47,89 \pm 0,82\%$ (amostra tratada). O pré-tratamento foi decisivo para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática.

KIM e HAN (2012) avaliaram o pré-tratamento alcalino para melhorar o rendimento de glicose da palha de arroz, e obtiveram como condições ótimas a concentração de NaOH de 2,96%, temperatura de reação de 81,8 °C e tempo de pré-tratamento de 56,7 min. TYE *et al.* (2017), em seu estudo sobre rendimento total de glicose como resposta única na otimização de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática da fibra de *Elaeis guineensis*, avaliou o pré-tratamento alcalino, e observou que maiores rendimentos de sacarificação foram obtidos na combinação das variáveis temperatura, tempo e concentração de NaOH, de 120 °C, 45 min e solução de NaOH 3% (v/v), respectivamente. O que indica que o material lignocelulósico avaliado neste estudo apresenta comportamento semelhante aos materiais citados nas literaturas quanto ao pré-tratamento por solução alcalina.

4.5 COMPOSIÇÃO DO MATERIAL LIGNOCELULÓSICO TRATADO

A composição percentual em base seca do material lignocelulósico tratado nas condições ótimas, é apresentada na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Composição do material lignocelulósico tratado.

Análise	% *
Celulose	54,77 ± 0,67
Lignina	23,52 ± 0,12
Hemicelulose	12,38 ± 0,34

* Resultados expressos através de média ± desvio padrão

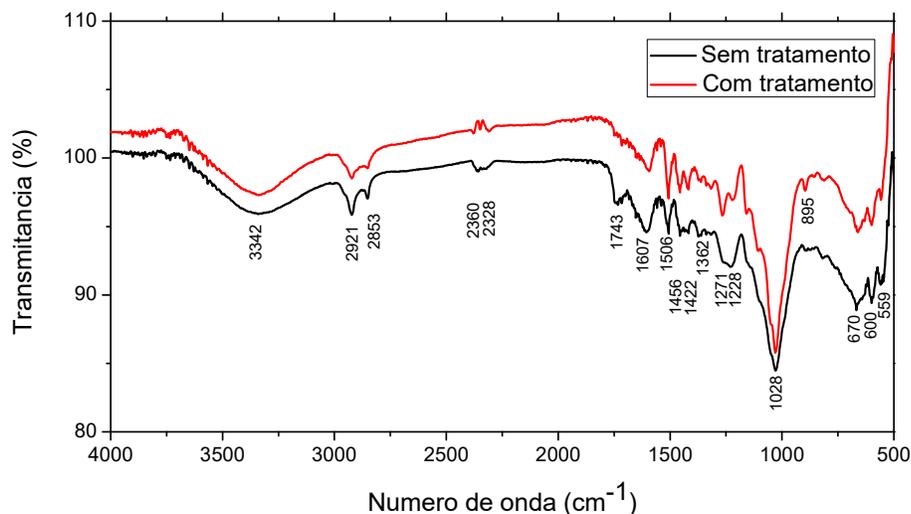
A amostra obtida após o pré-tratamento realizado nas condições ótimas apresentou 54,77 ± 0,67% de celulose, 12,38 ± 0,34% de hemicelulose, e 23,52 ± 0,12% de lignina insolúvel em ácido. Em comparação com dados da Tabela 4.1, a quantidade de lignina reduziu 34,7 %, o que justifica o aumento da porcentagem de celulose. A fração de hemicelulose reduziu aproximadamente 26 %.

4.6 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR foi realizada para determinar as alterações estruturais do material lignocelulósico após o pré-tratamento com NaOH. A análise de FTIR pode fornecer dados quantitativos e qualitativos para a análise composicional da biomassa

lignocelulósica. A redução da intensidade do pico dá a indicação de que o grupo funcional está alterado ou perturbado (ZULKEFLI *et al.*, 2017). Dados da espectroscopia de FTIR mostraram a ocorrência de estruturas lignocelulósicas que incluem lignina, celulose e hemicelulose, para a biomassa sem tratamento e tratada na melhor condição, de acordo com a Figura 4.9.

Figura 4.9: Espectro de FTIR do material lignocelulósico não-tratado.



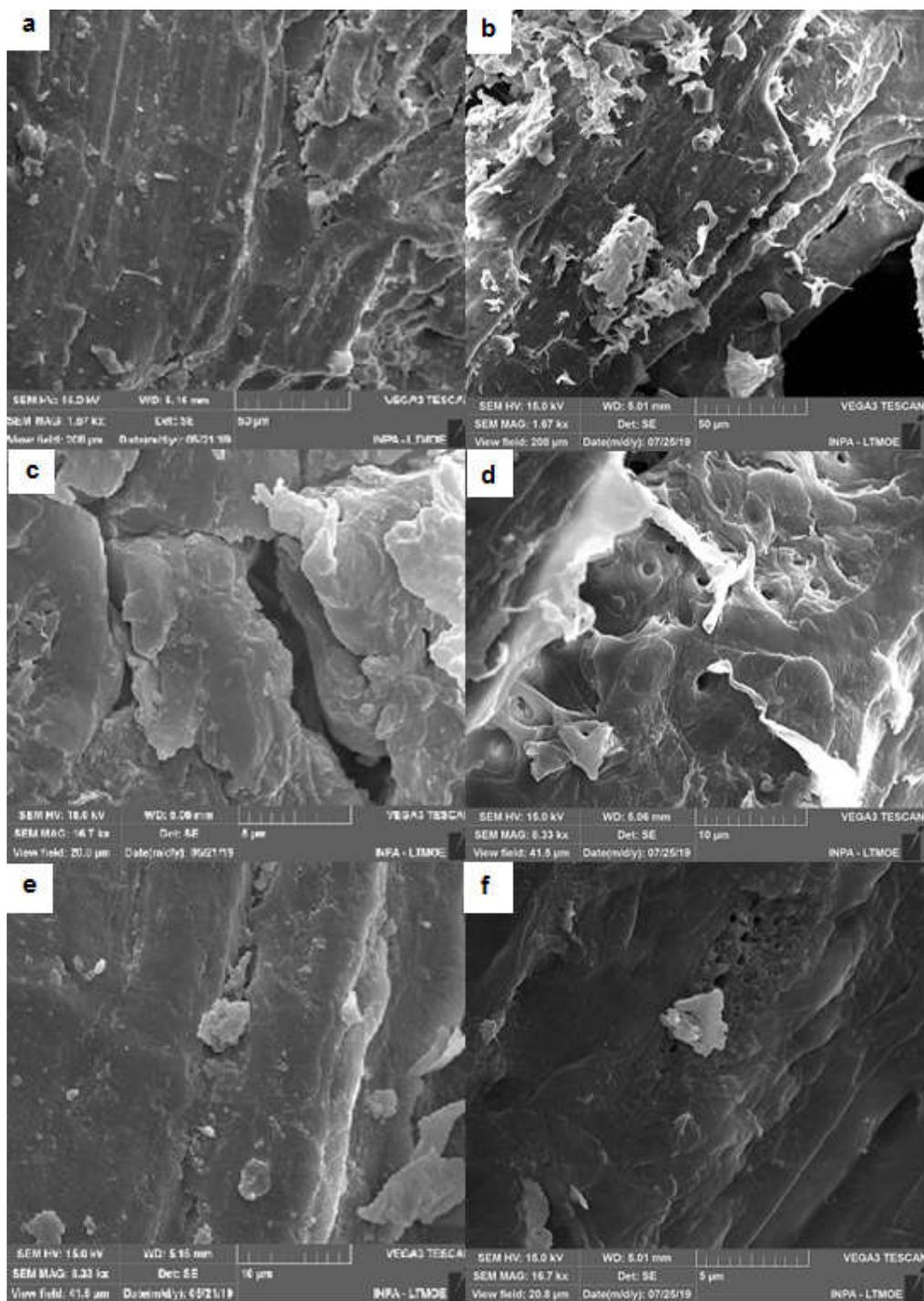
A banda observada em 1028 cm^{-1} tem relação com a vibração de estiramento C-O na celulose, este pico se torna mais pronunciado na amostra tratada, indicando que a hemicelulose é removida e o pico característico de celulose é melhorado após o pré-tratamento alcalino (CHEN *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2016). A banda detectada em 3342 cm^{-1} está relacionada ao estiramento das ligações de O-H em estruturas de celulose (ARUWAJOYE *et al.*, 2019). Picos observados em 1506 cm^{-1} , nas amostras, tratada e sem tratamento, correspondem às bandas de absorção dos grupos funcionais da lignina (hidroxila (OH), metoxila, grupo carbonila (C=O) e anéis aromáticos); a lignina mostra a absorvância esquelética aromática diagnóstica entre 1500-1560 cm^{-1} (WANG *et al.*, 2019; WATKINS *et al.*, 2015). Em 1604 cm^{-1} ocorreu uma redução do pico, da amostra sem tratamento para a amostra tratada, indicando a remoção de lignina (ZHU *et al.*, 2016). O pico em 2921 cm^{-1} está próximo da região espectral atribuída à deformação C-H (assimétrica) em grupos metoxil e metileno que também indica uma leve alteração das estruturas aromáticas da lignina durante o processo de delignificação (YIIN *et al.*, 2018). Sobre a banda de absorção observada em 1743 cm^{-1} , esta pode estar

relacionada com a presença do estiramento de C=O devido à presença de carbonila ($1735\text{-}1733\text{cm}^{-1}$) (CARVALHO *et al.*, 2019). O pico de absorção em 895 cm^{-1} pode ser relacionado a ligações β -glicosídicas danificadas dentro das estruturas celulósicas; segundo dados da literatura esta banda de absorção indica a presença de celulose amorfa, na Figura observa-se que esse pico está mais acentuado na amostra pré-tratada, assim, a celulose amorfa aumentou e o material foi hidrolisado com maior facilidade, conforme comprovado através dos experimentos de hidrólise enzimática (EBRAHIMIA *et al.*, 2017).

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu avaliar as alterações morfológicas resultantes do pré-tratamento alcalino. Na Figura 4.10, as imagens da biomassa lignocelulósica tratada com NaOH, nas condições ótimas (4.10 (b), (d) e (f)), foram comparadas com a da casca triturada sem tratamento (4.10 (a), (c), e (d)), nos aumentos de 1.000, 5.000 e 10.000 vezes, respectivamente. A casca da andiroba sem tratamento tinha uma superfície compacta e lisa, sem qualquer vestígio de erosão, ou descamação. Após o pré-tratamento com hidróxido de sódio, a superfície da amostra apresentou traços irregulares de erosão, e presença de poros. Essas erosões aumentaram a área de superfície acessível da celulose, fato importante para a melhoria da hidrólise enzimática. Os poros se tornaram visíveis devido à remoção de outros componentes da parede celular, deixando rede de celulose exposta (ZHU *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2013). Na imagem 4.10 (b), é possível observar que além das fibras delaminadas, existe a presença de gotículas que possivelmente foram originadas a partir da matriz celulósica, e depositadas de volta sobre a superfície da parede celular. Estes são provavelmente agregados de lignina, formada pela extração de lignina das regiões internas da parede celular, seguido por condensação devido a condições de pH e redeposição na superfície (SELIG *et al.*, 2007). Resíduos de descamação também foram observados em análise de MEV de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (CHEN *et al.*, 2011).

Figura 4.10: Imagens de MEV da casca de andiroba não tratada e pré-tratada antes da hidrólise enzimática.



a, c, e: matéria-prima não tratada (aumento de 1.000x, 5.000x, e 10.000x, respectivamente); *b, d, f:* pré-tratada nas condições ótimas (aumento de 1.000x, 5.000x, e 10.000x, respectivamente).

A presença de poros, no material pré-tratado, pode ser notada nos três aumentos (1.000, 5.000 e 10.000x), esse aumento de porosidade e da área de superfície externa é devido à ruptura da matriz carboidrato-lignina, bem como a despolimerização e a solubilização dos polímeros hemicelulósicos (RAMOS, 2003; KAMALINI *et al.*, 2018). Assim, a designificação da biomassa lignocelulósica com NaOH, ao formar vazios na superfície do material, aumenta a acessibilidade da celulose e promove um processo de sacarificação enzimática eficiente.

4.8 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE SACARIFICAÇÃO

A modelagem matemática tem por objetivo compreender o comportamento cinético da hidrólise de polissacarídeos visando desenvolver processos enzimáticos de hidrólise que possam atingir altos rendimentos em glicose e outros açúcares, que serão a base para a produção de ácidos orgânicos e etanol.

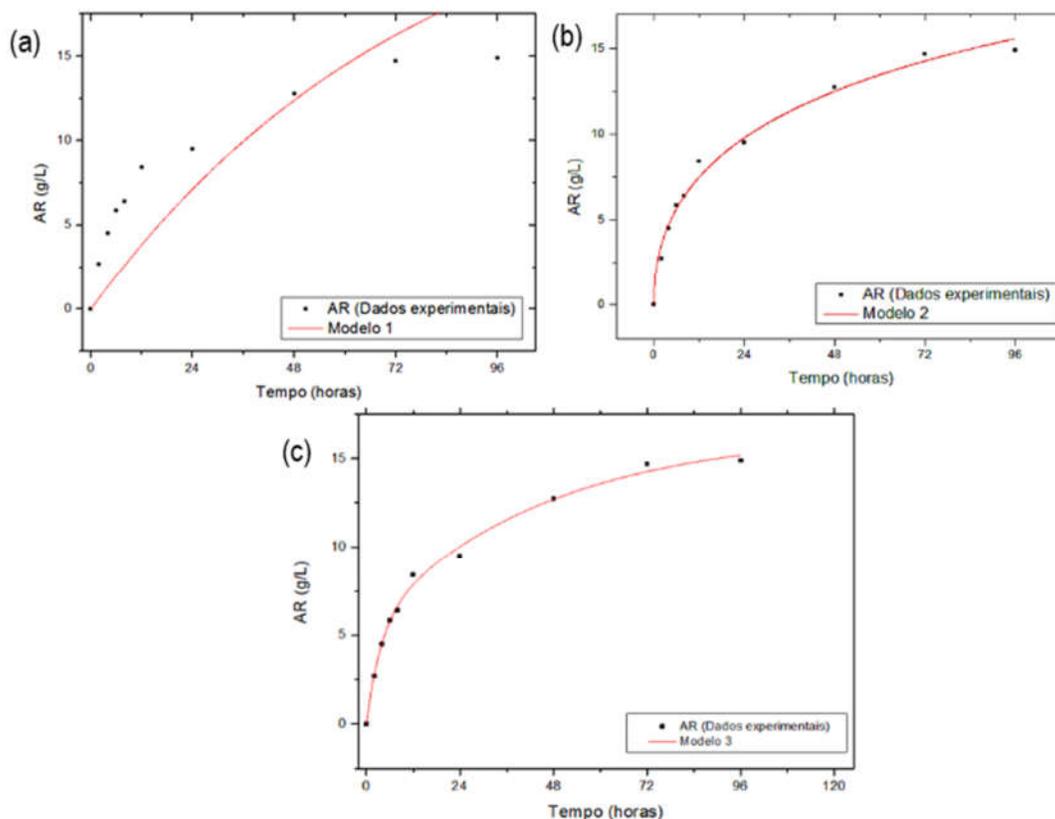
De acordo com as equações da Tabela 3.4, para determinar com precisão os parâmetros envolvidos nos modelos, os valores de AR (g/L) versus tempo de reação foram medidos, e são apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13: Dados experimentais obtidos na cinética de sacarificação.

Tempo (horas)	Açúcares redutores (g/L)	
	Média	Desvio padrão
0	0,00	0,00
2	2,70	0,02
4	4,51	0,05
6	5,85	0,04
8	6,41	0,04
12	8,42	0,05
24	9,49	0,04
48	12,75	0,06
72	14,70	0,03
96	14,90	0,01

Nas figuras 4.11 (a), (b) e (c), os ajustes são apresentados, para os Modelos 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 4.11: Ajuste dos modelos 1, 2 e 3 aos dados cinéticos obtidos na hidrólise enzimática da casca de andiroba.



A análise de variância para o ajuste dos modelos estudados é apresentada na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Análise de variância do ajuste dos modelos.

Modelo	Fonte	Grau de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	P
1	Regressão	1	774,69883	774,69883	77,58983	1
	Resíduos	9	89,86087	9,98454		
2	Regressão	2	862,10108	431,05054	1402,57964	2,8354E-10
	Resíduos	8	2,45862	0,30733		
3	Regressão	4	863,60523	251,90131	1357,20262	6,9653E-9
	Resíduos	6	0,95447	0,15908		

As curvas dos modelos de regressão 2 e 3 se ajustaram muito bem os dados experimentais, os coeficientes de determinação (R^2) da regressão corresponderam a 0,9879 e 0,9937, respectivamente.

Os modelos foram validados para os dados experimentais obtidos, apresentando indicadores estatísticos (coeficiente de determinação R^2 , F e valor-p) bastante favoráveis à sua validação, o teste F deve ser algumas vezes maior que F tabelado, ou seja, quanto maior o valor de F, melhor a predição do modelo.

De acordo com a Figura 4.11, observa-se que a velocidade de hidrólise é mais elevada nas primeiras horas do processo, e reduz no decorrer da reação, este fato pode ser devido a: heterogeneidade do substrato (regiões amorfas da celulose são despolimerizadas nos primeiros estágios de reação, deixando as frações cristalinas para os estágios finais), a inibição pelos produtos da reação, a inativação térmica e a absorção irreversível de uma parte das enzimas sobre o substrato (SCRIBAN, 1985).

No tempo de 72 horas foi alcançada a maior taxa de conversão (sacarificação), com o valor de aproximadamente 54,44 %, em relação ao tempo estudado no planejamento de experimentos (48 horas) houve um incremento de 7,22 % ao rendimento do processo, este fato pode ser associado a acessibilidade das enzimas às porções mais internas da biomassa, através dos poros abertos durante o tratamento alcalino. No tempo de 96 horas o rendimento do processo alcançou o valor de 55,18 %, no entanto o aumento de 0,74 % em comparação ao rendimento associado ao tempo de 72 horas não justifica o acréscimo de mais 24 horas de processo.

Os parâmetros apresentados na Tabela 4.15 foram estimados por regressão não-linear, minimizando-se a soma dos quadrados dos resíduos entre os valores experimentais e os calculados pelos modelos.

Tabela 4.15: Parâmetros determinados e coeficientes de correlação dos modelos avaliados.

Modelo	Parâmetro	Valor	Desvio-padrão	R^2
1	k (h^{-1})	0,0128	0,0022	0,6074
2	h	0,5323	0,0240	0,9879
	k	0,1018	0,0089	
3	a	10,9794	0,8581	0,9937
	b	0,0220	0,0078	
	c	5,5260	1,2353	
	d	0,2665	0,0843	

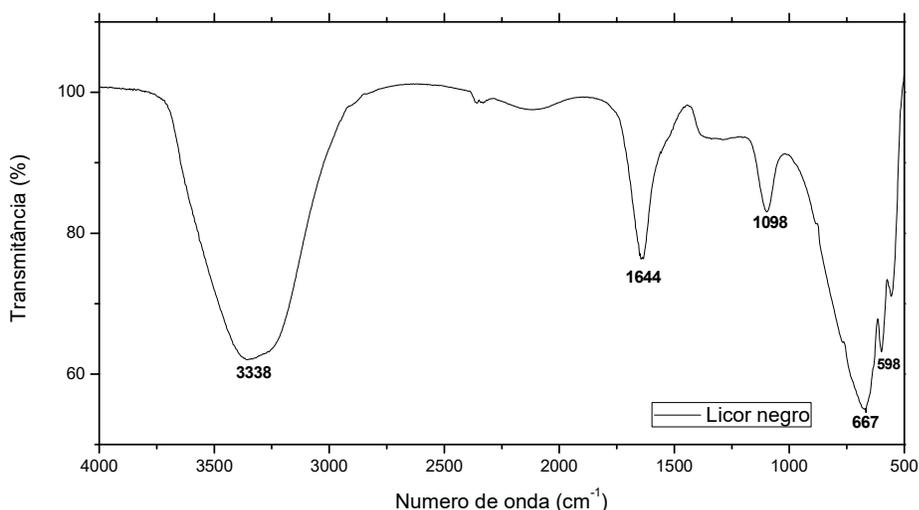
O bom ajuste do modelo baseado na teoria cinética fractal está de acordo com os estudos desenvolvidos por WANG e FENG (2010), e por YAO *et al.* (2011). É possível observar que este modelo apresenta melhor ajuste devido aos poucos resíduos e aos baixos valores de desvio-padrão associados aos parâmetros calculados.

A importância da obtenção de modelos cinéticos que descrevam bem o processo de hidrólise enzimática para material lignocelulósico específico, consiste na aplicação destes no estudo da influência da carga enzimática, concentração de substrato, e inibição pelo produto (açúcares redutores), na conversão e no tempo de operação do processo.

4.9 ANÁLISE DO RESÍDUO LÍQUIDO (LICOR NEGRO) PROVENIENTE DO PRÉ-TRATAMENTO ALCALINO

Os picos que compõem o gráfico na Figura 4.12, estão associados aos comprimentos de ondas.

Figura 4.12: Espectro de FTIR do licor negro proveniente do pré-tratamento alcalino.



O pico em 3338 cm^{-1} está associado ao estiramento OH, de acordo com FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ *et al.* (2017), em estudo sobre valorização de lignina a partir de resíduos da agroindústria, todas as amostras de lignina analisadas apresentaram uma banda larga de absorção na região próxima a 3400 cm^{-1} , indicando estiramento OH nos grupos OH aromáticos e alifáticos. Este estiramento OH pode também estar principalmente relacionado a presença da água (MUÑOZ *et al.*, 2019). Em relação ao pico em 1644 cm^{-1} , de acordo com SUN *et al.* (2012), sinais entre 1400 e 1700 cm^{-1} são atribuídos às vibrações esqueléticas aromáticas das ligninas.

Para o pico que aparece no número de onda de 1098 cm^{-1} , bandas características associadas às unidades de siringila e guaiacila na lignina podem ser detectadas em 1125 e 1030 cm^{-1} , correspondentes a C-O e estiramento de CO

(guaiacila), deformação aromática no plano CH (de siringila) e deformação aromática de C-H (SUN *et al.*, 2012; MARABEZI, 2009).

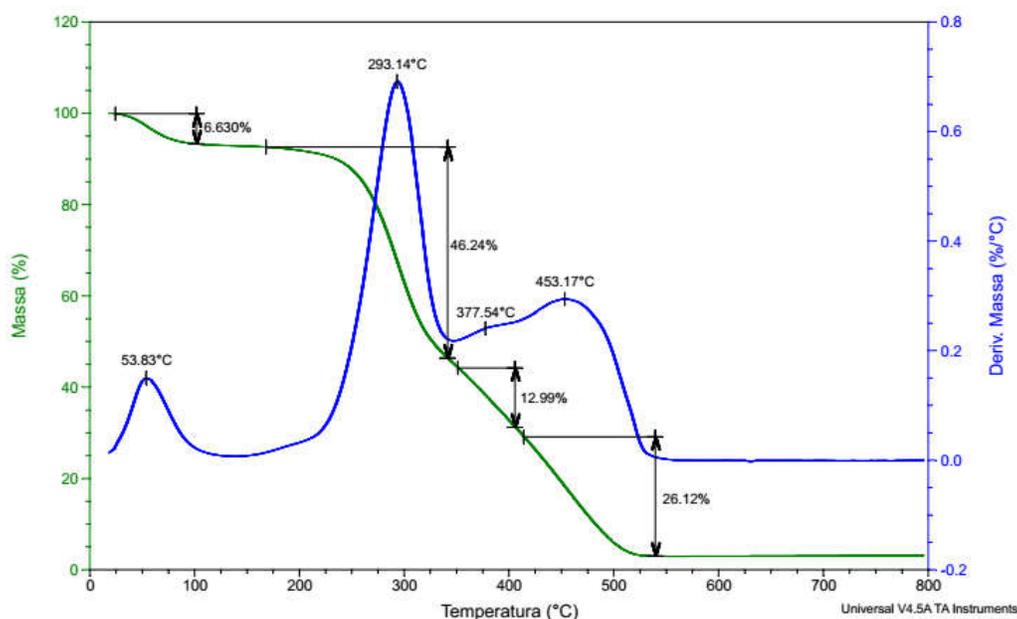
Em 598 cm^{-1} também é possível observar relação com a lignina retirada da biomassa tratada, pois este número de onda está relacionado com a deformação da estrutura do anel aromático das cadeias laterais (YING *et al.*, 2018).

A análise de FTIR do licor negro confirma o caráter seletivo do pré-tratamento alcalino para a extração de lignina solúvel da biomassa lignocelulósica.

4.10 ANÁLISE TÉRMICA DO RESÍDUO SÓLIDO PROVENIENTE DO HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

Na Termogravimetria (TG) mostrada na Figura 4.13, a informação obtida mostra a relação de variação de massa com o aumento da temperatura sob atmosfera controlada, e através da derivada (DTG) observa-se a presença de 4 eventos de decomposição, como reportado por vários autores (ZEMKE *et al.*, 1996; FERREIRA, 1997; VELDEN *et al.*, 2010).

Figura 4.13: Termograma do resíduo sólido da hidrólise enzimática.



A primeira etapa de degradação ocorreu no intervalo de temperatura de 23,77 a 102,42 °C, com pico da DTG igual a 53,83 °C, nesta primeira etapa ocorreu uma perda de massa de 6,63 %. Esta perda está associada à evaporação de água contida nos materiais lignocelulósicos, devido sua característica hidrofílica (LI *et al.*, 2009). Na

segunda etapa ocorreu a perda de 46,24 %, na faixa de temperatura compreendida de 168,21 a 340,64 °C, com o pico da DTG igual a 293,14 °C, esta perda refere-se ao princípio da decomposição da hemicelulose presente na amostra e início da decomposição da lignina. Já a terceira etapa, a degradação ocorreu no intervalo de temperatura de 351,22 °C a 405,67 °C, com o pico da DTG igual a 377,54 °C, com perda de massa de 12,99 % e está associado ao término da decomposição térmica da hemicelulose e início da decomposição da celulose e degradação da lignina. Na quarta e última etapa, ocorreu a perda de 26,12 %, com pico da DTG de 453,17 °C, compreendido entre 414,75 °C e 539,52 °C. Este estágio está associado a decomposição principal da celulose e da lignina remanescente. Observa-se que a partir deste ponto restam 8,02 % de material, provavelmente este valor é referente a quantidade de compostos inorgânicos presentes na amostra.

De acordo com a literatura, para materiais lignocelulósicos, a decomposição ocorre em quatro etapas (MORTARI *et al.*, 2010). Inicialmente, a principal perda é referente a umidade e ocorre por volta de 100 °C. O segundo evento refere-se ao início da decomposição da hemicelulose e lignina. A hemicelulose tem baixa estabilidade térmica. Já o terceiro evento corresponde a decomposição da celulose e no quarto evento a lignina remanescente se decompõe em altas temperaturas (AIMAN e STUBINGTON, 1993; GUIMARÃES *et al.*, 2009; OUENSANGA e PICARD, 1988).

YANG *et al.* (2007), em seu estudo afirma que a lignina sofre decomposição térmica em uma ampla faixa, a partir de 100 °C, até próximo de 900 °C, podendo ser considerado um conjunto de várias reações paralelas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem considerar essa biomassa como matéria-prima promissora para a produção de ácidos orgânicos, especialmente devido às condições leves de pré-tratamento, solicitadas para otimizar o processo. Em particular, esta matriz vegetal necessita de poucas etapas de processamento, com benefícios positivos no processo de redução de custos e diminuição do impacto ambiental.

O material lignocelulósico estudado apresenta elevado teor de celulose (36,96 %) e lignina (36,02 %), características interessantes para a produção de ácido orgânicos, e para o aproveitamento do resíduo (licor negro) gerado no pré-tratamento alcalino .

A partir das análises estatísticas, foi observado que as condições ótimas do processo para tempo de reação, concentração da solução de NaOH e temperatura, em 100 min, 4 % e 120 °C, respectivamente, conduziram a um rendimento de 47,89 %. O material pré-tratado teve seu teor de celulose determinado, e esse valor correspondeu a 54,77 %, e o teor de lignina foi de 23,52 %. A quantidade de lignina reduziu 34,7 %, o que justifica o aumento da porcentagem de celulose

O acompanhamento da cinética do processo de sacarificação da amostra tratada nas condições ótimas obtidas através do planejamento de experimentos, permitiu concluir que o aumento de 24 horas de processo eleva em 7,22 % o rendimento do processo; além do que os dados experimentais permitiram a avaliação de modelos de regressão que apresentaram bom ajuste, e podem então ser utilizados para estudos posteriores. O modelo de cinética fractal apresentou melhor ajuste aos dados experimentais obtidos neste estudo.

Os resíduos gerados na tratamento alcalino e na etapa posterior de hidrólise enzimática foram caracterizados e os resultados nos permitem concluir que estes podem ser aproveitados através de processos de purificação e produção de substâncias químicas de alto valor agregado, como lignina e nanocelulose.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a combinação de pré-tratamento com o objetivo de reduzir a fração hemicelulósica da composição da biomassa.
- Avaliar a influência da carga enzimática na sacarificação dos resíduos do processo de extração do óleo de andiroba.
- Estudar técnicas para recuperar a lignina presente no licor negro, proveniente do pré-tratamento alcalino, e caracterizar a lignina obtida.
- Avaliar o aproveitamento do resíduo sólido proveniente da hidrólise enzimática, rico em celulose, para a produção de nanocelulose.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16. ed., 3ª rev. Gaithersburg: Published by AOAC International, v.2.1997.
- A.O.C.S. American Oil Chemist's Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society**, AOAC Press, Champaign, 2004.
- ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; WOLF, C.; SUAREZ, P. A. Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of Brazilian vegetable oils with different alcohols. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical** 209, p.29-33, 2004.
- ADNEY, B., BAKER, J. Laboratory Analytical Procedure (LAP): **Measurement of Cellulase Activities**. Technical Report NREL/TP-510-42628, 2008.
- AIBA, S., HUMPHREY, A. E.; MILLIS, N. F. **Biochemical engineering**. 2nd ed. New York: Academic Press, 434 p., 1973.
- AIMAN, S.; STUBINGTON, J. F. The pyrolysis kinetics of bagasse at low heating rates. **Biomass and Bioenergy** 5, n. 2, p. 113–120, 1993.
- ALVIRA, P., TOMÁS-PEJÓ, E., BALLESTEROS, M., NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology** 101, p.4851–4861, 2010.
- ANEEL. (Agência Nacional de Energia Elétrica). **Fontes Renováveis**. Disponível em: <http://www2.aneel.gov.br/arquivos/pdf/atlas_par2_cap4.pdf> Acesso em: 28jun. 2019.
- ANP (Agência Nacional de Petróleo). **Etanol**. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/etanol>> Acesso em: 28jun. 2019.
- ANWAR, Z., GULFRAZB, M., IRSHAD, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key tounlock the future bioenergy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences** 7, p.163-173, 2014.
- ARUWAJOYE, G.S., FALOYE, F.D., KANA, E.G. Process Optimisation of Enzymatic Saccharification of Soaking Assisted and Thermal Pretreated Cassava Peels Waste for Bioethanol Production. **Waste and Biomass Valorization**. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-00562-0>. Acesso em: 09 Jul. 2019.
- BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M.J., LEE, J.H., BOMMARIUS, A.S. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances** 27, 833-848, 2009.
- BAUDEL, H. M. **Pré-tratamento e hidrólise**. III Workshop Tecnológico sobre Hidrólise - Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, 2006.
- BEHERA, S., ARORA, R., NANDHAGOPAL, N., KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**.v 36. p.91–106. 2014.
- BETIKU E., TAIWO A.E. Modeling and optimization of bioethanol production from breadfruit starch hydrolyzate vis-à-vis response surface methodology and artificial neural network. **Renew Energy** 74, p.87–94, 2015.

BNDES e CGEE. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável / organização**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics: A journal of Washington**. v. 2, p.455-475, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: Wiley, 1978.
BRISTOW, J.A., KOLSETH, P. **Paper Structure and Properties**. Taylor & Francis, 416 p., 1986.

BUKHARI, N.A., JAHIM J. M., LOH, S.K., BAKAR, N.A., LUTHFI, A.A.I. Response surface optimisation of enzymatically hydrolysed and dilute acid pretreated oil palm trunk bagasse for succinic acid production. **BioResources** 14(1), p.1679-1693, 2019.

BURATTI, C., FOSCHINI, D., BARBANERA, M., FANTOZZI, F. Fermentable sugars production from peach tree prunings: Response surface model optimization of NaOH alkaline pretreatment. **Biomass and Bioenergy** 112, p.128–137, 2018.

CAMPAÑA, A. M. G.; RODRÍGUEZ, L. C.; GONZÁLEZ, A. L.; BARRERO, F. A.; CEBA, M. R. Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica Chimica Acta**. v. 348, p. 237-246. 1997.

CANETTI, E.V. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. Tese de doutorado. Guaratinguetá: Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, 2004.

CARVALHO, A.P.C; FERREIRA, R.L. **A utilização do biocombustível como alternativa sustentável na matriz energética brasileira**. Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade.v.5, n.3, 2014.

CARVALHO, D.M., MOSER, C., LINDSTRÖM, M.E., SEVASTYANOVA, O. Impact of the chemical composition of cellulosic materials on the nanofibrillation process and nanopaper properties. **Industrial Crops & Products** 127, p.203–21, 2019.

CASTRO, HEIZIR F. **Papel e celulose**. Apostila 4, Processos Químicos Industriais II. Universidade de São Paulo. p. 2-8. 2009. Disponível em: <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/5840556/434/apostila4papelecelulose.pdf> f. Acesso dia 04/10/2018.

CAVALCANTE, F. J. B.; FERNANDES, N. P.; ALENCAR, J. C.; SILVA, M. F. **Pesquisa e Identificação de espécies oleaginosas nativas da Amazônia**. Relatório técnico. Convênio Codeama: INPA. Manaus, AM. 1986.

CHANDRA, R., CASTILLO-ZACARIAS, C., DELGADO, P., PARRA-SALDÍVAR, R. A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index. **Journal of Cleaner Production** 183, p.1184–1196, 2018.

CHANG, V.S., HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 84, p.5–37, 2000.

CHEN, W.-H, YE, S.-C., SHEEN, H.-K., Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Appl. Energy** 93 (0), p.237-244, 2012.

CHOI, J.M., HAN, S.S., KIM, H.S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances** 33, p. 1443–1454. 2015.

COSTA, S. G. V. A. O. *et al.* Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry** 41 p.483-488, 2006.

DALE, B. E., HENK, L. L., SHIANG, M. Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze explosion. **Dew Ind. Microbiol.** 26, p.223-233, 1985.

DE CASTRO, A.M.; PEREIRA JUNIOR, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Quimica Nova** 33, n.1, p.181-188, 2010.

DE MORAES, A.R.D.P., TAVARES, GD., ROCHA, F.J.S., DE PAULA, E., GIORGIO, S. Effects of nanoemulsions prepared with essential oils of copaiba- and andiroba against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* infections. **Experimental Parasitology** 187, p.12-21, 2018.

DELMER, D.P., AMOR, Y. **Cellulose biosynthesis**. The Plant cell 7, p.987-1000, 1995.

DENG, W., ZHANG, Q., WANG, Y. Catalytic transformations of cellulose and cellulose-derived carbohydrates into organic acids. **Catalysis Today** 234, p.31–41, 2014.

EBRAHIMIA, M., CAPARANGA, A.R., ORDONO, E.E., VILLAFLORES, O.B. Evaluation of organosolv pretreatment on the enzymatic digestibility of coconut coir fibers and bioethanol production via simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy** 109, p.41-48, 2017.

EERE.(Energy Efficiency and Renewable Energy - U.S. Department of Energy). **Ethanol Feedstocks**. Disponível em: https://afdc.energy.gov/fuels/ethanol_feedstocks.html. Acesso em: 28 jun. 2019.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. **Espécies arbóreas da Amazônia: Andiroba, *Carapa guianensis***. Belém, Brasil: Embrapa-Cpatu, 2004. Ficha n. 2.

EMBRAPA. **Espécies nativas da Amazônia: Andiroba *Carapa guianensis***. Embrapa Amazônia Oriental: Projeto Dendrogene, 2014.

FARGIONE, J., HILL, J., TILMAN, D., POLASKY, S., HAWTHORNE, P. Land clearing and the biofuel carbon debt. **Science** 319, p.1235–1238, 2008.

FAZOLIN, M.; ESTRELA, J.L.V PESSOA, J.S. **Avaliação do uso do óleo de andiroba *Carapa guianensis* Aubl., no controle da *Ceratomyxa tingonarius* Bechynebem em feijoeiro no Acre**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NATURAIS. Fortaleza: Academia Paraense de Ciências, 2000.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood – Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Walter de Gruyter, Berlin, 1989.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, J., GORDOBIL, O., ROBLES, E., GONZÁLEZ-ALRIOLS, M., LABIDI, J. Lignin valorization from side-streams produced during agricultural waste pulping and total chlorine free bleaching. **Journal of Cleaner Production** 142, 2609-2617, 2017.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C.): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 4, p. 647-661, 2002.

FERRAZ, I.D.K., CAMARGO, J.L.C., SAMPAIO, P.T.B. **Manual de sementes da Amazônia Carapa guianensis Aubl e Carapa procera D C.** 2003.

FERREIRA, F. C. **Deslignificação e benzilação de fibras de sisal.** Dissertação (Mestrado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 104p.,1997.

FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 2, 179-186, 2007.

FERREIRA, V. F., ROCHA, D. R., SILVA, F. C. Química Verde, Economia Sustentável e Qualidade de Vida. **Revista Virtual de Química** 6 (1), 85-111, 2014.

FITZPATRICK, M., CHAMPAGNE, P., CUNNINGHAM, M.F., WHITNEY, R.A.A biorefinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. **Bioresource Technology**101(23), p.8915-8922, 2010.

GALBE, M., ZACCHI, G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy** 46, p.70–78, 2012.

GARCÍA, J.C., DÍAZ, M.J., GARCIA, M.T., FERIA, M.J., GÓMEZ, D.M., LÓPEZ, F. Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process. **Biochem Eng J** 71:127–133, 2013.

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

GILLET, S., AGUEDO, M., PETITJEAN, L., MORAIS, A.R.C., DA COSTA LOPES, A.M., LUKASIK, R.M., ANASTAS, P.T. Lignin transformations for high value applications: towards targeted modifications using green chemistry. **Green Chem.** 19, p.4200–4233, 2017.

GONZALEZ, G., LOPES-SANTIN, J., CAMINAL, G., SOLA, C. Dilute acid hydrolysis of wheat straw hemicellulose at moderate temperature: a simplified kinetic model. **Biotechnology and Bioengineering** 28, p.288–293, 1986.

GU, H., ANA, R., BAOA, J. Pretreatment refining leads to constant particle size distribution of lignocellulose biomass in enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Journal** 352, 98–205, 2018.

GUERRA, F. G. P. Q. **Contribuição dos produtos florestais não-madeireiros na geração de renda na Floresta Nacional do Tapajós – Pará.** Curitiba, 2008, 133 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal), Universidade Federal do Paraná, Paraná.

GUIMARÃES, J. L., FROLLINI, E., SILVA, C. G.; WYPYCH, F.; SATYANARAYANA, K. G. Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fibers of Brazil. **Industrial Crops and Products** 30, n. 3, p. 407–415, 2009.

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, V., & FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long-term. **Biomass and Bioenergy**, 28, p.384-410, 2005.

HU, L., ZHAO, G., HAO, W., TANG, X., SUN, Y., LIN, L., LIU, S. Catalytic conversion of biomass-derived carbohydrates into fuels and chemicals *via* furanic aldehydes. **RSC Advances** 2, p.11184–11206, 2012.

IBRAHIM, M.M., EL-ZAWAWY, W.K., ABDEL-FATTAH, Y.R., SOLIMAN, N.A., AGBLEVOR, F.A. Comparison of alkaline pulpine with steam explosion for glucose production from rice straw. **Carbohydrate Polymer** 83, p.720-726, 2011.

INOUE, T., MATSUI, Y., KIKUCHI, T., YAMADA, T., IN. Y., MURAOKA, O., SAKAI, C., NINOMIYA, K., MORIKAWA, T., TANAKA, R. Carapanolides MeS from seeds of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae) and triglyceride metabolism-promoting activity in high glucose-pretreated HepG2 cells. **Tetrahedron** 71, p.2753-2760, 2015.

JÖNSSON, L.J., MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology** 199, 103–112, 2016.

JUNG, Y.H., KIM, I.J., HAN, J-I, CHOI, I-G, KIM, KH. Aqueous ammonia pretreatment of oil palm empty fruit bunches for ethanol production. **Bioresource Technology** 102(20), p.9806-9809, 2011.

KAMALINI, A., MUTHUSAMY, S., RAMAPRIYA, R., MUTHUSAMY, B., PUGAZHENDHI, A. Optimization of sugar recovery efficiency using microwave assisted alkaline pretreatment of cassava stem using response surface methodology and its structural characterization. **Journal of Molecular Liquids** 254, p.55–63, 2018.

KAMM, B., GRUBER, P.R., KAMM, M. **Biorefineries - Industrial Processes and Products**. Wiley-VCH-Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2006.

KANG, K.E., HAN, M., MOON, S., KANG, H., KIM, Y., CHA, Y., CHOI, G. Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*, **Fuel** 109, p.520-526, 2013.

KARIMI, K., TAHERZADEH, M.J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresource Technology** 200, p.1008–1018, 2016.

KARUNANITHY, C., MUTHUKUMARAPPAN, K. Influence of Extruder Temperature and Screw Speed on Pretreatment of Corn Stover while Varying Enzymes and Their Ratios. **Appl Biochem Biotechnol** 162, p.264–279, 2010.

- KIM J.S., LEE Y.Y., KIM T.H. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** 199, p.42 – 48, 2016.
- KIM, I., HAN, J.-IN. Optimization of alkaline pretreatment conditions for enhancing glucose yield of rice straw by response surface methodology. **Biomass and bioenergy** 46, p. 210-217, 2012.
- KIM, T.H., GUPTA, R., LEE, Y.Y. **Pretreatment of biomass by aqueous ammonia for bioethanol production**. In: Mielenz, J.R. (Ed.), *Methods in Molecular Biology Book Series: Biofuels*, vol. 581. The Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA, p. 79–91, 2009.
- KOOTSTRA, A.M.J., BEEFTINK, H.H., SCOTT, E.L., SANDERS, J.P.M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochemical Engineering Journal** 46, p.126–131, 2009.
- KOPELMAN, R. Fractal Reaction Kinetics. **Science**. 23 (241), 1620-1626, 1988.
- LANGE, J.P., VAN DER HEIDE, E., BUIJTENEN, J.V., PRICE, R. Furfural—A Promising Platform for Lignocellulosic Biofuels. **ChemSusChem** 5 (1), 2011.
- LASKAR, D.D., YANG, B., WANG, H.M., LEE, J. Pathways for biomass-derived lignin to hydrocarbon fuels. **Biofuel Bioprod. Biorefin.** 7, p.602–626, 2013.
- LEE, J.M., JAMEEL, H., VENDITTI, R.A. A comparison of the auto hydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. **Bioresource Technology** 101, p.5449–5458, 2010.
- LEITE, A.M.C. **Ecologia de Carapa guianensis Aubl. (Meliaceae) “andiroba”**. Tese (Doutorado em Biologia Ambiental) - Universidade Federal do Pará/Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 1997.
- LI, H., CHEN, X., XIONG, L., LUO, M., CHEN, X., WANG, C., HUANG, C., CHEN, X. Stepwise enzymatic hydrolysis of alkaline oxidation treated sugarcane bagasse for the co-production of functional xylo-oligosaccharides and fermentable sugars. **Bioresource Technology** 275, p.345–351, 2019.
- LI, R., FEI, J., CAI, Y., LI, Y., FENG, J., YAO, J. Cellulose whiskers extracted from mulberry: a novel biomass production. **Carbohydrate Polymers** 76, p. 94-99, 2009.
- LIMA, M. A., LAVORENTE, G.B., DA SILVA, H.K.P., BRAGATTO, J., REZENDE, C.A., O.D. BERNARDINELLI, AZEVEDO E.R., GOMEZ, L.D., MCQUEEN-MASON, S.J., LABATE, C.A., POLIKARPOV, I. Effects of pretreatment on morphology, chemical composition and enzymatic digestibility of eucalyptus bark: a potentially valuable source of fermentable sugars for biofuel production - part 1, **Biotechnol. Biofuels** 6:75, 2013
- LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, cap. 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LÓPEZ-GONZÁLEZ, D., FERNANDEZ-LOPEZ, M., VALVERDE, J.L., SANCHEZ-SILVA, L. Thermogravimetric-mass spectrometric analysis on combustion of lignocellulosic biomass, **Bioresour. Technol.** 143, p.562–574, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4.ed., Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LOUREIRO, A. A, SILVA, M. F., ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Volume 2, Manaus: INPA/SUFRAMA, 187p., 1979.

LUNDQVISTA, J., JACOBSS, A., PALMC, M., ZACCHIC, G., DAHLMANB, O., STA°LBRANDA, H. Characterization of galactoglucomannan extracted from spruce (*Picea abies*) by heat-fractionation at different conditions. **Carbohydrate Polymers** 51, p.203 - 211, 2003.

LUPOI, J.S., SINGH, S., PARTHASARATHI, R., SIMMONS, B.A., HENRY, R.J. Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. **Renewable Sustainable Energy Rev.** 49, p.871–906, 2015.

MACIEL, M.J.M., CASTRO e SILVA, A., TELLES, H.C.R. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. **Electronic Journal of Biotechnology** 13. p. 14-15, 2010.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-Açúcar**. Dissertação (Mestrado em Físico-Química), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MASON, R. L.; GUNST, R. G.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments**. New York: Wiley, 1989.

MCKENDRY, P., 2002. Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. **Bioresour. Technol.** 83, 37–46.

MENDONÇA A. P., FERRAZ IDK. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica** 37(3), p.353-34, 2007.

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

MIRANDA JÚNIOR, R.N.C., DOLABELA, M.F., DA SILVA, M.N., PÓVOA, M.M., MAIA, J.G.S. Antiplasmodial activity of the andiroba (*Carapa guianensis* Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. **Journal of Ethnopharmacology** 142, p. 679–683, 2012.

MISHRA, A., GHOSH, S. Saccharification of kans grass biomass by a novel fractional hydrolysis method followed by co-culture fermentation for bioethanol production. **Renewable Energy** 146, p.750-759, 2019.

MODENBACH, A. **Sodium hydroxide pretreatment of corn stover and subsequent enzymatic hydrolysis: An investigation of yields, kinetic modeling and glucose recovery**. Tese de doutorado, University of Kentucky, 2013.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. 5. ed. New York: J. Wiley, 683 p. 2001.

MOOD, S. H., GOLFESHAN, A. H., TABATABAEI, M., JOUZANI, G.S., NAJAFI, G.H., GHOLAMI, M., ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v 27. p 77–93. 2013.

MORETTI, M.M.D., BOCCHINI-MARTINS, D.A., NUNES, C.D.C., VILLENA, M.A., PERRONE, O.M., DA SILVA, R., BOSCOLO, M., GOMES, E. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy** 122, p.189–195, 2014.

MORTARI, D. A.; ÁVILA, I.; SANTOS, A. M.; CRNKOVIC, P. M. Study of thermal decomposition and ignition temperature of bagasse, coal and their blends. **Thermal Engineering** 9, p. 81–88, 2010.

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

MTUI, G.Y.S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value-added products. **African Journal of Biotechnology** 8(8), p.1398-1415, 2009.

MUÑOZ, A. H. S., GUERRERO, C. E. M., ORTEGA, N. L. G., VACA, J. C. L., VARGAS, A. A., AND CANCHOLA, C. C. Characterization and integrated process of pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn straw. **Waste and Biomass Valorization** 10, 1857-1871, 2019.

MUSSATTO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F., ROBERTO, I.C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from Brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology** 43, p.124–129, 2008.

NASCIMENTO, G. O. **Caracterização molecular, morfofuncional e biotecnológica de espécies do gênero Carapa**. Tese (Doutorado em Ciências de Florestas Tropicais), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus-AM, 2017.

NASEERUDDIN S., YADAV K.S., SATEESH L., MANIKYAM A. Selection of the best chemical pretreatment for lignocellulosic substrate Prosopis Juliflora. **Bioresource Technology** 136, p.542-549, 2013.

OLIVEIRA, I.S.S., TELLIS, C.J.M., CHAGAS, M.S.S., BEHRENS, M.D., CALABRESE. K.S., ABREU-SILVA, A.L., ALMEIDA-SOUZA, F. *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. **BioMed Research International**, p.1-10, 2018.

OLSSON, L., HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology** 18, p.312-331, 1996.

OUENSANGA, A.; PICARD, C. Thermal degradation of sugar cane bagasse. **Thermochemica Acta** 125, p. 89–97, 1988.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 107 p. Dissertação

(Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2010.

PAN, X., XIE, D., GILKES, N., GREGG, D.J., SADDLER, J.N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 124, p.1069–1079, 2005.

PAN, X., XIE, D., YU, Y.W. The bioconversion of mountain pine beetle-killed Lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. **Biotechnology Bioengineering** 101. p 39–48. 2008.

PANTOJA, T. D. F. **Descrição morfológica e análise da variabilidade genética para caracteres de frutos, sementes e processo germinativo associado à produtividade de óleo em matrizes de *Carapa guianensis* Aublet., uma Meliaceae da Amazônia** [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2007.

PATEL, A.K., SINGHANIA, R.R., PANDEY, A., 2016. **Chapter 2: Production, purification, and application of microbial enzymes.** In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier Inc., p.13–41, 2016.

PENG F., PENG P., XU F., SUN R.C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances** 30 (4), p. 879-903, 2012.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento factorial em química: maximizando a obtenção de resultados.** São Carlos: EdUFSCar, 88p., 2017.

PEREIRA, M. R. N. **Fenologia e produção de sementes de andiroba (*carapa guianensis*) aubl. e suas implicações para o manejo.** Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2010.

QING, Q., WYMAN, C.E. Supplementation with xylanase and b-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover. **Biotechnol. Biofuels** 4, p.1-12, 2011.

QUEIROZ, J. A. L. **Guia Prático de Manejo Florestal para a Produção de Frutos de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e de outros produtos de valor econômico no estado do Amapá.** IEPA. 38p. 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Tese de doutorado, UNICAMP, Campinas, Brasil, 2010.

RABEMANOLONTSOA, H., SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. **Bioresource Technology** 199, p.83–91, 2016.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steamtreatment of lignocellulosicmaterials. **Quim Nova**, 26, p.863–871, 2003.

RAPOSO, A; SILVA, J. M. M; SOUSA, J. A. **Estudos fenológicos de andiroba (*Carapa guianensis*) no município de Rio Branco.** 2003.

RESENDE R.R., SOCCOL C.R., FRANÇA L.R. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria. Fundamentos e Aplicações.** São Paulo. p.283-304. 2016.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. Manaus: Inpa: Sebrae, 2001.

RIBEIRO, G.G. **Morfologia de propágulos e regeneração natural de árvores de várzea exploradas no estuário amazônico: virola, andiroba e macacaúba**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical), Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical, Universidade Federal do Amapá, Macapá-AP, 2014.

RIBEIRO, R.A.R., MOREIRA, W.K.O, SILVA, A.J.C., COSTA, J.L.P., CONCEIÇÃO JÚNIOR, Z.F., SILVA, R.T.L. Biometria de sementes de andirobeira em ecossistema de várzea no nordeste paraense. **Gl. Sci Technol**, Rio Verde, v.09, n.03, p.116-124, 2016.

ROCHA JR, L. C.; FERREIRA, M.S.; RAMOS, A.C.S. Inhibition of asphaltene precipitation in Brazilian crude oils using new oil soluble amphiphiles. **Journal of Petroleum Science and Engineering** 51, p.26-36, 2006.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e Otimização de processos**. 3ª ed. Campinas, SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.

RODRIGUES, R. M. **A Flora da Amazônia**. Belém: CEJUPE, Utilidades industriais. Plantas Medicinais. 462 p. 1989.

SAHA, B.C., ITEN, L.B., COTTA, M.A., WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry** 40, p.3693–3700, 2005.

SÁNCHEZ O.J., CARDONA C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology** 99, p.5270-5295, 2008.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.** 27, p. 185–194, 2009.

SANTOS, F.A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V.M., Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova** 35 (5), p.1004-1010, 2012.

SARIKAYA A, LADISCH MR. Mechanism and potential applications of bio-ligninolytic systems in a CELSS. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 62, p.131-149. 1997.

SAUER, I L, QUEIROZ, M S, MIRAGAYA, J C G, MASCARENHAS, R C, JÚNIOR, A R Q. **Energias renováveis: ações e perspectivas na Petrobras**. BAHIA ANÁLISE & DADOS. Salvador, v. 16, n. 1, p. 9-22, jun. 2006. Disponível em: <http://www.moretti.agrarias.ufpr.br/eletrificacao_rural/tc_02.pdf>. Acesso em: 06/07/2019.

SCHUCHARDT, U., RIBEIRO, M. L., GONÇALVES, A. R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova** 24(2), 247-251, 2001.

SCHUTYSER, W., RENDERS, T., VAN DEN BOSCH, S., KOELEWIJN, S.F., BECKHAM, G., SELS, B. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depoly-merisation, and upgrading. **Chem. Soc. Rev.** 47, p.852–908, 2018.

- SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 489 p., 1985.
- SELIG, M. J., VIAMAJALA, S., DECKER, S. R., TUCKER, M. P., HIMMEL, M. E., & VINZANT, T. B. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Progress**, 23, p.1333–1339, 2007.
- SHANLEY, P. **Andiroba (*Carapa guianensis*, Aubl.)**. In: SHANLEY, P.; MEDINA, G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém: Cifor, p.41-50, 2005.
- SILVA, C. L. M. **Obtenção de estéres etílicos a partir da transesterificação do óleo de andiroba com etanol**. Campinas, 64f, Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. 2005.
- SIVERS, M. V., ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology** 51, p.43-52, 1995.
- SJOSTROM, E. **Wood Chemistry: Fundamentals and Applications**, 2^a ed. Academic Press, Espoo, Finland, 1993.
- SLUITER, J. B., CHUM, H., GOMES, A.C., TAVARES, R.A.P., AZEVEDO, V., PIMENTA, M.T.B., RABELO, S.C., MARABEZI, K., CURVELO, A. A. S., ALVES, A. R. ; GARCIA, W. T., CARVALHO, W., ESTEVES, P. J., MENDONCA, S., OLIVEIRA, P. A., RIBEIRO, J. A. A., MENDES, T. D., VICENTIN, M. P., DUARTE, C. L., MORI, M. N. Evaluation of Brazilian Sugarcane Bagasse Characterization: An Interlaboratory Comparison Study. **Journal of AOAC International**, p.7, 2016.
- SLUITER, J.B., RUIZ, R.O., SCARLATA, C.J., SLUITER, A.D., TEMPLETON, D.W. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, p.9043–9053, 2010.
- SPORCK, D., REINOSO, F.A.M., RENCORET, J., GUTIÉRREZ, A., DEL RIO, J.C., FERRAZ, A., MILAGRES, A.M.F. Xylan extraction from pretreated sugarcane bagasse using alkaline and enzymatic approaches. **Biotechnol Biofuels** 10:296, 2017.
- SRITRAKUL, N., NITISINPRASERT, S., KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources** 51, p.512-519, 2017.
- SUN, F. B., CHEN, H. Z. Evaluation of enzymatic hydrolysis of wheat straw pretreated by atmospheric glycerol autocatalysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 82(11), p.1039-1044, 2007.
- SUN, S., LI, M., YUAN, T., XU, F., SUN, R. Sequential extractions and structural characterization of lignin with ethanol and alkali from bamboo (*neosinocalamus affinis*) essential extractions and structural characterization of lignin with ethanol and alkali from bamboo (*neosinocalamus affinis*). **Industrial Crops and Products**. 37, 51-60, 2012.
- SUN, S., SUN, S., CAO, X., SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology** 199, p.49–58, 2016.
- SUN, X.F., SUN, R.C., FOWLER, P., BAIRD, M.S. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, p.860–870, 2005.

- TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Sciences** 9, p.1621–1651, 2008.
- TANAKA, Y., SAKAMOTO, A., INOUE, T., YAMADA, T., KIKUCHI, T., KAJIMOTO, T., MURAOKA, O., SATO, A., WATAYA, Y., KIM, H.-S., TANAKA, R. Andriolides H-P from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Tetrahedron** 68, p.3669-3677, 2012.
- TEMPLETON, D.W., SCARLATA, C.J., SLUITER, J.B., WOLFRUM, E.J. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, p.9054–9062, 2010.
- TEYMOURI, F., LAUREANO-PEREZ, L., ALIZADEH, H., DALE, B.E. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology** 96, p.2014–2018, 2005.
- THOMBAL, R. S., JADHAV, V. H. Biomass derived -cyclodextrin-SO₃H carbonaceous solid acid catalyst for catalytic conversion of carbohydrates to 5-hydroxymethylfurfural. **Applied Catalysis A: General** 499, p.213–216, 2015.
- TIAN, S.-Q., ZHAO, R.-Y., CHEN, Z.-C. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw material. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** 91, p.483–489, 2018.
- TONG, X., MA, Y., LI, Y. An efficient catalytic dehydration of fructose and sucrose to 5-hydroxymethylfurfural with protic ionic liquids. **Carbohydrate Research** 345(12), p.1698-1701, 2010.
- TYE, Y.Y., LEE, K.T., ABDULLAH, W.N.W., LEH, C.P. Potential of *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. (Kapok) fibre as a resource of second generation bioethanol: parametric optimization and comparative study of various pretreatments prior enzymatic saccharification for sugar production. **Bioresour. Technol.** 140, p.10-14, 2013.
- TYE, Y.Y., LEH, C.P., ABDULLAH, W.N.W. Total glucose yield as the single response in optimizing pretreatments for *Elaeis guineensis* fibre enzymatic hydrolysis and its relationship with chemical composition of fibre. **Renewable Energy** 114, p. 383-393, 2017.
- VALJAMAE, P., KIPPER, K., PETTERSSON, G., JOHANSSON, G. Synergistic Cellulose Hydrolysis Can Be Described in Terms of Fractal-Like Kinetics. **Biotechnology and Bioengineering** 84, 254-257, 2003.
- VALJAMAE, P., SILD, V., PETTERSSON, G., JOHANSSON, G. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a surface erosion model. **Eur J Biochem** 253:469–475, 1998.
- VAN SOEST, P.J. Use of detergents in the analysis of fibrous foods. II. A rapid method for the determination of fibre and lignin. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemists**, v.46, p.829-835, 1963.

- VELDEN, M. V., BAEYENS, J., BREMS, A. JANSSENS B., DEWIL, R. Fundamentals, kinetics and endothermicity of the biomass pyrolysis reaction. **Renewable Energy** 35, n.1, p. 232 – 242, 2010.
- WANG, H., PU, Y., RAGAUSKAS, A., YANG, B. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. **Bioresource Technology** 271, p.449–461, 2019.
- WANG, M., WU, M., HUO, H. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. **Environmental Research Letters** 2, 2007.
- WANG, Z., FENG, H. Fractal kinetic analysis of the enzymatic saccharification of cellulose under different conditions. **Bioresource Technology** 101, 7995–8000, 2010.
- WANG, Z., XU, J.-HE, FENG, H., QI, H. Fractal kinetic analysis of polymers/nonionic surfactants to eliminate lignin inhibition in enzymatic saccharification of cellulose. **Bioresource Technology** 102, 2890–2896, 2011.
- WASTOWSKI, A. D. **Química da madeira**. 1ª Edição, Rio de Janeiro: Interciência, 2018.
- WATKINS, D., NURUDDIN, M., HOSUR, M., TCHERBI-NARTEH, A., JEELANI, S. Extraction and characterization of lignin from different biomass resources. **Journal of Materials Research and Technology** 4(1), p.26–32, 2015.
- WOOLEY, R., RUTH, M., SHEEHAN, J., IBSEN, K., MAJDESKI, H., GALVEZ, A. **Lignocellulosic Biomass to Ethanol – Process Design and Economics Utilizing Co-current Dilute Acid Prehydrolysis and Enzymatic Hydrolysis – Current and Futuristic Scenarios**. NREL, Golden, 1999.
- XU, J., CHENG, J.J. Pretreatment of switchgrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. **Bioresour Technol.** 102, p.3861–3868, 2011.
- YANG, B., WYMAN, C. Pre-treatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining** 2, p.26-40, 2008.
- YANG, H., YAN, R., CHEN, H., LEE, D. H., ZHENG, C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, V.86, p.1781–1788, 2007
- YAO, M., WANG, Z., WU, Z., QI, H. Evaluating Kinetics of Enzymatic Saccharification of Lignocellulose by Fractal Kinetic Analysis. **Biotechnology and Bioprocess Engineering** 16, 1240-1247, 2011.
- YEH, A.I., HUANG, Y.C., CHEN, S.H., 2010. Effect of particle size on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose. **Carbohydr.Polym.** 79, 192–199.
- YIIN, C. L., YUSUP, S., QUITAIN, A.T., UEMURA, Y., SASAKI, M., KIDA, T. Delignification kinetics of empty fruit bunch (EFB): a sustainable and green pretreatment approach using malic acid-based solvents. **Clean Technologies and Environmental Policy** 20, p.1987–2000, 2018.
- YING, W., SHI, Z, YANG, H., XU, G., ZHENG, Z., YANG, J. Effect of alkaline lignin modification on cellulase–lignin interactions and enzymatic saccharification yield. **Biotechnology for Biofuels** 11:214, 2018.

YONG, G., ZHANG, Y. Efficient Catalytic System for the Selective Production of 5-Hydroxymethylfurfural from Glucose and Fructose. **Angewandte Chemie** 120 (48), 2008.

ZEMKE, G. W.; MORO, J. R.; GÓMEZ-PINEDA, E. A.; WINKLER-HECHENLEITNER, A. A. Benzylcellulose from a cotton residue cellulose: Characterization by thermal analyses and infrared spectroscopy. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**. V. 34, p. 197-210, 1996.

ZHANG, X. **Pretreatment of corn stover for sugar production by using the combination of alkaline reagents and switchgrass-derived black liquor**. Dissertação. North Carolina State University, 2012.

ZHANG, Y., LYND, L. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering** 88 (7), 2004.

ZHANG, Y., DEGIRMENCI, V., LI, C., HENSEN, E.J. Phosphotungstic acid encapsulated in metal-organic framework as catalysts for carbohydrate dehydration to 5-hydroxymethylfurfural. **ChemSusChem**. 4 (1), p.59-64, 2011.

ZHU, Z., REZENDE, C.A., SIMISTER, R., MCQUEEN-MASON, S.J., MACQUARRIE, D.J., POLIKARPOV, I, GOMEZ, L.D. Efficient sugar production from sugarcane bagasse by microwaveassisted acid and alkali pretreatment. **Biomass and Bioenergy** 93, p.269-278, 2016.

ZULKEFLI, S., ABDULMALEK, E., RAHMAN, M.B.A. Pretreatment of oil palm trunk in deep eutectic solvent and optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated oil palm trunk. **Renewable Energy** 107, p.36-41, 2017.

ANEXOS

Valorization of Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) Residues through Optimization of Alkaline Pretreatment to Obtain Fermentable Sugars

Leiliane do Socorro Sodré Souza,^{a,*} Anderson Mathias Pereira,^b
Marco Antônio dos Santos Farias,^c Rafael Lopes e Oliveira,^d Sérgio Duvoisin, Jr.,^d
and João Nazareno Nonato Quaresma^a

The residual peels of andiroba seeds were submitted to alkaline pretreatment that aimed to maximize the recovery of fermented sugar. Evaluation of the best operation performance *via* the reaction time variables (20, 60, and 100 min), NaOH concentration (2, 3, and 4% (m/v)), and temperature (60, 90, and 120 °C) at a fixed solids concentration of 5% (m/v) was performed. A Box-Behnken experimental design was used. Lignocellulosic material was characterized by cellulose (30.57 ± 1.00%), hemicellulose (15.08 ± 0.65%), lignin (36.02 ± 1.05%), extractives (7.49 ± 0.03%), and ash (1.53 ± 0.28%). The optimization was performed using the response surface methodology approach. The model provided a coefficient of determination (R²) of 0.95. The predicted optimal conditions for the process were a reaction time of 100 min, NaOH concentration of 4% (m/v), and temperature of 120 °C, which allowed the authors to obtain a saccharification of approximately 47.9%.

Keywords: Optimization; Hydrolysis; Andiroba; Alkaline pretreatment

Contact information: a: Natural Resources Engineering of the Amazon (PRODERNA/ITEC), Federal University of Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa, CEP 66075-110, Belém, Pará, Brazil; b: Faculty of Agricultural Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, CEP 69067-005, Manaus, Amazonas, Brazil; c: Institute of Exact Sciences, Federal University of Amazonas (UFAM), Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, CEP 69067-005, Manaus, Amazonas; d: School of Technology, State University of Amazonas (UEA), Av. Darcy Vargas, CEP 69058-807, Manaus, Amazonas, Brazil; *Corresponding author: leilianesodre@gmail.com

INTRODUCTION

The sustainable development of the Amazon region is fundamental for the preservation of various species of fauna and flora. A great many plant species have potential in the production of medicines and cosmetics, among which is Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) belonging to the Meliaceae family. These species usually produce 180 to 200 kg of seeds per plant/year, where approximately 60% of their weight is oil (Rizzini and Mors 1976); the seeds possess approximately 20% peel. Andiroba seed oil already has an established use in the pharmaceutical and cosmetics industry because of its analgesic, antibacterial, anti-inflammatory, anticancer, antitumor, antifungal ability, and anti-allergic

Brazilian Journal of Development

22718

**Estudo do processo de hidrólise ácida da casca de andiroba (*Carapa Guianensis*
Aubl.) Através da metodologia de superfície de resposta**

**Study of the andiroba bark (*Carapa Guianensis* Aubl.) Acid hydrolysis process
through the response surface methodology**

DOI:10.34117/bjdv5n11-006

Recebimento dos originais: 22/10/2019
Aceitação para publicação: 01/11/2019