

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**BIORREFINARIA FLORESTAL: UMA PROPOSTA PARA
INTEGRAÇÃO DOS PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE
NANOCELULOSE E ETANOL 2G A PARTIR DA POLPA DE
CELULOSE DE EUCALIPTO**

Thalita Jessika Bondancia

**- SÃO CARLOS, SP -
2016**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Biorrefinaria florestal: uma proposta para integração dos
processos de obtenção de nanocelulose e etanol 2G a partir da
polpa de celulose de eucalipto**

Thalita Jessika Bondancia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cristiane Sanchez Farinas

Coorientador: Prof. Dr. José Manoel Marconcini

- SÃO CARLOS, SP -

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

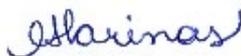
B711b Bondancia, Thalita Jessika
Biorrefinaria florestal : uma proposta para
integração dos processos de obtenção de nanocelulose e
etanol 2G a partir da polpa de celulose de eucalipto
/ Thalita Jessika Bondancia. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
137 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

1. Etanol 2G. 2. Nanocelulose. 3. Hidrólise
enzimática. 4. Biorrefinarias florestal. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE THALITA JESSIKA BONDANCIA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 29 DE FEVEREIRO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:



Cristiane Sanchez Farinas
Orientadora, UFSCar



José Manoel Marconcini
Coorientador, EMBRAPA



Teresa Cristina Zangrolami
UFSCar



Luiz Henrique Capparelli Mattoso
EMBRAPA

*À minha família, pelo apoio e compreensão.
À minha mãe (in memoriam) pelo grande exemplo de
força, fé, humanidade e honestidade. Sua vontade de viver me
inspirou a sempre buscar meus objetivos e fazer tudo com amor e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me amar incondicionalmente me permitindo à vida e todas as oportunidades durante minha jornada.

À minha mãe Maria (*in memoriam*) por um dia ter feito o melhor por mim e mesmo nas dificuldades me permitir crescer, sonhar e lutar sempre por meus objetivos.

Às pessoas mais importantes de minha vida: minhas irmãs amadas Lilyann e Michelly, meu querido Rafael e aos meus sobrinhos Gabriel e Maria por tornarem a vida simples e maravilhosa. Agradeço pelo apoio e compreensão em minhas ausências, sem o incondicional apoio de vocês não chegaria até aqui.

Aos meus avós Aparecida, Antônio e Edith. Vocês são fonte de sabedoria em minha vida.

Aos meus orientadores Dra. Cristiane Farinas e Dr. José Marconcini pela orientação, paciência e dedicação. Vocês tornaram este trabalho possível.

Agradeço ao Dr. Luiz Mattoso por me iniciar na pesquisa, pela confiança e pelo grande exemplo de ser humano e cientista.

Aos companheiros de pesquisa dos grupos de Agroenergia e LNNA, em especial a Larissa e Camila por todo auxílio em diversas situações, a Sandrinha pelos ensinamentos, Mariana, Erick, Lucas e Rodrigo pela torcida, a Adriana Pastre, Kelcilene Teodoro, Ana Carolina Correa e Alfredo Sena por todas as conversas e idéias.

À Dra. Eliangela Teixeira por um dia ter dedicado seu tempo para todos os ensinamentos, fundamentais neste trabalho.

Às minhas grandes amigas de graduação Paula, Tamyris e Bianca, pelo apoio no momento mais difícil de minha vida e por me convencerem a continuar. Agradeço também aos colegas do DEQ, Ana Clara, Gabriel e Guilhermina por toda a ajuda.

Aos funcionários da Embrapa Instrumentação em especial a Silviane, Viviane, Adriana, Paulo Lasso, Luiz Mattêo, Élita (chefinha) e Marisa.

Ao professor Dr. Antônio Cruz pela disponibilização do biorreator e ao Luciano Corrêa por me auxiliar nos experimentos com muita paciência e dedicação.

À UFSCAR por todos os anos de formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da UFSCAR por me aceitar e permitir adquirir conhecimentos que levarei pela vida.

À Embrapa Instrumentação pelo apoio técnico.

A todos que contribuíram de alguma maneira para que este trabalho acontecesse.

Sumário

AGRADECIMENTOS	4
Resumo	7
Abstract.....	8
Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	11
Lista de Siglas e Abreviações	12
1 – INTRODUÇÃO.....	14
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 - Materiais lignocelulósicos.....	17
2.1.1 – Celulose	19
2.1.2 – Hemicelulose	21
2.1.3 – Lignina.....	22
2.1.4 – O eucalipto como matéria-prima	23
2.2 - Etanol de segunda-geração.....	25
2.3 - Hidrólise Enzimática.....	27
2.3.1 – Modo de ação das celulases.....	29
2.3.2 – Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos.....	31
2.4 – Nanocelulose	32
2.4.1 – Nanofibras de celulose.....	32
2.4.2 - Nanocristais de celulose.....	34
2.4.3 – Estratégias para obtenção de nanocelulose.....	35
2.4.4 – Aplicações de nanocelulose.....	36
2.4.5 – Integração do processo de obtenção de etanol 2G e nanocelulose.....	38
2.5 – Biorreator convencional tipo tanque agitado.....	40
2.5.1 – Impelidores	41
2.5.2 – Impelidor Orelha de elefante (Elephant Ear – EE).....	42
2.5.3 – Tempo de mistura	43
2.5.4 – Consumo de potência	44
2.5.3 – Reologia dos fluidos	44
2.6 – Considerações Finais	45
3 - OBJETIVO.....	47
3.1 – Objetivos específicos.....	47
4 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 – Preparação da biomassa.....	49
4.2 – Caracterização química do substrato	49
4.2.1 - Determinação de lignina insolúvel.....	49
4.2.2 - Determinação de lignina solúvel na fração líquida	50
4.2.3 - Determinação de cinzas.....	50
4.2.4 – Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida	50
4.3 – Estudo da Hidrólise Enzimática da Celulose por Planejamento Experimental. 52	
4.3.1 – Análise da Metodologia de Superfície de Resposta e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	52
4.3.2 – Função <i>desirability</i>	52
4.4 – Procedimento Experimental da Hidrólise Enzimática.....	53
4.4.1 – Medidas de glicose e conversão	55
4.4.2 – Obtenção das superfícies de resposta e função <i>desirability</i>	55
4.4.3 – Determinação da atividade enzimática.....	55

4.4.4 – Determinação de proteínas totais.....	56
4.5 – Fermentação alcoólica.....	57
4.6 – Estudo de obtenção de nanocristais de celulose.....	57
4.6.1 – Dispersão em solução aquosa de nanocelulose.....	58
4.7 - Caracterização das amostras sólidas de nanocelulose obtidas por hidrólise enzimática.....	58
4.7.1 – Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raio X (DRX).....	58
4.7.2 – Análise da estabilidade térmica por termogravimetria.....	58
4.7.3 – Estudo da composição química por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	59
4.7.4 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)....	59
4.7.5 - Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	59
4.7.6 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)......	59
4.8 – Experimentos em biorreator.....	60
4.8.1 – Reator de tanque agitado.....	60
4.8.2 - Tempo de mistura.....	61
4.8.3 – Consumo de potência.....	61
4.8.4 – Análise reológica.....	62
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	63
5.1 – Caracterização química do substrato polpa de celulose de eucalipto.....	63
5.2 – Determinação da atividade enzimática do complexo enzimático Cellic CTec 3 [®]	63
5.3 – Determinação da concentração de proteína total do complexo enzimático Cellic CTec 3 [®]	64
5.4 – Perfil temporal da hidrólise enzimática da polpa de celulose.....	64
5.5 – Planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática.....	68
5.6 – Integração do processo de obtenção de Nanocelulose e Etanol 2G.....	77
5.7 – Validação experimental do modelo estatístico.....	78
5.8 – Fermentação alcoólica.....	80
5.9 – Nanocelulose.....	82
5.9.1 – Validação do planejamento experimental e obtenção de nanocristais de celulose (NCC).....	84
5.9.2 – Análise morfológica de nanocristais de celulose obtidos por hidrólise enzimática.....	86
5.9.3 – Análise do índice de cristalinidade por difração de raio-X (DRX).....	90
5.9.4 – Análise de grupos funcionais por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	92
5.9.5 – Análise da estabilidade térmica por termogravimetria.....	93
6 – Experimentos em Biorreator.....	96
6.1 – Determinação do tempo de mistura e rotação.....	96
6.2 – Hidrólise enzimática da polpa de celulose em biorreator.....	98
6.3 – Consumo de Potência.....	103
6.4 – Análises Reológicas.....	105
6.5 - Número de Reynolds modificado.....	109
6.6 - Nanocelulose produzida em biorreator.....	112
7 – CONCLUSÕES.....	116
8 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	118
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
10 – ANEXOS.....	133

Resumo

A utilização da polpa de celulose de eucalipto como biomassa para produção integrada de açúcares fermentescíveis e novos produtos de alto valor agregado, como a nanocelulose, se destaca como uma potencial estratégia para a implementação de biorrefinarias florestais, podendo contribuir para a diversificação do setor de papel e celulose. Nessa configuração de processo, enquanto a celulose amorfa é convertida a açúcares fermentescíveis que podem ser utilizados para a produção de etanol de segunda geração (2G), a fração residual de nanocelulose pode ser aplicada em diferentes setores, como um produto de alto valor agregado. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a viabilidade de integrar a produção de etanol 2G com a produção de nanocelulose, utilizando como matéria-prima a polpa de celulose de eucalipto. Na etapa de hidrólise enzimática da celulose foi utilizado o planejamento experimental delineamento composto central rotacional (DCCR), para avaliar os efeitos do teor de sólidos (TS), de 5 a 22% (m/v), e carga enzimática (CE), de 3 a 17 mg de proteína/g de celulose, tendo como resposta concentração de glicose e conversão de celulose. Concentrações de 45 a 130 g/L glicose foram obtidas, com conversões de celulose variando de 40 a 95%, após 24 h de hidrólise. A validação do modelo estatístico foi realizada para a condição de TS 20% e CE 10 mg/g de celulose, definida com auxílio da função *desirability* como sendo a condição ótima para obtenção de altas concentrações de açúcares fermentescíveis, associadas a um material residual para favorecer também a obtenção de nanocelulose. Os açúcares liberados na condição validada (134 g/L) foram utilizados para a produção de etanol 2G pela levedura *Sacharomyces cerevisiae*, resultando em 62,14 g/L de etanol após 8 h (rendimento de 95,5 %). O sólido residual da hidrólise enzimática apresentou características de nanofibras de celulose (NFC), de acordo com a análise por Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV – FEG). A nanocelulose resultante de todas as condições apresentou índice de cristalinidade entre 76 e 83% e temperaturas iniciais de degradação de aproximadamente 320°C. A aplicação de uma estratégia de redução de temperatura de 50 para 35°C após 24 h de hidrólise enzimática na condição de validação levaram a obtenção de nanocristais de celulose (NCC) após 144h de reação. O monitoramento do índice de cristalinidade deste material comprovou a presença de celulose altamente cristalina e com temperatura inicial de degradação em torno de 330°C. O NCC obtido apresentou comprimento de 260 nm, diâmetro de 15 nm e razão de aspecto L/D 15, características favoráveis para aplicação como reforço em materiais poliméricos. Por fim, foram realizados experimentos de hidrólise enzimática em biorreator de mistura (5L) para condições de TS 10 e 15% e CE 5 e 10 mg/g de celulose, visando à obtenção dos parâmetros para a análise do aumento de escala. Os impelidores usados foram do tipo orelhas de elefante com escoamento ascendente (EEUP) e descendente (EEDP). A rotação de 470 rpm, definida a partir da análise do tempo de mistura, foi utilizada para a determinação do consumo de potência e da viscosidade aparente no decorrer da hidrólise. O sólido residual da hidrólise na escala de 5L apresentou características de nanocelulose compatíveis com os resultados em menor escala (100 mL). Como conclusão, os resultados obtidos indicam que a integração dos processos de obtenção de etanol 2G e nanocelulose é bastante promissora e poderá contribuir para a implementação de biorrefinarias florestais e diversificação do setor de papel e celulose.

Palavras chaves: Etanol 2G, nanocelulose, hidrólise enzimática, biorrefinarias florestal.

Abstract

The use of eucalyptus kraft as biomass for an integrated production of sugars and new added-value products such as nanocellulose, stands out a potential strategy for the implementation of a forest biorefinery, that can contribute to the diversification of the paper and cellulose sector. In this process configuration, amorphous cellulose is converted into sugars that can be used for second generation ethanol (2G) production, leaving a residual fraction of nanocellulose that can be applied in various sectors as a high-value product. In this context, the objective of this study was to evaluate the viability of integration of 2G ethanol production with nanocellulose, using eucalyptus kraft pulp as raw material. In the enzymatic hydrolysis step, the experimental central composite design (CCRD) was used as a tool evaluate the effects of solids loading (SL) from 5 to 22% (w/v), and enzymatic loading (EL), from 3 to 17 mg protein/g of cellulose, on the glucose released and cellulose conversion. Glucose concentrations from 45 to 130 g/L with conversions from 40 to 95% were obtained after 24 hours of enzymatic hydrolysis. The validation of the statistical model was performed at SL 20% and EL 10 mg/g cellulose, defined using desirability function as the optimum condition for obtaining high concentrations of sugars associated with residual material to favor the production of nanocellulose. The sugars released using the selected optimum condition (134 g/L) were used to produce 2G ethanol by fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*, resulting in 62.14 g/L ethanol after 8 h (yield 95.5%). For all of the conditions evaluated, the residual solids presented cellulose nanofiber (NFC) characteristics, according to analysis by Scanning Electron Microscopy with Field Emission (SEM - FEG). Nanocellulose presented crystallinity index between 76% and 83% with initial degradation temperature around 320°C. The use of a temperature reduction strategy from 50 to 35 ° C after 24 hours of enzymatic hydrolysis allowed to obtain cellulose nanocrystals (NCC) after 144h reaction. The crystallinity index of this material confirmed the presence of highly crystalline cellulose with initial degradation temperature around 330°C. The NCC showed length of 260 nm and diameter 15 nm, with aspect ratio L/D 15. Such characteristics are adequate for application as reinforcement in polymeric materials. Finally, enzymatic hydrolysis experiments were made in a stirred tank reactor (5L) using SL of 10 and 15% and EL of 5 and 10 mg/g cellulose, in order to obtain the parameters required to scale-up. The impeller used was the *up-pumping* and *down-pumping* Elephants Ears. The rotation of 470 rpm, defined by performing mixing time test, was used to evaluate the power consumption and apparent viscosity during of hydrolysis reaction. The residual solids of the hydrolysis at 5L scale presented nanocellulose with similar characteristics to the smaller scale (100 mL). In conclusion, the results obtained here showed that the integration of the processes for nanocellulose and 2G ethanol production is very promising and could contribute to implementation of the forest biorefineries and diversification of cellulose and pulp sector.

Keywords: 2G Ethanol, nanocellulose, enzymatic hydrolysis, forest biorefineries.

Lista de Figuras

Figura 1 - Celulose nas fibras vegetais por hierarquização da madeira adaptado de (Eichhorn, 2011).....	17
Figura 2 - Estrutura da parede celular (adaptado(Barnett e Bonham, 2004).....	19
Figura 3 - Representação molecular da unidade repetitiva da celulose (celbiose).....	20
Figura 4 - Estruturas presentes na hemicelulose.	21
Figura 5 - Estrutura dos álcoois (a) ρ -cumarílico, (b) coniferílico e (c) sinapílico, precursores da lignina.	23
Figura 6 - Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol 2G.....	26
Figura 7 - Modo de ação das celulases na degradação enzimática (adaptado (Zhang, Himmel e Mielenz, 2006).....	30
Figura 8 - (a) Representação de nanofibra de celulose (arquivo próprio); (b) Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de nanofibra de celulose de bagaço de cana apresentada por (Campos, A., Correa, A. C., <i>et al.</i> , 2013).....	33
Figura 9 - (a) Representação de nanocristais de celulose; (b) Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de nanocristais de celulose apresentado por Samir, Alloin e Dufresne, 2005.	34
Figura 10 - Biorreator de tanque agitado (adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor)	41
Figura 11 - (a) impelidor de escoamento descendente (EEDP); (b) impelidor de escoamento ascendente (EEUP) – Fonte: arquivo próprio.....	42
Figura 12 - Fluxograma simplificado das etapas do trabalho.....	48
Figura 13 - Unidade experimental (a) 1 - banho termostático; 2 - inversor de frequência; 3 -motor; 4 - dinamômetro; 5 - reator; 6 - impelidores; 7 - chicanas. (b) Dimensões do biorreator - Adaptado de Corrêa, Cruz e Badino (2016).	60
Figura 14 - (a) - Impelidores com suas dimensões (adaptado de Corrêa, Cruz e Badino (2016)) (b) impelidores EEDP e EEUP (arquivo próprio).	61
Figura 15 - Concentração de glicose (g/L) liberada em função do tempo (h) durante a hidrólise enzimática da polpa de celulose.	66
Figura 16 - Conversão de celulose (%) em função do tempo de hidrólise (h) para a polpa de celulose em diferentes condições.....	66
Figura 17 - Concentração de glicose para cada experimento do planejamento experimental em 24h de reação.	70
Figura 18 - Conversão de celulose (%) para cada condição estudada no planejamento experimental em 24h de hidrólise enzimática.	70
Figura 19 - (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno obtidas para a variável glicose em função do teor de sólidos e da carga enzimática.	72
Figura 20 - (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno obtidas para a variável conversão de celulose em função do teor de sólidos e da carga enzimática.	74
Figura 21 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sólido residual da hidrólise. (a) Polpa de celulose; (b) TS 20%, CE 15; (c) TS 20%, CE 5; (d) TS 15%, CE 10; (e) TS 10%, CE 15; (f) TS 10%, CE 5; (g) TS 22%, CE 10; (h) TS 8%, CE 10; (i) TS 15%, CE 17;(j) TS 15%, CE.	76
Figura 22 - Simulação para valores alvo de cada variável.	78
Figura 23 - Consumo de glicose e produção de etanol em função do tempo.	80
Figura 24 - Aspecto coloidal do sólido residual da hidrólise enzimática da condição TS 20%, CE 10 mg/g de celulose após dispersão em água (arquivo próprio).	82

Figura 25 - MEV-FEG para condições do planejamento experimental (a) TS 15%, CE 10; (b) TS 10%, CE 5.	83
Figura 26 - Influência da temperatura na cristalinidade e na concentração de glicose em função do tempo.	84
Figura 27 – MEV-FEG das NCC para condição TS 20, CE 10 - (a) 24 h; (b) 48h; (c) 72h e (d) 96 h; (e) 120 h; (f) 144 h.	87
Figura 28 - MET para NCC de condição TS 20%, CE 10 e 144h. Escalas: (a) 100nm; (b) 200nm e (c) 500 nm.	88
Figura 29 - Difratogramas de raio X para as diferentes condições de hidrólise enzimática.	90
Figura 30 - Espectrogramas de FTIR para polpa de celulose e condição de validação do planejamento experimental (TS 20%, CE 10) em diferentes tempos de hidrólise para temperatura de 35°C.	92
Figura 31 - (a) Termogramas da polpa de celulose e de NFC para condição TS 20, CE 10 em diferentes tempos de reação; (b) DTG da polpa de celulose e de NFC para condição TS 20, CE 10, em diferentes tempos de reação. Atmosfera: ar sintético.	94
Figura 32 - Tempo característico de reação em diferentes rotações para a configuração de impelidores EEUP-EEDP em diferentes rotações.	96
Figura 33 - Produção de glicose em função do tempo de hidrólise enzimática da polpa de celulose para diferentes condições realizadas em biorreator a 50°C, pH 5.0 e 470 rpm.	99
Figura 34 - Conversão de celulose em glicose para a hidrólise enzimática da polpa de celulose realizada em biorreator.	100
Figura 35 - Efeito caverna durante a hidrólise enzimática.	101
Figura 36 - Consumo de potência em função do tempo de hidrólise para os experimentos de 10% de TS, 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.	103
Figura 37 - Consumo de potência em função do tempo para o experimento de 15% de TS 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.	104
Figura 38 - Viscosidade aparente em função do tempo de hidrólise.	106
Figura 39 - Taxa de cisalhamento média em função do tempo de hidrólise para 10% e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.	107
Figura 40 - Índice de consistência em função do tempo de hidrólise enzimática da polpa de celulose em 10 e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.	108
Figura 41 - Índice de comportamento de escoamento em função do tempo de hidrólise 10 e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.	108
Figura 42 - MEV-FEG da nanocelulose obtida em biorreator: (a) TS 10%, CE 5 – 24h; (b) TS 10%, CE 5 – 48 h; (c) TS 10%, CE 10 – 24h; (d) TS 10%, CE 10 – 48h; (e) TS 15%, CE 10 – 24h; (f) TS 15%, CE 10 – 48h; (g) TS 15%, CE 10 – 24h.	113

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Teores de celulose, lignina e hemicelulose de algumas fibras vegetais. (Adaptado de Rowell, Han e Rowell, 2000).....	18
Tabela 2 - Diferenças entre celulose e hemicelulose (Adaptada de Pereira Jr., Couto e Santa Anna, 2008)	22
Tabela 3 – Fonte de celulose e características morfológicas de NCC.....	35
Tabela 4 - Variáveis independentes do planejamento, níveis reais e codificados.....	54
Tabela 5 - Matriz codificada para a hidrólise enzimática.....	54
Tabela 6 - Composição química da polpa de celulose usada na hidrólise enzimática ...	63
Tabela 7 - Diluições do complexo enzimático Cellic CTec 3® e as respectivas liberações de glicose.....	64
Tabela 8 - Matriz codificada para hidrólise enzimática da polpa de celulose com o extrato enzimático comercial Cellic Ctec 3, em 24 h de reação, com pH 5,0 e temperatura 50°C.....	69
Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para variável resposta concentração de glicose.....	71
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para variável concentração de glicose	72
Tabela 11 - Coeficientes de regressão obtidos para variável conversão de celulose	73
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para variável conversão	74
Tabela 13 - Condições utilizadas na validação experimental do modelo estatístico.....	79
Tabela 14 - Valores preditos e valores experimentais obtidos para condição de ótimo do processo	79
Tabela 15 - Número de Reynolds modificado em função do tempo de hidrólise	110
Tabela 16 - Índice de Cristalinidade para nanocelulose produzida em biorreator	114

Lista de Siglas e Abreviações

Símbolo	Definição	Unidade
CE	Carga Enzimática	(mg proteína/g celulose)
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional	(-)
D	Desirability global	(-)
D _i	Diâmetro do impelidor	(m)
D _T	Diâmetro do tanque	(m)
DRX	Difração de raio X	(-)
EE	Impelidor orelha de elefante (<i>Elephant Ear</i>)	(-)
EEDP	Impelidor <i>Elephant Ear down-pumping</i>	(-)
EEUP	Impelidor <i>Elephant Ear up-pumping</i>	(-)
E _y	Rendimento de etanol	(%)
F	Força	(N)
g	Aceleração da gravidade	(m/s ²)
H	Altura do reator	(m)
H _T	Altura total do reator	(m)
H _{TC}	Altura do termopar	(m)
HMF	Hidroximetilfurfural	(-)
IC	Índice de Cristalinidade	(%)
IR	Infravermelho	(-)
K	Índice de consistência	(Pa.s ⁿ)
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura	(-)
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo	(-)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão	(-)
N	Frequência de rotação	(rps ou rpm)
n	Índice de comportamento de escoamento	(-)
NC	Nanocelulose	(-)
NFC	Nanofibras de celulose	(-)
NCC	Nanocristais de celulose	(-)
N _p	Número de potência	(-)
P	Potência	(W)
Q	Produtividade de etanol	(g/L.h)
Re _m	Número de Reynolds modificado	(-)

STR	Stirred tank reactor	(-)
T	Torque	(N.m)
Ti	Temperatura inicial de degradação	(°C)
t _m	Tempo de mistura	(s)
TS	Teor de sólidos	(%)
TG	Termogravimetria	(-)
V	Volume	(L ou m ³)
Y	Fator rendimento de etanol	(-)
μ _{ap}	Viscosidade aparente	(mPa.s)
ρ	Densidade do líquido	(kg/m ³)
ω	Velocidade angular	(rad/s)
•γ _m	Taxa média de cisalhamento	(1/s)
2G	Segunda geração	(-)

1 – INTRODUÇÃO

O conceito de biorrefinaria apesar de ser definido de formas distintas por alguns setores, expressa a idéia consensual de integração de processos de conversão de biomassa, com vistas a produzir combustíveis, energia e produtos químicos. Ou seja, o conceito é análogo ao das refinarias de petróleo, nas quais a partir do petróleo são gerados diferentes produtos derivados para as mais diversas aplicações, de forma integrada e otimizada. O conceito de biorrefinarias industriais tem sido identificado como a rota mais promissora para a criação de novas indústrias do futuro.

Recentemente, alguns estudos vêm sendo realizados propondo a aplicação do conceito de biorrefinaria ao setor florestal, visando à diversificação do setor de papel e celulose (Frederick et al., 2008; Hytoenen & Stuart, 2009; Mariano, 2015; Rafione et al., 2014; Van Heiningen, 2006). Isso se deve à busca pelas empresas do ramo da produção de celulose de expandir seus negócios para novos e diversificados mercados, como uma forma de gerar rendimentos extras, além de ser uma alternativa econômica frente às oscilações de mercado (Mariano, 2015). Segundo dados da Associação Brasileira de Celulose e papel (ACELPA), 100% da produção de celulose e papel no Brasil tem como origem florestas plantadas de eucalipto e pinus. E com os avanços no manejo florestal, a indústria brasileira de celulose e papel tornou-se mundialmente competitiva, colocando o Brasil entre os principais produtores. Ainda assim, cerca de 30% da produção de resíduos celulósicos no país correspondem àqueles originados das florestas de eucalipto, sendo a casca dessa planta responsável por 10 a 12% desse resíduo. Essa casca da planta de eucalipto contém cerca de 20% (m/m) de açúcares hexoses com potencial para geração de até 100 litros de etanol celulósico por massa seca, sendo um potencial recurso renovável para suplementar uma biorrefinaria florestal (Bragatto, 2010; Mariano, 2015). Além do aproveitamento de resíduos florestais ou agroindustriais para produção do etanol celulósico, a geração de outros produtos de maior valor agregado é uma alternativa promissora para contribuir para a viabilidade das biorrefinarias florestais.

Dentre as possíveis rotas tecnológicas para a conversão de biomassa nas biorrefinarias, a rota bioquímica, na qual se inclui a catálise enzimática e a fermentação, vem sendo considerada como a rota mais promissora devido às condições de operação mais brandas e a alta eficiência de conversão. Ou seja, a rota bioquímica é altamente vantajosa tanto do ponto técnico quanto ambiental, sendo compatível com as demandas da atual bioeconomia. A produção de etanol celulósico pela rota bioquímica inclui uma etapa de pré-

tratamento da biomassa para posterior conversão de celulose em glicose, por meio da hidrólise enzimática, seguido pela etapa de fermentação que resulta em etanol. A biomassa lignocelulósica é altamente recalcitrante, o que faz necessário uso de pré-tratamentos adequados, a fim de facilitar a ação enzimática para conversão da celulose em glicose. Devido a essa elevada recalcitrância, o rendimento da produção de etanol por biomassa é em torno de 40%, resultando em alto teor de resíduo sólido. O resíduo da hidrólise enzimática contém celulose altamente cristalina, já que as enzimas degradam prioritariamente a parte amorfa da celulose. Uma alternativa interessante para aplicação deste resíduo é a obtenção de nanocelulose, que é um material de elevado valor agregado e com aplicações em diferentes setores industriais. Pesquisas recentes que abordam o tema relacionado à integração de processos de produção de etanol celulósico e a obtenção de nanocelulose tem demonstrado o potencial dessa rota tecnológica para matérias-primas diversas (Zhu *et al.*, 2011; Oksman *et al.*, 2011; Tsukamoto *et al.*, 2013; Le Normand *et al.*, 2014; Mathew *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2015).

Devido à arquitetura da celulose é possível a obtenção de nanocelulose em diferentes formas tais como: nanofibras de celulose e nanocristais de celulose (também reportados como *whiskers* de celulose ou *nanowhiskers* de celulose). A nanocelulose é proveniente da remoção da parte amorfa da celulose, resultando em um material altamente cristalino, de pequeno diâmetro e comprimento alongado e de elevada área superficial. Dentre as diferentes aplicações da nanocelulose, destaca-se o uso como reforços mecânicos em materiais poliméricos, resultando em aumentos significativos nas propriedades de resistência mecânica e térmica dos materiais (Angles e Dufresne, 2001; Oksman *et al.*, 2006; Teodoro, K. B. R., *et al.*, 2013; Campos, A. D. *et al.*, 2013). Diversos outros campos de aplicações para nanocelulose têm sido relatado: utilização em diferentes ramos da medicina (Dugan, Gough e Eichhorn, 2010; Gatenholm e Klemm, 2010; Petersen e Gatenholm, 2011; Lin e Dufresne, 2014; Teixeira *et al.*, 2014), em fármacos (Brewster *et al.*, 2004; Van Speybroeck *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2015), em revestimento de sensores (Mattoso *et al.*, 2009), em embalagens poliméricas (Azeredo, 2009), em membranas para purificação de água (Ma *et al.*, 2011), em membranas separadoras de íons lítio em baterias (Chun *et al.*, 2012) dentre outras aplicações.

O processo de obtenção de nanocelulose pode ser realizado por tratamentos químicos, mecânicos ou enzimáticos. A obtenção de nanocristais de celulose de diferentes fontes de celulose pelo processo de hidrólise ácida já vem sendo amplamente reportada na literatura (Bondeson, Mathew e Oksman, 2006; Oksman *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2010;

Teixeira *et al.*, 2011). Também tem sido explorada a obtenção de nanocelulose por associações de processos, tais como a hidrólise enzimática seguida de sonicação, homogeneização de alta pressão seguida de hidrólise enzimática (Zhu, Sabo e Luo, 2011), e por fibrilação mecânica com uso de um moinho de discos e posterior hidrólise enzimática para obtenção de nanocristais de celulose (Teixeira *et al.*, 2015). Além dos já citados, outros estudos para obtenção de nanocelulose usando a rota enzimática foram relatados, sendo alguns trabalhos realizados por processos enzimáticos seguidos de hidrólise ácida (Paakko *et al.*, 2007; Satyamurthy *et al.*, 2011) e outros usando exclusivamente a rota enzimática com auxílio de processos mecânicos (Henriksson *et al.*, 2007; Filson, Dawson-Andoh e Schwegler-Berry, 2009; Woehl *et al.*, 2010; George *et al.*, 2011; Zhu, Sabo e Luo, 2011; Meyabadi e Dadashian, 2012; Song *et al.*, 2014; Tibolla, Pelissari e Menegalli, 2014; Teixeira *et al.*, 2015).

Dada a importância e potencial de aplicação da nanocelulose, a produção integrada deste produto de alto valor agregado com a produção de etanol celulósico pode vir a contribuir para a implementação das biorrefinarias florestais. No entanto, ainda não foram encontrados estudos focados no desenvolvimento deste bioprocessos do ponto de vista da engenharia bioquímica, isto é, com o objetivo de otimização do bioprocessos e obtenção de parâmetros para ampliação de escala, tais como consumo de potência em biorreator de tanque agitado.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a viabilização de uma proposta de biorrefinaria florestal visando à integração dos processos de obtenção de nanocelulose e açúcares fermentescíveis para produção de etanol celulósico a partir da polpa de celulose de eucalipto como matéria-prima, utilizando como ferramenta o planejamento experimental. Também foi avaliada neste trabalho a viabilidade de aumento de escala do processo utilizando um biorreator do tipo tanque agitado (5L) para validar as condições selecionadas no planejamento experimental para a produção de nanocelulose em uma escala 50 vezes maior.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são derivados de fontes naturais e renováveis, são de baixo custo, baixas densidades, apresentam alta resistência mecânica e alta reatividade química o que lhes permite amplas aplicações. São comumente chamados de “materiais lignocelulósicos” por apresentarem matriz básica de celulose, hemicelulose e lignina. A biomassa lignocelulósica é altamente recalcitrante devido a esta complexa estrutura de lignina e uma matriz de polissacarídeos, cuja função é proteger a celulose de ataques químicos, enzimáticos e de microorganismos. Outros fatores como a cristalinidade também contribuem para recalcitrância da celulose, sendo necessários pré-tratamentos para aumentar a digestibilidade celulósica (Zhao, Zhang e Liu, 2012). A Figura 1 mostra a hierarquização da madeira, estruturada em parede vegetal, microfibrilas, componentes não celulósicos e celulose.

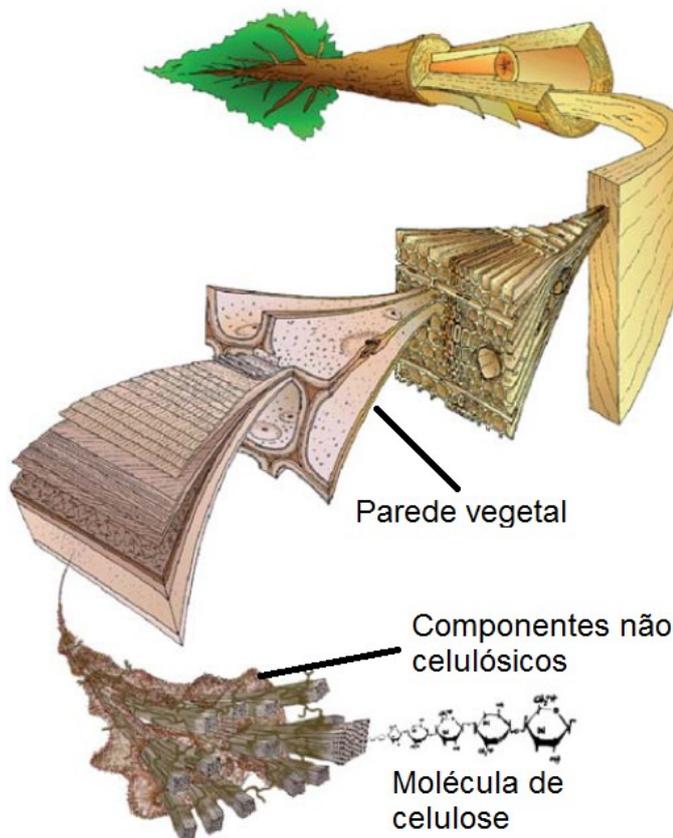


Figura 1 - Celulose nas fibras vegetais por hierarquização da madeira adaptado de (Eichhorn, 2011).

O teor dos constituintes do material varia de acordo com a fonte lignocelulósica e essa diferença é evidenciada na Tabela 1. Além disso, outros fatores podem afetar as propriedades das fibras e os valores dos constituintes de uma mesma fonte devido fatores como: a idade da planta, diferentes regiões de uma mesma planta, condições climáticas e do solo e localização geográfica onde foi cultivada (Rowell, Han e Rowell, 2000).

Tabela 1 - Teores de celulose, lignina e hemicelulose de algumas fibras vegetais. (Adaptado de Rowell, Han e Rowell, 2000)

Fibra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Algodão	85 – 96	1 – 3	0,7 – 1,6
Arroz	28 – 38	23 – 28	12 – 16
Aveia	31 – 48	27 – 38	16 – 19
Bagaço de cana	32 – 48	27 – 32	19 – 24
Bambu	26 – 43	15 – 26	21 – 31
Madeira (conífera)	40 – 45	7 – 14	26 – 34
Sisal (agave)	43 – 62	21 – 24	7 – 9

As fibras celulósicas estão organizadas em camadas, e a divisão é constituída por parede primária (P), lamela média e parede secundária (S). A lamela média está presente entre as paredes primárias da celulose e é a parte da fibra que contém a maior porção de lignina associada com hemicelulose, pectina e celulose. A parede secundária é subdividida em S1, S2 e S3, que diferenciam entre si pela espessura e pelo ângulo de orientação das microfibrilas com relação ao eixo da fibra. A camada S1 tem espessura entre 100 e 200 nm e ângulo próximo de 90°; a camada mais grossa encontra-se em S2, com ângulo entre 0° e 45° com espessura entre 0,5 e 8 µm, nesta região há presença de lignina. Por fim, a camada S3 tem entre 70 e 100 nm de espessura e esta localizada na região interna próximo ao lúmen, que está situado no miolo central da fibra. A Figura 2 está uma representação estruturação da parede celular da celulose (Fratzl e Weinkamer, 2007; Gandini e Belgacem, 2008).

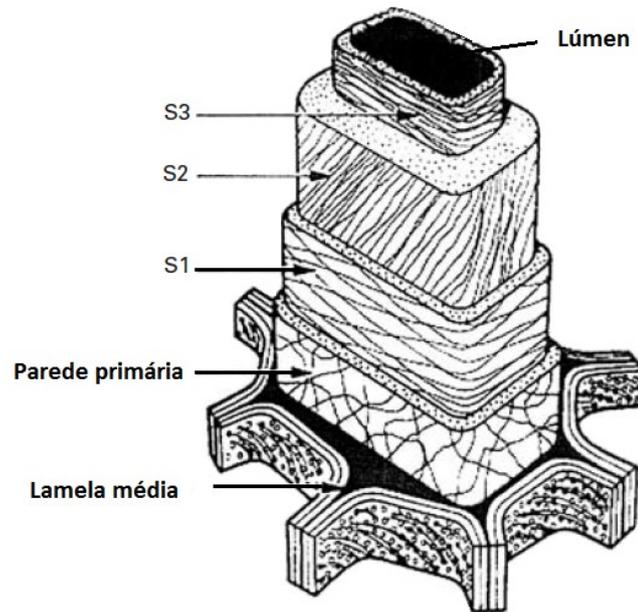


Figura 2 - Estrutura da parede celular (adaptado de Barnett e Bonham, 2004).

Abaixo é apresentada a descrição dos componentes principais dos materiais lignocelulósicos.

2.1.1 – Celulose

Entre 1837 e 1842 o químico Anselm Payen dedicou estudos a composição das plantas, a qual descobriu ser uma substância uniforme, composta por resíduos de glicose e que em 1839 foi nomeada celulose pela academia francesa. A relação qualitativa entre celulose e glicose foi observada em 1819 por Braconot e posteriormente por outros cientistas que observaram que a hidrólise da celulose por ácido resultava em glicose (Hon, 1994). Desde então a celulose tem sido extensivamente estudada com relação a aspectos estruturais e de biossíntese, cujas descobertas têm inspirado a cada dia novas pesquisas (Habibi, Lucia e Rojas, 2010).

A celulose é a base estrutural das plantas e também pode ser encontradas em outros organismos, como fungos, algas e bactérias (Klemm *et al.*, 2005). Atualmente (2014) a produção mundial de celulose é estimada na ordem de 166 mil toneladas (Bracelpa, 2014). Substância resistente e insolúvel em água que confere estabilidade a parede celular, a celulose é o polímero de maior quantidade nas fontes vegetais. Estruturada em fibras, a molécula de celulose é um homo polissacarídeo linear e não ramificado, que contém de 10 a 15 mil unidades de D-glicose de configuração β . Sua estrutura é nativa da união de moléculas de β -D-glicose através de ligações β -1,4-glicosídicas carbono-carbono, e que contém muitos

grupos hidroxilas, fazendo com que a quantidade de água contida neste material seja baixa, já que as ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose saturam a capacidade de formação desse tipo de ligação. Os polímeros β -D-glicose da celulose são formados por anéis através de ligação glicosídica, que por sua conformação “cadeira” (mais estável e com livre rotação de 180° em relação às subunidades vizinhas) forma uma cadeia linear e estendida, que permite uma rede estabilizadora de pontes de hidrogênio inter e entre cadeias conferindo fibras estáveis e com grande resistência a tensão. Ao longo do polímero de celulose, a unidade de repetição é a celobiose, formada por moléculas de glicose que esta representada na Figura 3 (Nelson e Cox, 2002; Kumar *et al.*, 2009).

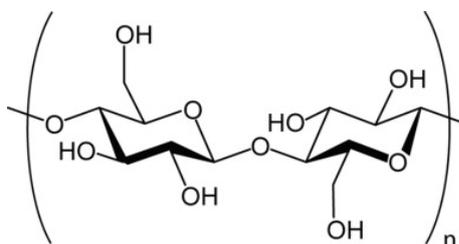


Figura 3 - Representação molecular da unidade repetitiva da celulose (celobiose).

Na biomassa vegetal, a celulose pode estar na forma cristalina, altamente organizada e com os átomos em posições fixas e discretas com relação ao outro, tornando a impenetrável, inclusive por água. A celulose pode ser encontrada também na forma amorfa, que tem menor organização, com defeitos estruturais que podem ser na forma de pequenos poros, espaços vazios suficientes para permitir a entrada de moléculas maiores, como é o caso enzimas celulolíticas, sendo a celulose amorfa é mais susceptível a degradação alcalina, química ou enzimática (Lynd *et al.*, 2002).

O cristal de celulose pode estar em sua forma nativa, do tipo I, e subdividida em I_α , que corresponde à estrutura triclinica, e a forma I_β , correspondente à estrutura monoclinica. I_α pode ser convertida irreversivelmente em I_β , a forma mais estável. Ambas as formas apresentam-se paralelamente, com variação de interações de hidrogênio. Diferentes tratamentos químicos ou térmicos na celulose I podem originar diferentes polimorfos da celulose, sendo II, III, IV e a celulose tipo I e II são as mais estudadas. A celulose II é resultado de tratamento com NaOH, com cadeias de celulose orientadas anti paralelamente, o que permite maior estabilidade deste polimorfo quando comparada a de tipo I (Lima e Borsali, 2004; Klemm *et al.*, 2005).

2.1.2 – Hemicelulose

As hemiceluloses são caracterizadas como um polissacarídeo complexo solúvel tanto em soluções alcalinas quanto em soluções ácidas e correspondem entre 20 e 40% da composição mássica da planta, sendo que a estrutura química varia de acordo com a planta, tipo de tecido e o estágio de desenvolvimento (Pereira Jr., Couto e Santa Anna, 2008). A hemicelulose é formada por uma grande variedade de blocos de pentoses (xilose, arabinose e ramnose), hexoses (galactose, glucose e manose) e ácidos urônicos (4-O-metilglucurônicos, ácido galacturônico) (Ramos, 2003). Os constituintes da hemicelulose são apresentados na Figura 4.

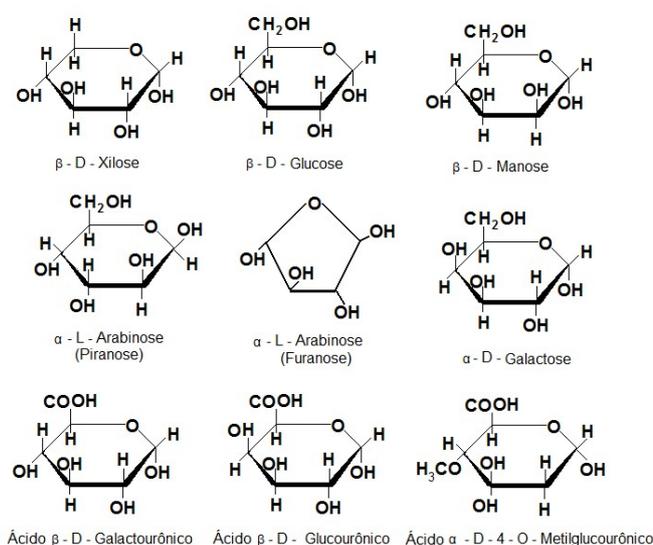


Figura 4 - Estruturas presentes na hemicelulose.

A xilana, um dos principais constituintes da hemicelulose, tem como subclasse xiloglicanas e β -glicanas. Em madeiras duras (hardwood), a xilana pode chegar a 30% da composição, em contrapartida em madeiras macias (softwood) o principal constituinte são glucomanas e apenas uma pequena fração de xilana em sua composição (Ramos, 2003).

A estrutura da hemicelulose está associada com a matriz da celulose, resultando em uma grande estabilidade a esta matriz (Ramos, 2003; Spiridon e Popa, 2008). Hemiceluloses possuem estruturas amorfas e de maior susceptibilidade a ataques químicos quando comparada à celulose. A Tabela 2 apresenta as principais diferenças entre as estruturas de celulose e hemicelulose, importantes para definição dos objetivos no aproveitamento das matérias primas seja na produção de etanol celulósico, ou mesmo na produção de outras espécies químicas.

Tabela 2 - Diferenças entre celulose e hemicelulose (Adaptada de Pereira Jr., Couto e Santa Anna, 2008)

Celulose	Hemicelulose
Unidades de glicose unidas entre si	Unidades de diferentes pentoses e hexoses ligadas entre si
Alto grau de polimerização (2000 a 18000 unidades de glicose)	Baixo grau de polimerização (50 a 300 unidades de açúcares)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões amorfas e cristalinas	Apresenta somente regiões amorfas
É atacada lentamente por ácido inorgânico diluído a quente	É atacada rapidamente por ácido inorgânico diluído a quente
Insolúvel em álcalis	Solúvel em álcalis

2.1.3 – Lignina

A lignina é uma macromolécula de estrutura complexa, desordenada e altamente ramificada também presente nas fibras, cuja função é a de conferir resistência mecânica, protegendo a celulose da planta contra ataques de microrganismos. Este biopolímero faz parte de um dos maiores estoques de carbono da natureza, sendo uma fonte potencial de importantes insumos para a indústria química, por apresentar um valioso estoque de estruturas químicas aromáticas. Partindo da lignina é possível produzir diversos produtos. Atualmente o foco das pesquisas tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia. Os principais constituintes da lignina são derivados de uma mistura de álcool p-cumarílico, coniferílico e sinapílico apresentados na Figura 5 (Pereira Jr., Couto e Santa Anna, 2008).

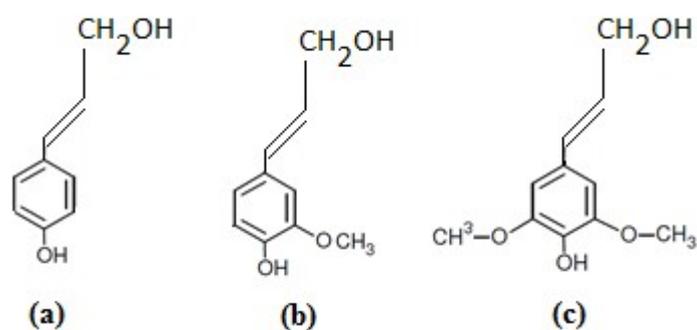


Figura 5 - Estrutura dos álcoois (a) p-cumarílico, (b) coniferílico e (c) sinapílico, precursores da lignina.

A lignina não pode ser convertida diretamente a etanol por um processo biológico (Larsen *et al.*, 2008). Além disso, a presença de lignina nas fibras vegetais constitui um inconveniente para hidrólise enzimática, como já discutido neste trabalho (Ko *et al.*, 2015). Assim, tratamentos para remoção da lignina devem anteceder aos processos enzimáticos. Estes tratamentos podem ser ácidos, por explosão a vapor, alcalinos, por solventes como etanol entre outros (Larsen *et al.*, 2008).

2.1.4 – O eucalipto como matéria-prima

A produção de etanol no Brasil é proveniente em sua maioria da cana-de-açúcar, porém é inegável a importância do estudo da produção de etanol por outras fontes de biomassa, devido à grande diversidade de matéria-prima presente no país, agregando valores a grande quantidade de resíduos gerados. É importante que a produção de etanol celulósico não se concentre apenas no bagaço de cana, tendo como algumas justificativas o aproveitamento dos resíduos diversos gerados em regiões do Brasil; a minimização dos custos nos transporte do etanol, concentrando a produção na matéria prima local; a mitigação do impacto ambiental da colheita da cana de açúcar, que se processa por meio das queimadas; aplicação no tempo de ociosidade das usinas no período de entressafra da cana-de açúcar e por fim, geração de empregos e crescimento local de economia (Machado, Zangirolami e Adriano, 2009).

No ramo da produção de celulose de eucalipto, empresas tem buscado expandir seus negócios para novos e diversificados mercados como produtos de biorrefinaria florestal e também a produção de nanocelulose (Mariano, 2015). No Brasil a produção de resíduos celulósicos corresponde a 30% das florestas de eucalipto sendo a casca dessa planta responsável por 10 a 12% desse resíduo. A casca da planta contém 20% w/w de açúcares hexoses solúveis com potencial para geração de até 100 litros de etanol por material seco da casca, sendo fonte com capacidade para suplementar uma biorrefinaria florestal (Bragatto,

2010; Mariano, 2015). O aproveitamento de resíduos florestais ou agroindustriais é alternativa promissora para produção do etanol de 2G ou para a geração de outros produtos de valor agregado, haja visto a abundância destes materiais e suas características renováveis.

A gama de oferta lignocelulósica brasileira coloca o país entre os maiores produtores de celulose mundial. No primeiro semestre de 2015, a produção foi de 8,1 milhões de toneladas, alta de 3,5% comparada ao mesmo período de 2014. Dentre as fontes de celulose estão árvores plantadas de eucalipto, correspondente a 98% da produção do país (Iba, 2015).

Planta nativa da Austrália, o eucalipto possui centenas de diferentes espécies, em que as mais utilizadas no mundo são: *E.grandis*, *E. camaldulensis*, *E. tereticornis*, *E.globulus*, *E. urrophylla*, *E. viminalis*, *E. saligna* e *E. citriodora*. As diferentes espécies de eucalipto (do gênero *Eucalyptus*) têm grande diversidade de propriedades, sendo que a seleção da espécie para plantio é feita de acordo com as condições climáticas e de solo (Moura e Garcia, 2000).

Devido ao clima favorável do Brasil, o eucalipto oferece grandes vantagens para produção de celulose quando comparado a outras plantas mundiais, apresenta menor ciclo de crescimento e em apenas sete anos atinge cerca de 35 metros, estando pronto para utilização (Bracelpa, 2010).

As fibras de eucalipto são de característica curta e rígida, sendo as mais curtas entre as plantas de madeira dura das espécies mundiais. Tem comprimento médio de 0,65 mm, e sua granulação (peso dividido pelo comprimento) está entre a menor do mercado de celulose (Belluzo, Frischtak e Laplane, 2014). A composição química do eucalipto varia entre 46-49% de celulose, 18-23% de hemicelulose, 29-33% de lignina, 0,1-0,2% de cinzas e 2-5% de extrativos (De Carvalho *et al.*, 2015). Um processo de branqueamento muito utilizado pela indústria de papel e celulose é o processo Kraft. A polpação química pelo processo Kraft utiliza uma solução a quente (170°C) de hidróxido de sódio e sulfeto de sódio, a qual degradam hemicelulose e lignina (Moraes De Moura, Foelkel e Frizzo, 2002). Polpas de celulose branqueadas pelo processo Kraft tem sido reportadas com diferentes teores de carboidratos, tendo sido reportados por Zhu e colaboradores (2009) teores de celulose de 92,9%, 5,7% de hemicelulose e 1,2% de lignina. Teixeira e colaboradores (2015) reportaram teor de celulose de 73%, hemicelulose 13% e lignina 8%. As variações encontradas são referentes à eficiência do processo de polpação, bem como da quantidade inicial presente na madeira (Foelkel, 2007).

A produção de celulose oriunda de fibra de eucalipto passou a ser estudada na década de 40 pela empresa Cia. Melhoramentos, tendo sucesso em 1946 com a produção de 45 mil kg até o final daquele ano. Com políticas de incentivo fiscal, na qual se intensificou o plantio de florestas, em 1966, foram plantados 470 mil hectares de eucalipto em todo Brasil, fatos estes marcantes na preservação de espécies nativas, já que a produção de celulose tem se limitado a matéria prima do eucalipto (Moura e Garcia, 2000).

Apesar da produção de celulose se concentrar em florestas plantadas, alguns países ainda utilizam florestas nativas, como é o caso da América do Norte, alguns países asiáticos e europeus. No Brasil esta produção parte essencialmente das espécies de eucalipto de florestas plantadas, localizada principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Pará e Maranhão. As florestas brasileiras contêm aproximadamente 530 milhões de hectares de florestas nativas, 43,5 milhões de hectares em Unidades de Conservação Federal e 4,8 milhões de hectares de florestas plantadas com espécies de eucalipto (Bracelpa, 2010).

2.2 - Etanol de segunda-geração

A produção de etanol tanto de primeira geração, a partir do caldo de cana-de-açúcar, quanto de segunda geração (2G), a partir de biomassas lignocelulósicas, pela rota bioquímica vem sendo consideradas promissoras, tanto do ponto de vista econômico como ambiental. A abundância de resíduos lignocelulósicos gerados no país viabiliza a utilização de biomassas lignocelulósicas na produção de etanol, sendo de interesse social e econômico a aplicabilidade deste material, que tem seu final visto como um custo adicional no processo de produção (Pereira Jr., Couto e Santa Anna, 2008).

Apesar de já vir sendo bastante estudada a tecnologia de produção de etanol 2G (também chamado de etanol celulósico), foi em 2014 que se iniciou a produção dos primeiros litros em plantas pioneiras, que ainda devem sofrer alterações e evoluções no processo de escalonamento. Em muitos países como EUA, China, Brasil e alguns países da União Europeia, tem havido atenção especial do governo e de empresas para viabilizar comercialmente o etanol 2G (Milanez *et al.*, 2015).

Em 2014 foram inauguradas as primeiras plantas de geração de etanol 2G, a Bioflex 1 em São Miguel dos Campos (AL) pertencente a empresa GranBio e a Usina São Manoel, em São Manuel (SP) associada a Copersucar. Apesar de produzirem etanol 2G, a geração nessas usinas não são exclusivas deste combustível, sendo voltado também na produção de outros produtos. A primeira usina brasileira de etanol 2G com produção em

escala comercial e exclusiva na produção de etanol começou a operar em julho de 2015 em Piracicaba (SP) pela empresa Raízen, com capacidade de produção de 42 milhões de litros por ano. A produção anual das três usinas deve chegar em 127 milhões de litros. Além das três usinas existentes, até 2024, oito usinas de etanol 2G devem entrar em operação e a produção estimada será de 1 bilhão de litros por ano. A inauguração destas usinas concretiza a utilização desta tecnologia no país elevando a produtividade de etanol, sem a necessidade do aumento das áreas cultivadas (Unica, 2015).

A expectativa mundial é de que até 2020, o número de usinas de etanol 2G chegue a pelo menos 15 (Siqueira, 2015). A China tem previsão de construir a maior usina de etanol 2G do mundo (sem previsão de data), onde esperam ser capazes de converter de 970 mil a 1 milhão e 300 mil toneladas de resíduos agrícolas em etanol e subprodutos (Siqueira, 2014). Outro pioneiro da produção de etanol 2G, os EUA desde 2014 tem em operação três usinas em escala comercial, totalizando uma produção estimada de 305 milhões de litros/ano. As usinas pertencem a empresas DuPont, Abengoa e Poet-DSm, respectivamente localizadas em Nevada, Iowa, com capacidade de 115 milhões de litros/ ano, em Hogoia, Kansas, com produção de 95 milhões de litros/ ano e em Emmtsburg, Iowa, com capacidade de produção de 95 milhões de litros/ ano (Nyko, 2015).

O processo de produção de etanol 2G inclui diferentes etapas, que podem ser utilizadas em diferentes configurações. Em um processo típico, a primeira etapa consiste no preparo e pré-tratamento da matéria-prima visando disponibilizar a celulose para o ataque enzimático. O processo de pré-tratamento pode ser térmico, físico, químico ou biológico. A etapa seguinte consiste na hidrólise enzimática para produção de glicose. Por fim, a glicose é fermentada, resultando em etanol que é finalizado com o processo de destilação (Wyman, 1994; Sanchez e Cardona, 2008; Gupta e Verma, 2015).

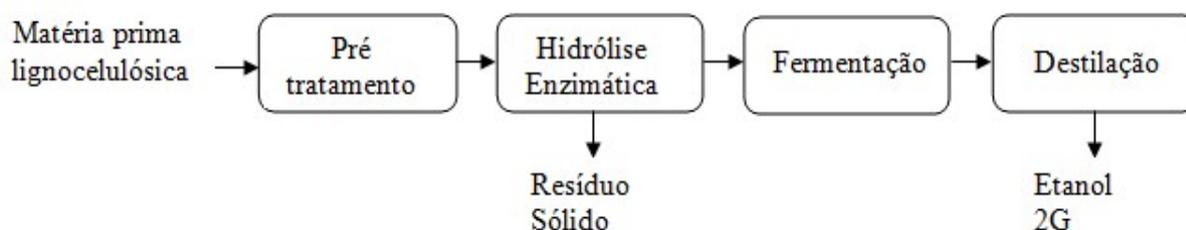


Figura 6 - Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol 2G.

Algumas estratégias têm sido amplamente utilizadas em processos de produção de etanol celulósico, dentre elas hidrólise separada de fermentação (SHF) e sacarificação e

fermentação simultânea (SSF). No processo de SHF a hidrólise e a fermentação acontecem em reatores separados, em que uma vez completada a etapa de hidrólise da celulose, a glicose obtida é levada para a fermentação e produção de etanol. Uma das principais vantagens do processo SHF é poder otimizar a operação de cada etapa (principalmente temperatura e pH). A etapa de hidrólise tem suas condições definidas baseadas na melhor condição de atuação das enzimas, sendo pH entre 4,5 e 5,0 e temperatura entre 45 e 50°C, já a etapa de fermentação tem como condições de temperatura entre 30 e 40°C e pH entre 4,5 e 6,5, dependendo do microrganismo de fermentação (Sun e Cheng, 2002; Sanchez e Cardona, 2008; Chun *et al.*, 2012). A principal dificuldade deste processo reside na possibilidade de inibição de algumas enzimas pelas altas concentrações de produtos da hidrólise enzimática, podendo decorrer em hidrólise incompleta da celulose (Sun e Cheng, 2002).

Em SSF hidrólise e fermentação acontecem no mesmo reator, os microrganismos de fermentação convertem imediatamente glicose formada no processo de hidrólise, gerando etanol. Uma das vantagens deste processo é evitar o acúmulo de produtos celobiose e glicose no meio, evitando inibição de algumas enzimas (Cardona, Quintero e Paz, 2010). Outra vantagem deste processo está na redução de custos com reator, pela utilização de um único sistema para hidrólise e fermentação (Sun e Cheng, 2002). Dentre as desvantagens do processo SSF está em não ter como utilizar a melhor condição de temperatura e pH para celulasas e microrganismo de fermentação. A *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na fermentação alcoólica, capaz de fermentar hexoses, mas não pentoses. A atuação ótima da *S.cerevisiae* está entre 38°C, condição diferente das relatadas para atuação das enzimas (Sun e Cheng, 2002). A inibição enzimática por produtos da fermentação também pode ocorrer, porém a inibição por glicose tem maior efeito (Jorgensen *et al.*, 2007).

Dentre os estudos que devem ser realizados buscando a melhor condição para obtenção de etanol estão os fatores que influenciam na etapa de hidrólise enzimática da biomassa, como o tipo e a concentração do substrato, a atividade das enzimas e os parâmetros da reação, tais como temperatura e pH. A escolha do coquetel enzimático, as condições globais e a estratégia do processo industrial, bem como as características da biomassa lignocelulósicas também devem ser investigadas buscando melhor desempenho para produção de etanol (Cannella e Jorgensen, 2014).

2.3 - Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos é realizada por ação sinérgica de enzimas de um complexo celulolítico, cuja especificidade faz com que a celulose

seja convertida em açúcares fermentescíveis. A sinergia entre celulases, hemicelulases e ligninases auxilia na obtenção de maiores rendimentos da etapa de sacarificação, permitindo a redução da carga de celulases no processo (Hu, Arantes e Saddler, 2011).

As enzimas celulases e hemicelulases podem ser obtidas por bactérias ou fungos. Os microrganismos podem ser mesofílicos ou termofílicos, aeróbios ou anaeróbios (Sun e Cheng, 2002; Van Dyk e Pletschke, 2012). Entre as bactérias, pode se citar as *Cellulomonas*, *Streptomyces* e *Thermomonospora* (Sun e Cheng, 2002). Dentre os principais microrganismos estudados para produção de celulases destacam-se os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (Delabona *et al.*, 2012). Muitos preparados de celulases comerciais são produzidos por *Trichoderma* spp. e por *Aspergillus niger* (Zhang e Lynd, 2004). O tipo de celulase secretada varia de acordo com cada microrganismo, sendo o fungo *Trichoderma reesei* secretor de celulases, xilanases e outras importantes enzimas capazes de degradar a parede celular da biomassa lignocelulósica. As linhagens de *Aspergillus* são importantes na produção de enzimas hemicelulolíticas e celulolíticas, compondo um versátil microrganismo na produção de celulases, hemicelulases e esterases, tendo elevado potencial para aplicação em processos de produção de etanol (Pirota, Baleeiro e Farinas, 2013).

Além das características do coquetel enzimático, para melhores rendimentos da reação de hidrólise, é importante observar alguns fatores de grande importância, como temperatura, agitação, tempo de reação, pH e concentração de substrato no meio. Enzimas trabalham em condições moderadas quando fora da faixa de melhor atuação. Alguns parâmetros como temperatura e pH podem afetar a eficiência enzimática, já que alterações na conformação da molécula podem dificultar a interação da enzima com o substrato, diminuindo o rendimento do processo ou mesmo, levando a desnaturação da enzima envolvida (Nelson e Cox, 2002).

Dentre os fatores que afetam a acessibilidade enzimática da celulose, a presença de lignina torna-se inconveniente, já que ela pode adsorver a celulase, limitando a eficiência da sacarificação (Ko *et al.*, 2015). A lignina também cria uma barreira física para a hidrólise, sendo que a remoção da lignina e da hemicelulose permite o aumento da porosidade do substrato, aumentando a susceptibilidade da celulose à hidrólise (Mansfield, Mooney e Saddler, 1999). Outro problema que pode afetar o rendimento da sacarificação é a diminuição da atividade enzimática por inibição do complexo celulásico pelo acúmulo de glicose e

celobiose, produtos da hidrólise, o que as tornam fatores limitantes na eficiência do processo de hidrólise (Hsieh *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de processos mais eficientes não se deve apenas a enzimas, também é necessário conhecimento acerca das características de organização e composição do material, bem como mecanismos envolvidos na degradação enzimática da biomassa (Jorgensen, Kristensen e Felby, 2007).

2.3.1 – Modo de ação das celulases

As celulases são divididas em três grandes grupos: exo-1,4- β -D-glicanases, endo-1,4- β -D-glicanases e β -glicosidase, também conhecidas como exoglicanases, endoglicanases e celobiase, respectivamente (Ladisich *et al.*, 1983). As enzimas podem ser processivas e não processivas, sendo enzimas processivas aquelas cuja associação enzima-substrato é responsável por vários cortes consecutivos em uma única cadeia de polissacarídeo (Horn *et al.*, 2012).

As exo-1,4- β -D-glicanases hidrolisam terminais redutores (quando a glicose possui uma hidroxila heterosídica livre) e não redutores (quando a hidroxila heterosídica da molécula da extremidade participa da ligação com a glicose adjacente) da cadeia de celulose. Exoglicanases possuem enzimas 1,4- β -glicana glicohidrolases (também conhecidas como celodextrinas), capazes de liberar glicose diretamente da cadeia de celulose. Outra classe de enzima presente em exoglicanases é a 1,4- β -glicano celobiohidrolase (celobiohidrolases), que participa da hidrólise primária da celulose, sendo responsável pelo processo de amorfogênese, que se refere à fase inicial da sacarificação em que a celulose inacessível ao substrato sofre uma ruptura física expondo as cadeias internas das microfibrilas. A amorfogênese torna amorfas as regiões cristalinas da celulose, permitindo o acesso facilitado da celulase (Lynd *et al.*, 2002; Castro e Pereira Jr, 2010). As celobiohidrolases são divididas em CBH I e CBHII, que são enzimas que hidrolisam terminais redutores e terminais não redutores da celulose microcristalina, respectivamente (Lynd *et al.*, 2002).

As endoglicanases atuam em regiões internas da estrutura amorfa da celulose, produzindo oligossacarídeos de baixamassa molecular e celobiose. Esta classe de enzima possui sítios catalíticos na forma de fenda, mais aberta quando comparada ao sítio catalítico das exoglicanases, permitindo atuação em qualquer ponto da cadeia celulósica, inclusive nas regiões cristalinas, porém não tão efetivamente. Cadeias na superfície da celulose são clivadas randomicamente pelas endoglicanases, no mecanismo sinérgico exo-endo, fornecendo sítios adicionais, para atuação de celobiohidrolases (Teeri, 1997; Ogeda e Petri, 2010).

Por fim, β -glicosidades catalisam oligossacarídeos solúveis e celobiose em glicose. Conforme o aumento da celobiose e glicose, uma gradual redução da atividade enzimática pode ocorrer, já que estes podem ser produtos de inibição do complexo celulolítico. Celobiose exerce efeito de inibição mais expressivo que glicose, assim dentre as estratégias adotadas, tem-se a adição em excesso de β -glicosidades e utilização de correntes de reciclo para remoção da glicose (Ladisich *et al.*, 1983; Sun e Cheng, 2002).

A atuação em sinergia das celulases apresentadas leva a um melhor rendimento quando comparadas a atuação individual (Castro e Pereira Jr, 2010). Os tipos de sinergismo conhecidos são a sinergia endo-exoglicanases, as endoglicanases disponibilizam terminais redutores e não redutores para atuação de CBHI e CBHII; sinergia exo-exoglicanases no qual CBHI e CBHII hidrolisam terminais redutores e não redutores liberados por ação de endoglicanases; sinergia exo- β -glicosidase e endo- β -glicosidase em que celobiohidrolase e endoglicanases liberam como produtos celobiose e oligossacarídeos para atuação das β -glicosidades (Castro e Pereira Jr, 2010). Na Figura 7 é apresentada uma representação do sinergismo de atuação dessas enzimas.

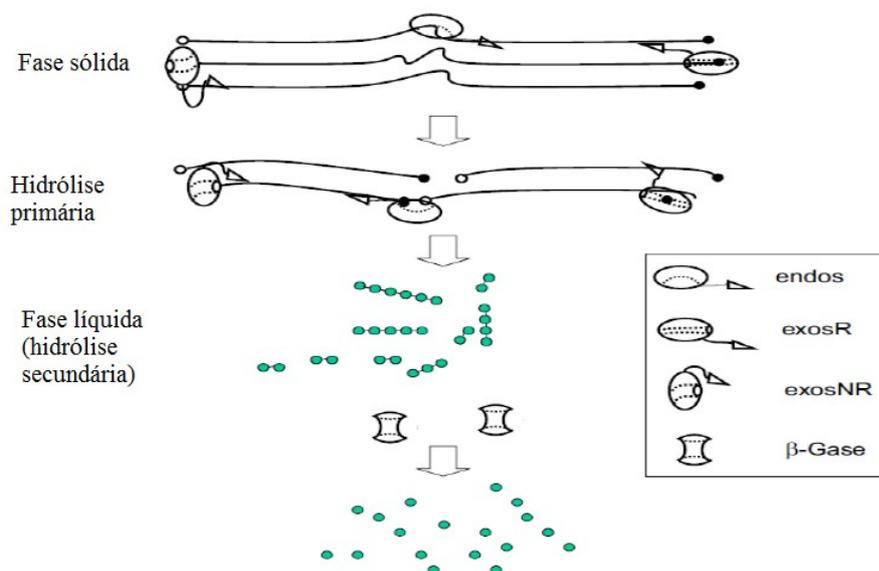


Figura 7 - Modo de ação das celulases na degradação enzimática (adaptado (Zhang, Himmel e Mielenz, 2006)).

A eficiência da hidrólise depende da formação do complexo enzima-substrato. Para que a enzima possa ser reutilizada é necessária a completa hidrólise do substrato, ocorrendo a liberação da enzima que poderá se adsorver a novos substratos (Boussaid e Saddler, 1999). A adsorção da enzima pode ser produtiva e não produtiva. A adsorção

produtiva é a adsorção da enzima na celulose e produção de glicose, a improdutiva refere-se à adsorção da enzima na lignina ou outros produtos, impedindo acesso ao substrato. É sugerido que a ligação improdutiva entre lignina e celulase se dá por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Celulases de *T. reesei* possuem resíduos de aminoácido hidrofóbicos em sua superfície, o que permite interação com a superfície hidrofóbica da lignina. Adsorção improdutiva diminui o rendimento da reação, sendo necessárias elevadas doses enzimáticas, aumentando os custos do processo (Palonen *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2015).

2.3.2 – Hidrólise enzimática com alto teor de sólidos

A hidrólise enzimática com alta concentração de substrato (alto teor de sólidos) na produção de etanol torna o processo interessante economicamente, melhorando a competitividade com combustíveis derivados de petróleo. O aumento da concentração de sólidos eleva a concentração de açúcares passíveis de fermentação para produção de etanol, reduzindo custos do processo com a menor quantidade de água, redução de equipamentos e energia no processo de destilação, tornando o processo viável quando comparados a baixos e médios teores de sólido (Kim *et al.*, 2008; Kristensen, Felby e Jorgensen, 2009).

No entanto, em reações de hidrólise com elevados teores de sólidos, a falta de água disponível é um dos principais desafios. A água permite a ação das enzimas, o contato entre enzima e substrato e auxilia na difusão dos produtos para longe dos sítios catalíticos, além de diminuir a viscosidade do meio, podendo levar a maiores velocidades de reação. Outro desafio é que altas cargas de sólido podem resultar em maior concentração de inibidores, prejudicando o desempenho nos processos de fermentação (Jorgensen *et al.*, 2007; Kristensen, Felby e Jorgensen, 2009).

O acesso da enzima ao substrato depende da homogeneização entre as fases. Para melhorar a mistura e aumentar a conversão em reações com alta carga de sólidos, agitação vigorosa é necessária, porém as forças de cisalhamento podem levar a desnaturação enzimática. Em escala piloto, cargas entre 15 e 20% têm sido o máximo alcançado devido à elevada viscosidade, que gera um problema reológico, tornando a mistura inadequada aumentando o tempo de liquefação, levando a hidrólise ineficaz e elevando o consumo energético em tanques agitados. Tais desafios levam a necessidade de investigações no âmbito de novas tecnologias para aplicação em larga escala e desenvolvimento de enzimas mais eficazes e resistentes, visando sempre processos com maior rendimento, redução do tempo de reação e menor gasto energético (Jorgensen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009).

Kristensen e colaboradores (2009) estudando a influência de alguns fatores limitantes da hidrólise enzimática da celulose verificaram que a hidrólise em altos teores de sólido leva a significativa redução de velocidade nas primeiras horas de sacarificação. Os autores puderam verificar que o aumento da carga de sólidos reduz a adsorção da enzima no substrato, e o aumento das concentrações de glicose e celobiose inibiram a celulase levando a menores rendimentos de glicose, sendo a inibição enzimática uma das explicações da limitação do aumento de sólidos. Por fim, estudando a influência da concentração de água no meio reacional, os autores substituíram parte da solução aquosa do meio reacional por álcool oleico, visando executar a hidrólise com diferentes proporções de água aumentando ou diminuindo a viscosidade da reação. Com a substituição de 25% da porção de água (tampão) na hidrólise, foi constatada uma diminuição em torno de 6% de glicose em relação à hidrólise sem adição de álcool oleico. Isso mostra que a água desempenha importante papel na hidrólise e que algumas funções se tornam crucial em sistemas sem água livre.

Apesar dos problemas citados, o processo de obtenção de etanol com alto teor de sólidos ainda é viável devido à alta concentração de açúcares solúveis, assim um desafio para tornar o processo exequível economicamente é encontrar a relação concentração de substrato que acarrete em maiores taxas de conversão, com menor custo (Modenbach e Nokes, 2013).

2.4 – Nanocelulose

Com o avanço da nanotecnologia, o biopolímero celulose na forma de nanocelulose tem atraído atenção para aplicações no desenvolvimento de novos materiais. A celulose é encontrada em escala nanométrica, cuja fonte é a celulose nativa. Está dividida em três tipos: (1) nanofibras de celulose (NFC), também designadas como celulose microfibrilada (MFC) ou celulose nanofibrilada (CNF); (2) nanocristais de celulose (CNC), também chamados de (nano) *whiskers* de celulose (CWN); (3) celulose bacteriana (BC) ou celulose microbiana (Eichhorn, 2011; Lin e Dufresne, 2014). A seguir são descritas as duas formas de nanocelulose de interesse deste trabalho.

2.4.1 – Nanofibras de celulose

Nanofibras de celulose (NFC) são materiais alongados e flexíveis, com comprimento na ordem de micrômetros e diâmetros entre 10 e 100 nm, com alta razão de aspecto que podem ser obtidas por tratamento químico, mecânico, enzimático, podendo ser

produzida separadamente ou por associação de processos (Hubbe *et al.*, 2008). A preparação de nanofibras consiste na remoção da fase amorfa da celulose, resultando em celulose cristalina, porém interligadas por porção amorfa (Figura 8).

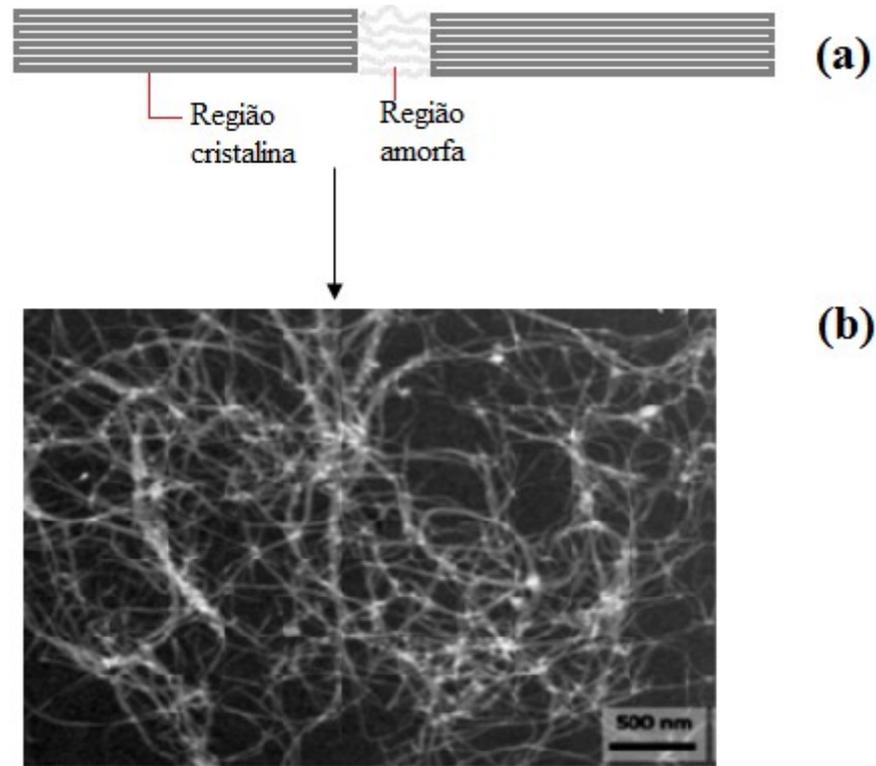


Figura 8 - (a) Representação de nanofibra de celulose (arquivo próprio); (b) Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de nanofibra de celulose de bagaço de cana apresentada por Campos, A., Correa, A. C., *et al.*, 2013.

A obtenção de NFC por desintegração da celulose resulta em soluções com alta viscosidade e a estabilidade dessa suspensão de aspecto coloidal depende da dimensão e da dispersão das partículas. Altas densidades de grupos hidroxilas em nanoestruturas de celulose faz com que haja a formação de aglomerados pela interação de hidrogênio entre as cadeias de celulose, a utilização de ácidos como sulfúrico para a hidrólise, permitem maior estabilidade da suspensão e menor formação de aglomerados, quando comparada a soluções não carregadas, como é o caso de soluções de ácido clorídrico ou quando se utilizam processos enzimáticos (Dufresne, 2012). Devido às características hidrofílicas da celulose, as NFC podem não ser dispersas em soluções apolares, levando a necessidade de modificações químicas visando abranger maior campo de aplicação (Missoum, Belgacem e Bras, 2013).

Por suas características, as NFC atraem atenção por ter elevada área superficial, alta relação do comprimento pelo diâmetro L/D (razão de aspecto), boas

características térmicas e mecânicas, com baixa expansão térmica e alto módulo elástico (Klemm *et al.*, 2011; Deepa *et al.*, 2015).

2.4.2 - Nanocristais de celulose

Os nanocristais de celulose (NCC) são outra importante estrutura nanocelulósica, pois apresentam alta rigidez, alta resistência mecânica e baixa densidade (Siqueira, Bras e Dufresne, 2009). Os NCC são constituídos por estrutura predominante cristalina, com comprimento entre 100 e 500 nm e diâmetro entre 10 e 30 nm. Na Figura 9, uma representação da estrutura de nanocristais de celulose e imagem de microscopia eletrônica de transmissão é apresentada, previamente descrita por Samir, Alloin e Dufresne, 2005. A característica morfológica de NCC é dependente não só do processo de obtenção aplicado, como também da fonte celulósica (Habibi, Lucia e Rojas, 2010). A Tabela 3 apresenta algumas fontes de celulose e as características morfológicas obtidas.

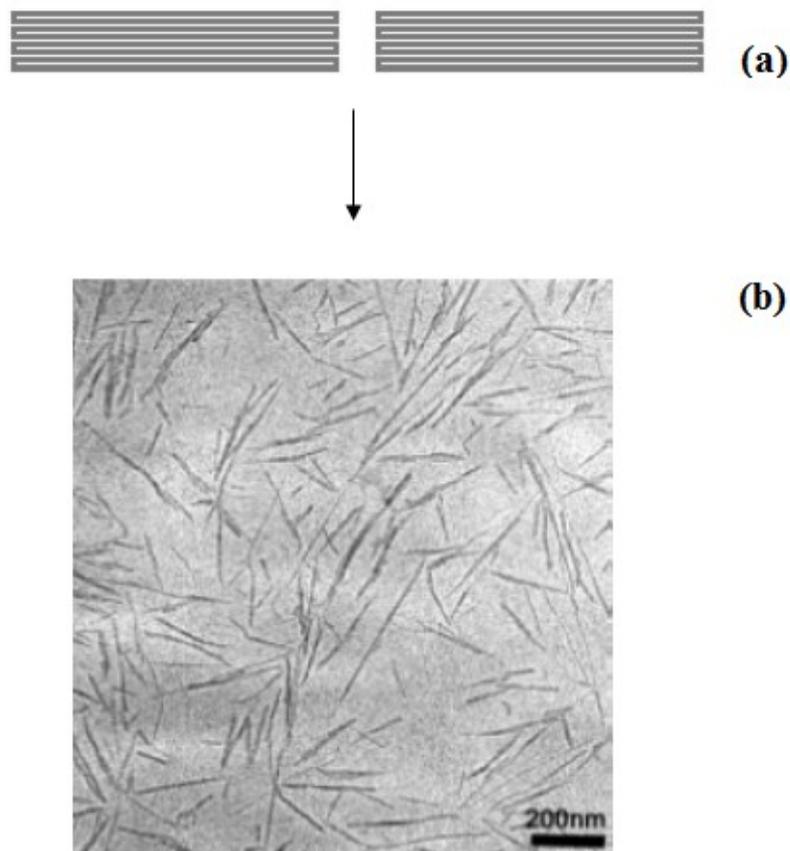


Figura 9 - (a) Representação de nanocristais de celulose; (b) Micrografia eletrônica de transmissão (MET) de nanocristais de celulose apresentado por Samir, Alloin e Dufresne, 2005.

Tabela 3 – Fonte de celulose e características morfológicas de NCC

Fonte	L/nm	D/nm	L/D	Referência
Polpa de eucalipto	145-175	11 - 6	12 - 24	(Tonoli <i>et al.</i> , 2012) (Mesquita, 2012)
Bagaço de cana	255	4	64	(Teixeira <i>et al.</i> , 2011)
Sisal	250	4	64	(Teodoro <i>et al.</i> , 2011)
Algodão	150	14	11	(Teixeira <i>et al.</i> , 2010)

O desempenho de materiais que recebem matriz de reforço depende das características da fonte aplicada como reforço. A razão de aspecto L/D é importante, já que quanto maior esta relação, melhor é a capacidade de sustentação mecânica, por permitir a maior interação superficial. Em contrapartida, a dispersão de materiais com alta relação de aspecto (L/D) é mais complicada, limitando sua aplicação (Klemm *et al.*, 2011).

As propriedades cristalinas de NCC conferem rigidez a matriz polimérica aplicada. A estrutura cristalina impermeável dificulta a infiltração e difusão de moléculas como água, por exemplo, o que permite propriedade de barreira em polímeros (Ng *et al.*, 2015). Além das propriedades citadas, a estabilidade térmica também é de interesse na aplicação de NCC, já que baixas estabilidades térmicas tem impacto no comportamento de nanocompósitos. Altas temperaturas iniciais de degradação são esperadas para os NCC devido às altas temperaturas requeridas no processamento de materiais poliméricos (Dufresne, 2012).

A obtenção de nanocristais de celulose é realizada principalmente por métodos químicos, de hidrólise ácida, nos quais há a completa remoção da fase amorfa gerando estruturas agulhadas e altamente cristalinas. Alternativamente, a obtenção de NCC pode ser realizada por hidrólise enzimática dada à especificidade de enzimas celulases na degradação de material amorfo (Henriksson *et al.*, 2007).

2.4.3 – Estratégias para obtenção de nanocelulose

Suspensões aquosas de nanocelulose oriundas de fibras lignocelulósicas podem ser preparadas por hidrólise ácida com prévio tratamento das fibras para remoção de lignina e hemicelulose.

O processo de hidrólise ácida consiste em submeter às fibras de celulose em ácido, que pode ser ou por ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou ácido clorídrico (HCl), sob condições controladas de tempo e temperatura visando a remoção do material amorfo e preservando os

segmentos cristalinos. As propriedades dos NCC estão fortemente relacionadas com o controle das variáveis de tempo de reação, temperatura e o tipo de ácido empregado. Quando a hidrólise é realizada com ácido clorídrico, os nanocristais tendem a se agregar, devido à ausência de cargas envolvidas. Em contrapartida, quando ácido sulfúrico é utilizado na hidrólise, as cargas negativas na superfície das NCC, apresentadas devido à formação de éter-sulfatos, geram repulsão eletrostática entre as partículas facilitando a dispersão em água, o que irá influenciar nas propriedades ópticas do material resultante (Beck-Candanedo, Roman e Gray, 2005; Samir, Alloin e Dufresne, 2005).

Outra maneira de obtenção de nanocelulose é por hidrólise enzimática, que se apresenta como alternativa ambientalmente interessante, devido à realização em condições brandas de temperatura, sem a geração de resíduos ácidos. O processo enzimático deve garantir que apenas a região amorfa seja degradada. Dentre as variáveis que irão influenciar a eficiência da hidrólise, fatores como tempo de reação, carga e tipo de enzima e concentração de substratos podem garantir a melhoria do processo (Meyabadi e Dadashian, 2012).

Combinado a processos enzimáticos, métodos mecânicos de homogeneização a alta pressão tem sido reportados, visando facilitar a fibrilação da celulose para aumentar o acesso da enzima às fibras (Duran *et al.*, 2011).

2.4.4 – Aplicações de nanocelulose

O interesse da aplicação de nanocelulose em compósitos é baseado em suas ótimas propriedades mecânicas como alto razão de aspecto, sua natureza renovável e devido a gama de fontes celulósicas disponíveis na natureza. Compósitos consistem na combinação de materiais em um sistema multifásico de propriedades combinadas de uma matriz e uma fase dispersa. As propriedades dos compósitos são função das propriedades das fases constituintes em termos de quantidade e geometria, forma, tamanho, distribuição e orientação dessas partículas (Callister Jr., 1940).

Nanocompósitos são formados por compósitos que possuem como cargas de reforço materiais em escala nanométrica. As características mecânicas da nanocelulose (módulo elástico em torno 100 GPa para nanofibras de celulose e em torno de 150 GPa para nanocristais de celulose), associadas com a elevada área superficial, boa estabilidade térmica, capacidade de barreira, acarretam em ganho de propriedades, mesmo quando adicionadas em pequenas quantidades (Hubbe *et al.*, 2008). O desenvolvimento de embalagens biodegradáveis usando a nanocelulose como agente de reforço constitui uma aplicação ambientalmente correta (Azeredo, 2009).

Além de aplicações em materiais poliméricos, a nanocelulose tem sido testada em diferentes áreas da medicina. Lin e Dufresne (2014) apresentaram as principais aplicações neste segmento, nos quais testes de toxicidade mostraram a possibilidade de aplicação de nanocelulose em carreadores de fármacos, inovando o ramo da nanomedicina. A utilização em materiais antimicrobianos também foi empregada, sendo que a nanocelulose associada a metais antibacterianos, como a prata, fornece uma rede porosa benéfica para aplicação de antibióticos e medicamentos. Aplicações de nanocelulose em medicina contribuem para aplicação em regeneração e reparação de tecidos, excipiente de fármacos e também como substituinte de vasos sanguíneos em cirurgias coronárias.

A indústria farmacêutica também pode utilizar a nanocelulose, por meio da exploração de nanocristais de celulose. Nanocristais de celulose possuem a capacidade de se ligar a antibióticos solúveis em água, de maneira que a velocidade de liberação destes fármacos pode ser controlada por meio do uso de surfactantes. Esse material mostrou-se eficiente ao se ligar em agentes anticancerígenos hidrofóbicos e a liberação controlada desta droga, permitiu a eficiente penetração em células cancerígenas (Duran, Lemes e Seabra, 2012).

Duran e colaboradores (2012) apresentaram uma série de patentes com funções para a nanocelulose relatando aplicações na indústria de cosméticos, na medicina, em indústria de embalagens, como biocatalisadores dentre outros. A aplicação de nanofibras de celulose na indústria de cosméticos também tem sido explorada e foi reportada na patente EP1057477A1 (Duran, Lemes e Seabra, 2012), na qual descreve a preparação de uma emulsão de óleo em água sem a adição de surfactantes, contendo nanofibras de celulose, para remoção de maquiagem, limpeza de pele e cabelo e limpezas a seco de peles sensíveis.

Devido à capacidade de aglomeração quando obtidas por métodos enzimáticos e a alta cristalinidade da nanocelulose, este material tem despertado o interesse para utilização como agente de barreira, já que a difusão de moléculas entre os materiais celulósicos é limitada. Neste sentido, a nanocelulose pode atuar como camadas de barreira em membranas purificadoras. O alto desempenho de fluxo deste material, mostrou que a associação de nanocelulose com membranas purificadoras superam a capacidade de barreira de membranas convencionais. Além disso, a elevada área superficial associada com cargas negativas de nanocelulose obtidas por processos ácidos permitem a adsorção de alguns vírus e bactérias, sendo importante para tornar água própria para consumo (Ma *et al.*, 2011). Ainda neste contexto, Dufresne e seus colaboradores (2000) relataram que a aplicação de nanofibras de

celulose levou a menor absorção de água em filmes de amido e pectina, confirmando este nanocompósito como agente de barreira para umidade.

As aplicações apresentadas evidenciam a importância da nanocelulose, indicando que estas estruturas são promissoras no desenvolvimento de novos materiais, em diversas áreas tecnológicas.

2.4.5 – Integração do processo de obtenção de etanol 2G e nanocelulose

Com a tendência mundial de redução dos produtos derivados do petróleo, novos produtos de origem renovável têm sido estudados. Neste contexto, biorrefinarias florestais podem colaborar na produção de novos materiais associados à produção de combustíveis como o etanol integrados à produção de diferentes produtos dando novo cenário a indústrias de celulose.

Estudos da obtenção de nanocelulose integradas ao processo de obtenção de etanol 2G têm sido relatados na literatura com utilização de diferentes substratos, por hidrólise ácida ou hidrólise enzimática usando diferentes tipos de enzimas.

Oksman e colaboradores (2011) estudaram o aproveitamento do resíduo de uma planta piloto de produção de etanol proveniente de madeira para obtenção de nanowhiskers (ou nanocristais) de celulose. O resíduo do processo foi submetido a uma etapa de pré - tratamento para remoção da lignina e hemicelulose e em seguida foi submetido às seguintes etapas: (1) ultrassonificação, (2) homogeneização a alta pressão e (3) hidrólise ácida. O resíduo após ultrassonificação apresentou índice de cristalinidade de 14,5%, seguido de 73,0, 77,4 e 74,6% para cada etapa do processo citado, respectivamente. Além disso, para cada etapa do processo de obtenção de nanocelulose o material obtido apresentou boa estabilidade térmica. A estabilidade térmica dos nanowhiskers obtidos pelos autores por processos mecânicos de ultrassonificação e homogeneização a alta pressão apresentaram maior estabilidade térmica quando comparada aos nanowhiskers obtidos por ácido sulfúrico. A análise morfológica do material apresentou diâmetro entre 10 e 20 nm, evidenciando a presença de nanowhisiker. Os autores concluíram ser viável a utilização do resíduo do processo de etanol, sendo possível agregar valores a este material.

Visando a obtenção de NFC resultante do processo de obtenção de etanol, Zhu e colaboradores (2011) submeteram polpa de celulose de eucalipto Kraft à hidrólise enzimática por 72h, com 10% de teor de sólido em mistura de cargas enzimáticas de dois extratos comerciais. Ao final de 72 h de reação, os açúcares liberados foram quantificados e levados à fermentação para produção de etanol. A produção de NFC foi realizada, utilizando

o material residual, que foi submetido a um tratamento mecânico em um microfluidizador e posteriormente caracterizado. Como resultado do processo foram descritas a obtenção de concentrações de 120g/L de glicose e NFC com 66% de índice de cristalinidade e morfologia com 500 nm de comprimento e 20 nm de diâmetro. Com isso, os autores demonstraram a viabilidade da obtenção de NFC integradas à produção de etanol celulósico.

A obtenção de nanocelulose associada ao processo de bioetanol também foi investigada por Tsukamoto e colaboradores (2013). Como substrato foi utilizado a biomassa procedente do processamento de laranjas, que foi destilada para obtenção do óleo essencial e hidrolisada a açúcares fermentescíveis partindo de 40% de teor de sólidos por ação de misturas de complexos enzimáticos. A conversão de celulose em glicose foi superior a 20,6%. A presença de nanocelulose foi constatada no resíduo da hidrólise e da fermentação com 1,25 μm de comprimento e 150 nm de diâmetro e também após o processo de branqueamento do resíduo da hidrólise e fibrilação por ultrassom na faixa de e 13 μm de comprimento e 263 nm de diâmetro.

Song e colaboradores (2014) obtiveram glicose por processos enzimáticos, (posteriormente fermentadas a etanol) e o resíduo sólido da etapa de hidrólise enzimática foi convertido a NFC por processo de sonicação. Os substratos utilizados foram a polpa de celulose de madeira dura (hardwood) e a polpa de celulose de madeira macia (softwood), ambas branqueadas pelo processo Kraft. Foram empregadas uma mistura de 2:1 (v/v) de extratos enzimáticos comerciais Cellic HTec2[®] e a Cellic CTec2[®] (Novozymes). A hidrólise enzimática resultou em conversões de 75,6% de polpa de madeira dura e 57,5% para madeira macia, sendo 35,4 g/L e 27,3 g/L de glicose, respectivamente. O processo de sonicação resultou em nanofibras com comprimentos em torno de 1 μm e diâmetros de 5 a 10 nm. Assim, os autores concluíram que a NFC obtida por associação com o processo de etanol 2G, é um co-produto de alto valor agregado, auxiliando na viabilização econômica do processo de obtenção de etanol celulósico.

Teixeira e colaboradores (2015) estudaram a obtenção de NCC, usando quatro diferentes substratos: Celulose microfibrilada comercial; holocelulose de eucalipto; polpa de celulose de eucalipto branqueada pelo processo Kraft e bagaço de cana de açúcar. As enzimas utilizadas foram um extrato comercial que teve sua eficiência na obtenção de NCC comparada a eficiência das enzimas β -glicosidade e endoglicanase de dois microrganismos hipertermofílicos que foram expressas em *E. coli*. Antes do processo enzimático, os substratos foram submetidos à fibrilação em moinho de disco, para facilitar o acesso da enzima à

celulose. Como resultados foram obtidas estruturas entre 750 e 500 nm de comprimento e diâmetro de 4 a 12 nm dependendo do substrato avaliado. Foi possível verificar que a obtenção de nanocelulose com associação de processos enzimáticos e mecânicos permite a obtenção de materiais com características desejáveis à aplicação em materiais poliméricos. Além disso, foram apresentadas conversões de celulose em glicose de 10 a 70%, dependendo do substrato e da enzima utilizada. No entanto, o foco deste trabalho foi a obtenção de nanocelulose e não a obtenção de glicose para produção de etanol, porém indicam que a integração do processo é possível.

Assim, os trabalhos reportados na literatura indicam o potencial da utilização da rota enzimática para obtenção de etanol 2G integrado ao processo de obtenção de nanocelulose. Tais trabalhos justificam a necessidade de um aprofundamento dos estudos nessa temática, visando ampliar a utilização de diferentes fontes de biomassa e coquetéis enzimáticos, bem como a otimização das condições operacionais envolvidas a fim de contribuir para o desenvolvimento deste processo em larga-escala.

2.5 – Biorreator convencional tipo tanque agitado

Biorreatores são dispositivos nos quais os processos bioquímicos (biológicos ou enzimáticos) são realizados com rigoroso controle de operação e monitoramento de funcionamento. Em processos bioquímicos, entre os parâmetros que devem ser controlados em um biorreator tem-se a temperatura, pH, pressão, fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos tóxicos, sendo que o elevado grau de controle e reprodutibilidade dos bioprocessos é a chave para a transferência para maior escala (Martin, Wendt e Heberer, 2004).

Dentre os diferentes tipos de biorreatores existentes, o do tipo tanque agitado (também chamado de reator de mistura ou STR, do inglês *stirred tank reactor*) é um dos mais utilizados, tanto na escala de laboratórios, quanto na indústria de bioprocessos. O reator do tipo tanque agitado consiste em um tanque cilíndrico com relações determinadas de altura e diâmetro. Comumente possuem chicanas com a função de evitar a formação de vórtices durante a agitação do fluido. A agitação em biorreatores de tanque agitado é realizada por impelidores, conectados a um eixo giratório (Schimidell e Faccioti, 2001). A Figura 10 apresenta uma representação de um biorreator do tipo tanque agitado.

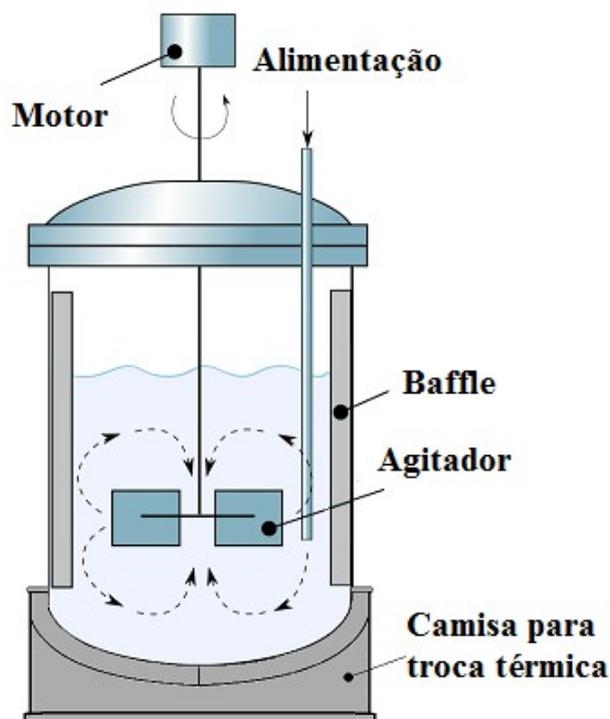


Figura 10 - Biorreator de tanque agitado (adaptado de https://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor)

Em biorreatores do tipo tanque agitado, a agitação tem fundamental importância no processo de transferências de momento, calor e massa, além de permitir a homogeneização das suspensões. Diferentes aplicações levam a utilização de diferentes configurações de impelidores, cujas características variam em relação à dispersão, aspectos da suspensão e padrão de fluxo (Asenjo e Merchuck, 1995).

2.5.1 – Impelidores

Diferentes geometrias de impelidores podem ser utilizadas em bioprocessos visando melhorar o desempenho de diferentes parâmetros estudados. O tipo de impelidor pode causar variações de escoamento, distribuição da velocidade de cisalhamento e dissipação de energia. A escolha do impelidor deve levar em consideração a viscosidade do fluido. Também é possível a associação de diferentes tipos de impelidores (Hemrajani e Tatterson, 2004).

Impelidores convencionais usados em bioprocessos são classificados como sendo de fluxo radial e axial (Asenjo e Merchuck, 1995). O escoamento de fluxo radial é conhecido como o movimento tangencial ao eixo do agitador, em direção à parede do reator. Esse tipo de escoamento é característico de impelidores do tipo Rushton. A utilização de impelidores do tipo radial é indicada para fluidos de baixa e média viscosidade (Mirro e Voll, 2009).

Escoamentos do tipo axial acontecem quando os impelidores geram correntes paralelas ao eixo do agitador. A orientação das pás dos impelidores irá determinar se o fluido será projetado para cima (ascendente) ou para baixo (descendente) (Mirro e Voll, 2009).

Impelidores com escoamento axial possuem desempenho superior quando comparados aos do tipo Rushton por apresentarem menor gasto energético para um mesmo nível de transferência de oxigênio. Além disso, apresentam menor velocidade de cisalhamento podendo ser usados em cultivos com células animais, sensíveis ao cisalhamento (Shuler e Kargi, 2002).

2.5.2 – Impelidor Orelha de elefante (Elephant Ear – EE)

Impelidores do tipo orelha de elefante ou *Elephant Ear* possuem três hélices planas de formato triangular e com angulação de 45° (Mirro e Voll, 2009) e produzem um fluxo axial e radial simultaneamente. O posicionamento das hélices determinará se o impelidor será de fluxo ascendente EEUP (*up-pumping*) ou descendente EEDP (*down-pumping*). Na Figura 11 são apresentados os impelidores EEDP e EEUP.

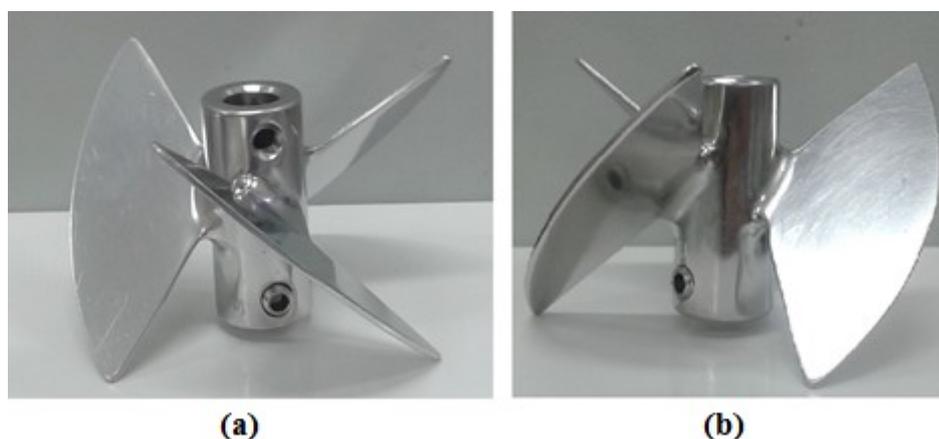


Figura 11 - (a) impelidor de escoamento descendente (EEDP); (b) impelidor de escoamento ascendente (EEUP) – Fonte: arquivo próprio.

O uso dos impelidores orelha de elefante tem sido cada vez mais reportados para homogeneização de células animais em biorreator e em bioprocessos, devido à capacidade de produzir um baixo cisalhamento e elevada mistura, garantido pela geometria do impelidor (Zhu *et al.*, 2009; Collignon *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos têm reportado estudos com impelidores orelha de elefante, mostrando cada vez a utilização deste impelidor em processos bioquímicos (Zhu *et al.*, 2009;

Collignon *et al.*, 2010; Caldas Pereira *et al.*, 2011; Palmqvist, Wiman e Liden, 2011; Bustamante, Cerri e Badino, 2013; Côrrea, Badino e Cruz, 2016).

Zhu e colaboradores (2009) estudaram a atuação dos impelidores EEUP e EEDP em condições aeradas e não aeradas em cultivos de células animais. As avaliações foram realizadas em relação ao número de potência, potência dissipada, retenção gasosa e estudos de imagem da velocidade da partícula (PIV – Particle Image Velocimetry). Os autores concluíram que os impelidores EEUP mostraram-se superiores aos EEDP, por serem menos afetados pela aeração especialmente em relação à transferência de massa.

Correa e colaboradores (2016) realizaram a comparação de diferentes configurações de impelidores na hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Os parâmetros avaliados foram consumo de potência, tempo de mistura, viscosidade aparente e liberação de glicose. Os autores estudaram as combinações de impelidores do tipo Rushton-Rushton, Rushton – EEDP, Rushton – EEUP e EEDP – EEUP. Concluíram que a combinação de impelidores EEDP – EEUP resultou em melhor homogeneização do sistema, com um menor tempo de mistura e maiores conversões de celulose em glicose associados a menores consumos de potência.

2.5.3 – Tempo de mistura

O tempo de mistura (t_m) é definido como o tempo necessário para completa homogeneização de um fluido agitado após a adição de um fluido diferente, ou seja, pode ser definido como uma medida do grau de mistura ou de turbulência num tanque agitado (Badino Jr e Schimidell, 2001).

A definição do tempo de mistura é um importante parâmetro para seleção do impelidor e condições operacionais (Foucault, Ascanio e Tanguy, 2006; Tan, Eberhard e Buechs, 2011). O tempo de mistura é característico de um processo e a relação deste parâmetro com os demais parâmetros operacionais e geométricos de um reator são essenciais nos processos de aumento de escala (Côrrea, Badino e Cruz, 2016).

Variadas técnicas tem sido usadas para a determinação do tempo de mistura, tais como o método colorimétrico, de condutividade ou pH, e o método de temperatura. No método da temperatura é realizada a adição de um líquido em uma temperatura diferente da solução. Para este caso, a mistura é definida como um mínimo de oscilação da temperatura (Tan, Eberhard e Buechs, 2011).

2.5.4 – Consumo de potência

Processos de mistura requerem energia. A energia necessária por um período de tempo para gerar movimento em um fluido em um tanque, por meio de agitação mecânica ou pneumática, é definido como o consumo de potência (Ascanio, Castro e Galindo, 2004).

A potência transmitida ao fluido em biorreatores mecanicamente agitados é fornecida por impelidores e o consumo de potência é resultado da resistência que o fluido exerce sobre as pás dos agitadores (Bustamante, 2013). O consumo de potência é fortemente influenciado pelos processos de transferência de massa, tempo de mistura e de circulação. Além disso, o consumo de potência é um importante critério usado na estimativa de aumento de escala em biorreatores (Ascanio, Castro e Galindo, 2004).

Em reatores do tipo tanque agitado, o consumo de potência (P) está relacionado com a velocidade de agitação do impelidor (N_i), com o diâmetro (D_i), com a densidade do fluido (ρ) e número de potência do impelidor (N_p), relacionando-se com a Equação (1) (Badino Jr e Schimidell, 2001):

$$P = N_p \cdot \rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5 \quad (1)$$

Uma maneira de se medir o consumo de potência é com a utilização de dinamômetros, que tem o funcionamento baseados na terceira lei de Newton. A fundamentação se dá a partir da resistência que o líquido exerce sobre o impelidor. O torque pode ser determinado como uma força transmitida a uma plataforma calibrada (Ascanio, Castro e Galindo, 2004). A Equação 2 (Badino, Barboza e Hokka, 1994; Ascanio, Castro e Galindo, 2004) mostra como o consumo de potência pode ser calculado:

$$P = F \cdot B \cdot \omega \quad (2)$$

Em que P é o consumo de potência (medido em watts), F é a força aplicada (N), B é o tamanho do braço (m) e ω é a velocidade angular (s^{-1}). A velocidade angular é dada pela Equação 3:

$$\omega = 2\pi N \quad (3)$$

N é a velocidade de agitação requerida no sistema (s^{-1}).

2.5.3 – Reologia dos fluidos

No decorrer de um bioprocessos podem ocorrer alterações nas características de um fluido que pode passar de Newtoniano a não-Newtoniano, sendo também frequente o surgimento de um líquido pseudoplástico (Schimidell, 2001).

O modelo matemático que descreve o comportamento reológico para um fluido não Newtoniano do tipo pseudoplástico é o da lei da potência e é descrito pela Equação 3:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}_m^n \quad (3)$$

$\dot{\gamma}_m$ é a taxa média de cisalhamento, K é o índice de consistência (Pa. sⁿ) e n é o índice de comportamento de escoamento (adimensional). Quando o índice de comportamento de escoamento (n) é menor que 1 o fluido é considerado pseudoplástico. Para índice de escoamento maior que 1 o fluido é dilatante. No caso de comportamento de escoamento igual a 1 o fluido é considerado Newtoniano (Schmidell, 2001).

A equação da viscosidade aparente para fluidos não-Newtonianos é dada por (4):

$$\mu_{ap} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}_m} = K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1} \quad (4)$$

Nota-se que a viscosidade aparente varia com a taxa de cisalhamento, diminuindo com o aumento de $\dot{\gamma}_m$ para fluidos pseudoplásticos.

Para fluidos não Newtonianos o número de Reynolds está relacionado com a viscosidade aparente do líquido. Uma vez que a viscosidade aparente varia consideravelmente com a taxa de cisalhamento, o número de Reynolds torna-se difícil de ser obtido já que pode haver variação em pontos diferentes do vaso reacional (Mc Cabe, Smith e Harriout, 2005). Usando a viscosidade aparente o número de Reynolds modificado é definido pela Equação 5 (Mc Cabe, Smith e Harriout, 2005):

$$Re_n = \frac{N \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\mu_{ap}} \quad (5)$$

N é a rotação trabalhada (rps), D_i o diâmetro do impelidor e ρ é a densidade do fluido.

O estudo sobre a reologia do sistema é necessário para a estimativa dos parâmetros requeridos na análise de ampliação de escala do processo.

2.6 – Considerações Finais

A integração dos processos de obtenção de nanocelulose e de etanol está de acordo com os conceitos de química verde, e contribui para a implementação de biorrefinarias florestais. No entanto, a obtenção de nanocelulose, especialmente em larga escala, ainda é um

desafio e pesquisas que contribuam para o desenvolvimento deste bioprocesso é uma demanda do setor. Assim, neste trabalho procurou-se contribuir para o desenvolvimento de um bioprocesso para a obtenção integrada de nanocelulose e etanol 2G, em escala de laboratório. Os testes realizados em biorreator permitirão a estimativa de ampliação de escala laboratorial para escala piloto.

3 - OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento de um bioprocesso para a integração da produção nanocelulose e etanol celulósico, utilizando como matéria-prima a polpa de celulose de eucalipto.

3.1 – Objetivos específicos

- Otimizar a hidrólise enzimática da polpa de celulose de eucalipto quanto ao teor de sólidos e concentração de enzima utilizando a metodologia de planejamento experimental como ferramenta;

- Definir as melhores condições de integração dos processos de hidrólise enzimática resultem em uma maiores conversões de celulose e liberação de açúcares fermentescíveis, associada a uma geração de resíduo sólido adequada para produção a de nanocristais de celulose;

- Obter etanol a partir dos açúcares obtidos pelo processo de hidrólise;

- Realizar testes de aumento de escala do processo em biorreator do tipo tanque agitado (5L de volume útil).

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais e os métodos adotados neste trabalho, o que inclui os procedimentos de caracterização do material, as medidas de atividade do complexo enzimático utilizado e as quantificações de açúcares realizadas. Além disso, são apresentadas as estratégias de caracterização do material residual da hidrólise para verificação da presença de nanocelulose, que inclui a difração de raio X, análise termogravimétrica e análises de morfologia com microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscopia Eletrônica de Varredura com Canhão de Emissão de Campo (MEV-FEG) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Por fim, a otimização do processo será descrita pela sobreposição das superfícies de resposta obtidas pelo planejamento experimental delineamento composto central rotacional (DCCR).

A caracterização química da polpa de celulose, usada como matéria-prima na etapa de hidrólise enzimática, foi realizada a fim de determinar os constituintes lignocelulósicos presentes no material. Após esta etapa foram realizadas hidrólises enzimáticas para obtenção de glicose, que será posteriormente fermentada a etanol. Por fim, a fração residual sólida foi analisada para constatar a presença de nanocelulose. Abaixo é apresentado um fluxograma simplificado das etapas do trabalho (Figura 12).

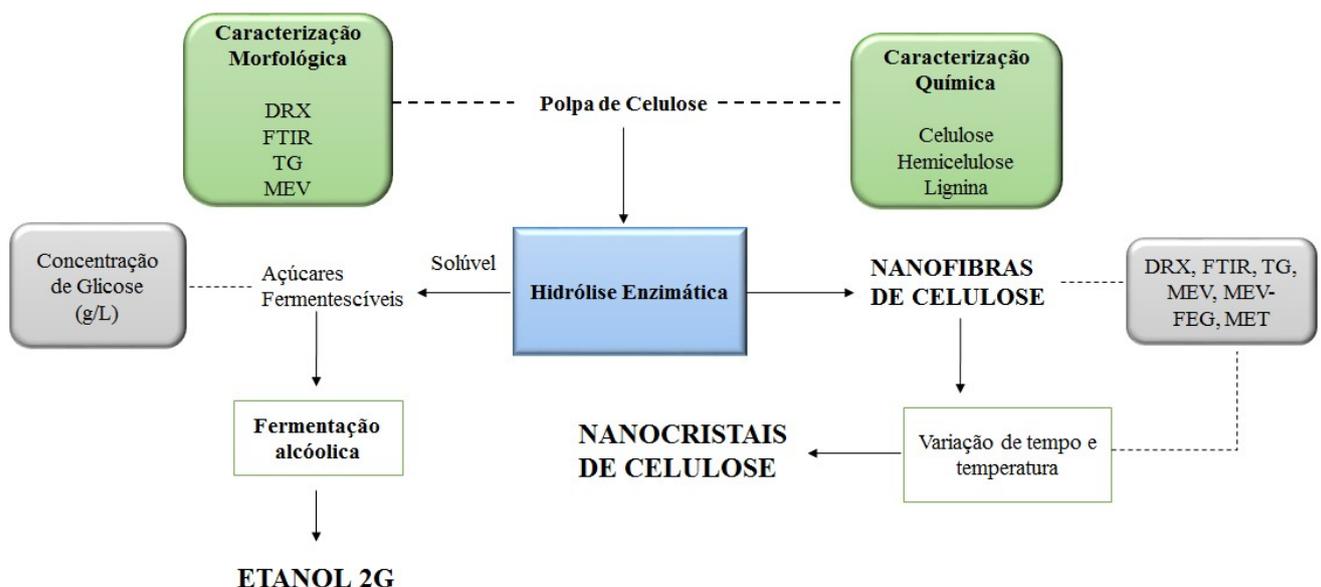


Figura 12 - Fluxograma simplificado das etapas do trabalho

4.1 – Preparação da biomassa

Amostras de polpa de celulose comercial de *Eucalyptus Urograndis* branqueadas pelo processo Kraft, foram fornecidas na forma de blocos pela empresa Suzano papel e celulose S/A. O material foi previamente cortado em blocos menores e em seguida processado em moinho de facas tipo Willey, 500 W Solab[®], com peneira de 20 mesh.

4.2 – Caracterização química do substrato

A composição química da polpa de celulose de eucalipto foi realizada de acordo com o protocolo descrito e validado por Gouveia, et.al. (2009) para caracterização de bagaço de cana-de-açúcar. Para isso, $2\text{g} \pm 0,1\text{ g}$ em base seca de polpa foram pesadas e transferidas para béqueres de 100 mL e tratadas com 5 mL de H_2SO_4 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado a $45\text{ }^\circ\text{C}$ por 7 min. As amostras foram transferidas quantitativamente para frascos erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se o volume de 275 mL de água destilada. Os erlenmeyers foram autoclavados por 30 min a 121°C . Após a descompressão da autoclave, os frascos foram retirados e resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500 mL, o qual teve seu volume posteriormente completado com água destilada. Foram realizadas análises de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural, HMF (detalhado no tópico 4.2.4) e lignina solúvel (tópico 4.2.2).

4.2.1 - Determinação de lignina insolúvel

Lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason modificado. O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500 mL de água destilada, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante. A percentagem de lignina insolúvel foi calculada em relação à massa de amostra seca de acordo com a Equação 6:

$$\%L_{ki} = \frac{M_k - M_c}{M_A} * 100 \quad (6)$$

Em que: L_{ki} – Lignina Klason insolúvel; M_k – massa de lignina insolúvel seca; M_c – massa de cinzas; M_A – massa da amostra seca.

4.2.2 - Determinação de lignina solúvel na fração líquida

Lignina solúvel foi determinada pela medida de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme Equação 7.

$$C_{lg} = 4,187 \cdot 10^4 (A_T - A_{pd}) - 3,279 \cdot 10^4 \quad (7)$$

Sendo: C_{lg} - concentração de lignina solúvel, em g/L; A_T - absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm; $A_{pd} = c_1 \epsilon_1 + c_2 \epsilon_2$ - absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), cujas concentrações c_1 e c_2 foram determinadas previamente por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_1 e ϵ_2 são as absorvâncias correspondentes a 146,85 e 114,00 L g⁻¹ cm⁻¹.

4.2.3 - Determinação de cinzas

Após a determinação da lignina insolúvel em meio ácido, a mesma, juntamente com o papel de filtro, foi transferida para um cadinho de porcelana, previamente tarado. A amostra foi calcinada lentamente até 300 °C durante e mais 2 h a 800 °C, em uma mufla. Para determinação das cinzas totais, pesou-se aproximadamente 2 g em base seca da polpa em cadinho de porcelana previamente tarado. Por diferença de massa, o teor de cinzas da lignina insolúvel e das cinzas totais foi determinado de acordo com a Equação 8.

$$\% \text{Cinzas} = \frac{M_c}{M_a} * 100 \quad (8)$$

Em que: % cinzas – percentual em massa de cinzas; M_c – massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_a – massa da amostra base seca.

4.2.4 – Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural na fração líquida

A determinação dos carboidratos e dos ácidos orgânicos foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, o hidrolisado foi aplicado em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C₁₈. Para construção das curvas de calibração dos carboidratos foram injetadas no cromatógrafo líquido soluções contendo concentrações conhecidas de celobiose, xilose e arabinose. A construção das curvas de calibração dos ácidos orgânicos foram injetadas soluções contendo ácido acético e ácido fórmico.

A determinação dos carboidratos e dos ácidos orgânicos foi realizada em HPLCVarian (Dual ProStar 210) com coluna Aminex HPX87H, com forno a 45°C, vazão de 0,6 mL/min e fase móvel H₂SO₄0,05 M. Foi usado um detector RDI.

Também foram construídas curvas de calibração de furfural e hidroximetilfurfural com a injeção de soluções contendo estes dois compostos. Na análise destes compostos, uma amostra do hidrolisado foi filtrada em membrana 0,45 µm. O modo de detecção foi o UV-VIS a 274 nm e temperatura do forno de 25°C.

Após a determinação dos carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e HMF, calculou-se os teores de celulose e de hemicelulose utilizando os seguintes fatores de conversão: celulose (0,90 x massa de glicose; 0,95 x massa de celobiose; 1,20 x massa de HMF; 3,09 x massa de ácido fórmico); hemicelulose (0,88 x massa de xilose; 0,88 x massa de arabinose; 0,72 x massa de ácido acético; 1,37 x massa de furfural).

4.3 – Estudo da Hidrólise Enzimática da Celulose por Planejamento Experimental

4.3.1 – Análise da Metodologia de Superfície de Resposta e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A metodologia de superfície de resposta, é uma técnica de otimização que se baseia na construção de modelos matemáticos empíricos, que fornecem funções polinomiais lineares ou quadráticas que descrevem o sistema estudado, permitindo o deslocamento pela superfície buscando as melhores condições para o processo (Teofilo e Ferreira, 2006; Rodrigues e Iemma, 2009).

Dentre os planejamentos que geram funções polinomiais quadráticas, está o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). O planejamento consiste em um fatorial completo 2^k com replicatas no ponto central e a introdução de pontos axiais distantes em $\pm\alpha$, e $\alpha = (2^k)^{1/4}$. O modelo de segunda ordem tem a forma:

$$y = \beta_0 + \sum_j \beta_j x_j + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_j \beta_{jj} x_{jj}^2 + e . \quad (9)$$

A análise estatística dos dados foi realizada aplicando a análise de variância ANOVA para verificar a qualidade do ajuste do modelo. A ANOVA consiste na análise do coeficiente de determinação (R^2), por meio da equação de regressão em relação à variação total das respostas, e também pela análise do teste F que relaciona a variação da regressão linear e dos resíduos. O valor de F calculado deve ser maior que o valor de F tabelado para que o modelo seja considerado válido (Teofilo e Ferreira, 2006; Rodrigues e Iemma, 2009).

4.3.2 – Função *desirability*.

A otimização de variáveis com múltiplas respostas e que permite a otimização simultânea, foi realizada utilizando da metodologia proposta por G.C Derringer e R.Suich (1980). O método se baseia em uma função *desirability* para cada resposta, com valores restritos ao intervalo [0,1], sendo 0 é um valor inaceitável e 1 o valor mais desejável (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2001).

Estabelecidas a *desirability* para cada resposta, deve-se combiná-las em uma *desirability* global (D), que é dada pelas médias geométricas das *desirability* individuais:

$$D = \sqrt[n]{d_1 \cdot d_2 \dots d_n} \quad (10)$$

No caso da média geométrica, a solução global pode ser alcançada de maneira balanceada, permitindo que todas as respostas atinjam os valores esperados, se aproximando das especificações impostas. Caso não seja possível, o algoritmo retorna como uma solução inviável para o problema (Paiva, 2006).

Supondo que a resposta desejada tenha um valor alvo, definido por A, que está dentro de algum ponto na faixa de aceitação, cujos limites inferiores e superiores são dados por L_I e L_S . Neste caso, a função *desirability* da resposta é definida por:

$$d = \left(\frac{\hat{y} - L}{A - L_I} \right)^S \quad \text{para } L_I \leq \hat{y} \leq A \quad (11)$$

$$d = \left(\frac{\hat{y} - L_S}{A - L_S} \right)^t \quad \text{para } A \leq \hat{y} \leq L_S \quad (12)$$

$$d = 0, \hat{y} \text{ fora do intervalo } L_I \text{ e } L_S$$

A *desirability* igual a 1, só é alcançada se a resposta coincide exatamente no valor do alvo. À medida que o valor de \hat{y} se afasta do alvo, A tende a cair, levando os limites para fora da faixa de aceitação quando alcança o 0. S é o peso, que quando igual a um, a função *desirability* é linear. Escolhendo $S > 1$, mais ênfase será dada aos pontos próximos ao valor alvo e escolhendo $S < 1$, isso será menos importante. Se t (peso) for igual a 1, a função *desirability* é linear (Calado e Montgomery, 2003). Após encontrar as condições que maximizem a função global, é necessário analisar o comportamento individual de cada variável para saber se estão em regiões de valores aceitáveis (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2001).

4.4 – Procedimento Experimental da Hidrólise Enzimática

A polpa de celulose de eucalipto foi submetida à hidrólise enzimática em complexo comercial Cellic Ctec 3[®] (Novozymes) com tampão citrato 0,1 M, pH 5,0 a 50 °C e 200 rpm em incubadora shaker Cienlab Brasil. A massa de material usada foi de $10 \pm 0,01$ g. O volume de tampão usado nas hidrólises variou de acordo com o teor de sólidos trabalhado entre 68 e 125 mL sendo calculado pela Equação 13. Para o estudo foi aplicado um planejamento fatorial 2^2 , incluindo 3 repetições nos pontos centrais e em seguida 4 ensaios nas condições axiais, totalizando 11 ensaios e compondo um DCCR. As variáveis estudadas e os níveis são apresentados na Tabela 4 e a matriz codificada usada é apresentada na Tabela 5.

Tabela 4 - Variáveis independentes do planejamento, níveis reais e codificados

Variáveis independentes	Níveis codificados				
	(-α) -1,41	-1	0	1	(α) +1,41
Teor de celulose (%) - TS	8	10	15	20	22
Carga enzimática (mg proteína/ g de celulose) - CE	3	5	10	15	17

Tabela 5 - Matriz codificada para a hidrólise enzimática da polpa de celulose

Ensaio	Teor de sólido (TS)	Carga enzimática (CE)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

A hidrólise enzimática da polpa de celulose foi realizada em base seca, para isso a umidade de cada substrato foi medida e descontada do volume de tampão. Para o cálculo do volume do tampão considerou-se Equação (13):

$$volume\ tamp\til{a}o = \frac{100 * Massa\ substrato_{base\ seca}}{Teor\ de\ S\til{o}lido} \quad (13)$$

A alíquota de enzima foi calculada usando a Equação 14:

$$Volume\ Enzima = \frac{carga\ enzim\til{a}tica * teor_{celulose} * massa\ substrato_{base\ \til{u}mida}}{concentra\til{c}\til{a}o\ da\ solu\til{c}\til{a}o\ enzim\til{a}tica} \quad (14)$$

4.4.1 – Medidas de glicose e conversão

Uma das variáveis dependentes do planejamento analisada foi a concentração de glicose (g/L) obtida. Para o monitoramento foi utilizado o kit enzimático GOOD-PAD de análise de glicose (Dolles[®], Brasil), seguindo o procedimento fornecido pelo fabricante.

A análise foi feita adicionando 10µL da glicose resultante do ensaio de hidrólise (devidamente diluída) em 1 mL do reagente de trabalho. Um padrão de glicose foi feito, adicionando 10µL de glicose do kit enzimático em 1 mL do reagente e deixado em banho a 37°C por 5 min. Ao final a absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 510 nm, que teve como branco 1 mL do reagente de trabalho. A concentração de glicose obtida foi calculada pela Equação 15:

$$Glicose \left(\frac{g}{L} \right) = Diluição * \left(\frac{100}{absorbância\ padrão} * absorbância_{análise} \right) \quad (15)$$

Tendo os valores de glicose para as condições estudadas, a conversão (%) de celulose, que foi a segunda variável dependente obtida e calculada pela Equação 16:

$$Conversão\ de\ celulose\ (\%) = \left[\frac{m_{glicose}^{24h} - m_{glicose}^{0h}}{(m_{celulose}^{0h}) * 1,11} \right] * 100 \quad (16)$$

Para as condições estudadas, foram levantadas a cinética de reação em tempos de 0, 6, 12, 24 e 30h.

4.4.2 – Obtenção das superfícies de resposta e função *desirability*

As superfícies de resposta para as variáveis estudadas no planejamento foram obtidas usando o software Statistica 7[®]. A otimização das condições globais para a produção de etanol, por meio da obtenção de glicose e da produção de nanocelulose, por meio da análise de conversão de celulose (%) foram obtidas com auxílio da função *desirability* presente no software Statistica 7[®]. Após a definição desta região, foi realizada a validação do experimento na condição de TS 20 e CE 10 mg / g de celulose.

4.4.3 – Determinação da atividade enzimática

Para medida de atividade enzimática, foi usado o método proposto por Ghose (1987). O ensaio de atividade foi feito em tampão citrato de sódio 50 mM e pH 4,8. A atividade celulásica foi determinada usando papel de filtro Whatman N° 1 (Ghose, 1987).

Em diferentes tubos de ensaio, foram adicionados 1 mL do tampão citrato e adicionados 0,5 mL da solução contendo o complexo enzimático previamente diluído. A diluição adotada segue a Equação 17:

$$\text{Concentração} = \frac{1}{\text{diluição}} = \left(\frac{\text{volume de enzima na diluição}}{\text{volume total na diluição}} \right) \quad (17)$$

Uma dessas diluições deveria produzir em torno de 2 mg.mL⁻¹ de glicose e outra abaixo deste valor. Os tubos foram então colocados em banho a 50 °C e uma tira de 1,0 x 6,0 cm de papel de filtro foi adicionado e deixado em reação durante 60 minutos. A reação foi interrompida e adicionado 1 mL de reagente DNS (ácido-3,5-dinitrosalicílico) e 1 mL da solução com o papel de filtro, posteriormente aquecido por 5 min em banho a 100°C. Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 13 mL de água a fim de finalizar a reação. Foram retiradas alíquotas para determinação de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV/Vis que teve como branco 1 mL do reagente e 1,0 mL de água destilada. A concentração de enzima necessária para liberar 2,0 mg de glicose foi calculado usando um gráfico semi logarítmico relacionando glicose liberada x concentração de enzima. Com o valor de enzima obtido, obteve-se as unidades com Equação 18:

$$\text{Atividade(FPU)} = \frac{0,37}{\text{Conc.de enzima que libera 2,0 mL de glicose}} \cdot \text{unidades mL}^{-1} \quad (18)$$

A unidade de FPU é baseada na Unidade Internacional (UI)

Em que: 1UI = 1µmol/min de substrato convertido;

1UI = 1µmol/min de glicose formado durante a reação

1UI = 0,18 mg/min quando o produto é glicose

Assim, a quantidade em FPU produzida por 0,5 mL de enzima em 60 minutos de reação em FPU:

$$2,0 \text{ mg glicose} = 2 / (0,18 \mu\text{mol} * 0,5 \text{ mL} * 60 \text{ min}) = 0,37 \mu\text{mol} / \text{min.mL (UI/ mL)}$$

4.4.4 – Determinação de proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais do complexo enzimático utilizado foi realizada pelo método colorimétrico proposto por (Bradford, 1976). A albumina do soro bovino (BSA) foi usada na preparação da curva de padronização. A solução a ser medida foi preparada em tubos de ependorf em diluição de 1 mL do reagente de Bradford misturados com

0,1mL do complexo enzimático devidamente diluído. Em seguida foram obtidas as respectivas absorbâncias em 595nm e a proteína total presente foi calculada de acordo com a curva de padronização obtida.

4.5 – Fermentação alcoólica

Os experimentos de fermentação alcoólica foram conduzidos de acordo com Sonego e colaboradores (2014). A fermentação foi realizada em frascos de 125 mL, sendo fermentados 30 mL do meio obtido após hidrólise enzimática. O experimento foi feito em triplicata e a levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada (Fleischmann) em concentração de 25 g/L em massa seca. O meio foi suplementado com reagentes contendo fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio. A composição do meio de cultura foi preparada com 5,6 g/ L de KH_2PO_4 , 1,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6,8 g/L de extrato de levedura e 5,32 g/L de uréia. O pH do meio foi ajustado para 4,6 usando solução de ácido clorídrico 1 M. O experimento foi realizado em incubadora shaker em rotação de 250 rpm e temperatura de 34°C. Amostras foram coletadas em intervalos de 2 horas para análise de consumo de glicose e produção de etanol. A produção de etanol foi monitorada em HPLC Shimadzu, modo RID coluna shodex KS-802, com temperatura do detector de 40°C e do forno de 80°C, sendo água mili Q a fase móvel em vazão de 1 ml/ minuto.

Os parâmetros para a fermentação foram calculados de acordo com Pereira e colaboradores (2015). O fator rendimento (Y) foi calculado seguindo a Equação 19:

$$Y = \frac{C_{\text{etanol}}^{8h} - C_{\text{etanol}}^{0h}}{C_{\text{glicose}}^{0h} - C_{\text{glicose}}^{8h}} \quad (19)$$

Para o cálculo de rendimento de etanol (E_Y) foram utilizados o fator rendimento e o valor de rendimento teórico por g de etanol formado em relação a g de glicose consumida (0,511), conforme a Equação 20:

$$E_y = \left(\frac{Y}{0,511} \right) * 100 \quad (20)$$

Por fim, foi levantada a produtividade do processo pela Equação 21:

$$Q = \frac{C_{\text{etanol}}^{8h} - C_{\text{etanol}}^{0h}}{8h - 0h} \quad (21)$$

4.6 – Estudo de obtenção de nanocristais de celulose

Visando a obtenção de nanocristais de celulose, após validação do experimento, aumentou-se o tempo de reação em diferentes temperaturas, sendo 35, 40 e

50°C. A redução da temperatura teve o intuito de diminuir a eficiência das enzimas exoglicanases e betaglicosidasas, visando à remoção da celulose amorfa e mantendo a celulose cristalina. Foram analisadas as concentrações de glicose (g/L) e difração de raio X para acompanhar o índice de cristalinidade do material. Os tempos estudados foram 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h.

4.6.1 – Dispersão em solução aquosa de nanocelulose

Para constatar o aspecto visual da suspensão de nanocelulose e posteriormente realizar as caracterizações de imagens, o sólido foi disperso em água Mili-Q com auxílio de ponteira de ultrassom Branson 450, operando em amplitude de 10% por 1 minuto.

4.7 - Caracterização das amostras sólidas de nanocelulose obtidas por hidrólise enzimática

A fração sólida residual e a fração líquida hidrolisada contendo a glicose obtida na etapa da hidrólise enzimática foram separados por centrifugação em 10.000 rpm e 15 min em centrífuga Hanil. O material sólido foi lavado por sucessivas vezes para remoção da glicose residual. Em seguida o sólido foi congelado e seco em liofilizador Terroni LS 6000 para realização de todas as caracterizações descritas a seguir.

4.7.1 – Determinação do índice de cristalinidade por Difração de Raio X (DRX)

As análises de índice de cristalinidade foram realizadas empregando-se a Difração de Raio X (DRX) em um Shimadzu 6000 com radiação CuK α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) no intervalo de ângulo 2θ variando de 5-40° e velocidade de 2°/min, operando a potência de 30Kv e 30mA. O índice de cristalinidade foi calculado pelo método de Segal, et.al., (1959) e a equação usada está abaixo apresentada (Equação 22):

$$IC (\%) = \left(1 - \frac{I_1}{I_2}\right) \times 100 \quad (22)$$

I_1 altura referente a $2\theta = 18^\circ$ e I_2 altura referente a $2\theta = 22,5^\circ$

4.7.2 – Análise da estabilidade térmica por termogravimetria

A avaliação térmica do material de partida e residual da hidrólise foi avaliada por termogravimetria em equipamento TA instruments (TGA Q500 V6.3 build 189) em

condições de operação em atmosfera de nitrogênio a vazão de 40 mL/min na balança; atmosfera de ar sintético a vazão de 60 mL/min no forno, em razão de aquecimento de 10 °C/min e intervalo de aquecimento de 25°C a 600°C em porta amostra de platina.

4.7.3 – Estudo da composição química por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A identificação da composição química do material de partida e do material residual da hidrólise enzimática foi analisado por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) em modo ATR em um equipamento Perkin Elmer Spectrum, modelo Paragon 1000 em intervalo de frequência entre 4000 e 400 cm^{-1} com resolução de 2cm^{-1} e varreduras de 32 scans.

4.7.4 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica do material inicial e material residual após a etapa de hidrólise enzimática foi realizada em microscópio eletrônico de varredura JEOL (JSM-6510) com resolução de 3,0 nm (30kV) e filamento de tungstênio. Uma pequena quantidade da amostra foi depositada em fibra de carbono dupla face e fixados em porta amostra (stubs) e recobertos com fina camada de ouro.

4.7.5 - Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

A análise do sólido residual após a etapa de hidrólise enzimática foi realizada em microscópio eletrônico de varredura com emissão de campo JEOL (JSM – 607 1F), com resolução de 1,0 nm (15kV), com emissor de tungstênio e detector com elétrons secundários espalhados e módulo de Transmissão. O material residual da hidrólise foram preparados em água Mili-Q e gotejado em placa de silício e seco em estufa a 85°C. A placa com a amostra foi colada em porta amostra (stub) com auxílio de cola de prata.

4.7.6 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O ponto final da condição de hidrólise utilizada na validação do planejamento experimental TS 20, CE 10 mg/g de celulose no tempo de hidrólise de 144 h e 35°C foi analisado em equipamento Tecnai TM G2 F20 no modo STEM. A amostra foi preparada em solução aquosa 0,5% (m/m) e foram preparadas após sonicação e coradas com solução 1,5%

de acetato de uranila. Uma gota da solução foi depositada em suportes ultrafinos (grides) de cobre (400 mesh, Ted Pella – N°01822) e deixadas em repouso para secar por 24 horas.

4.8 – Experimentos em biorreator

4.8.1 – Reator de tanque agitado

Foram realizados experimentos no Departamento de Engenharia Química/Ufscar (DEQ-UFSCAR) em reator do tipo tanque agitado com capacidade de 5 litros tendo um motor de indução trifásico da marca VOGES (modelo ARB 716-E2260) acoplado a um rolamento localizado na tampa do reator. A frequência de rotação foi ajustada através de inversor de frequência SIEMENS (modelo Micro Master MM420). Um banho ultratermostato Ethik Technology (modelo 521-2D) fez o controle da temperatura de reação. O consumo de potência foi avaliado experimentalmente com auxílio de um dinamômetro digital LUTRON (modelo FG 6005SD). A unidade experimental é apresentada na Figura 13.

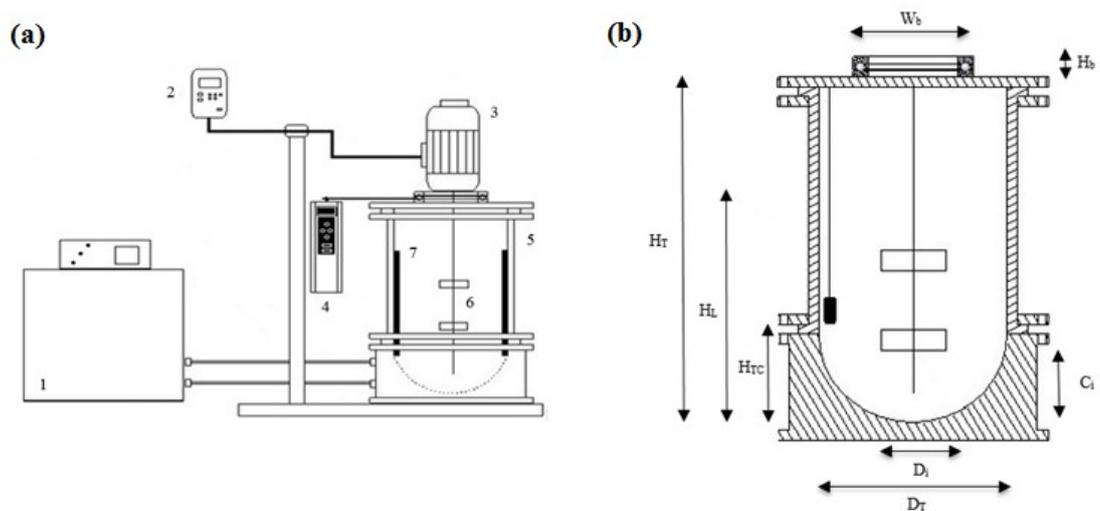


Figura 13 - Unidade experimental (a) 1 - banho termostático; 2 - inversor de frequência; 3 - motor; 4 - dinamômetro; 5 - reator; 6 - impelidores; 7 - chicanas. (b) Dimensões do biorreator - Adaptado de Corrêa, Cruz e Badino(2016).

Os estudos foram realizados usando impelidores acoplados ao motor. Neste estudo trabalhou-se com a combinação de impelidores do tipo “orelha de elefante” de fluxo ascendente (EEUP) e de fluxo descendente (EEDP), com diâmetro (D_i) de 0,080 m e largura da pá (L) de 0,070 m(Figura 14)selecionados por Correa, Cruz e Badino (2016).

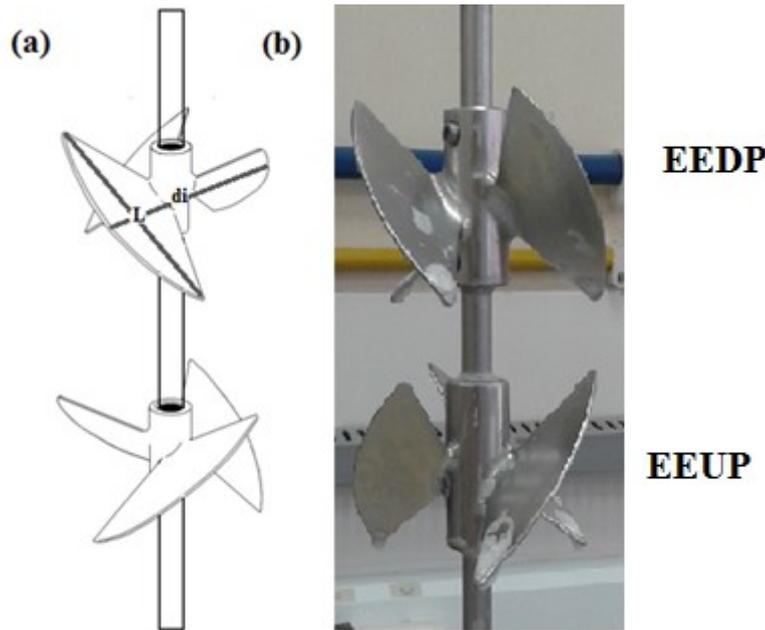


Figura 14 - (a) - Impelidores com suas dimensões (adaptado de Corrêa, Cruz e Badino (2016)) (b) impelidores EEDP e EEUP (arquivo próprio).

4.8.2 - Tempo de mistura

O tempo de mistura (t_m) foi determinado pelo método pulso de temperatura (Szoplik e Karcz, 2008; Tan, Eberhard e Buechs, 2011). Foi avaliado o tempo de mistura para a combinação de impelidores EEUP-EEDP em rotações 282, 376, 470, 564, 659 e 756 rpm para 10% de teor de sólidos. Com auxílio de uma bomba peristáltica, 10% volume do sólido foi removido (o volume foi equivalente a 300 ± 1.1 g de polpa de celulose contendo tampão citrato de sódio). O volume removido foi aquecido por 90 s em forno micro-ondas e novamente bombeada para dentro do reator. Foi determinado como tempo de mistura (t_m) o tempo necessário para que o valor da temperatura atingisse 95% do seu valor final.

A medida de temperatura para levantamento do tempo de mistura foi obtida com auxílio de um termopar fixado em uma altura de 0,105 m em relação ao fundo do reator.

4.8.3 – Consumo de potência

O consumo de potência foi determinado pelo produto do torque (T) requerido para a agitação do fluido pela velocidade angular do impelidor utilizado ($\omega = 2.\pi.N$) e foi determinado pela Equação 23 (previamente apresentada na Equação 2) apresentado por :

$$P = T. \omega \quad (23)$$

O torque foi calculado pelo produto da força (F) medida pelo dinamômetro e a distância do braço (b) acoplado no eixo do motor. Para o sistema estudado a distância equivale a 0,175 m e foi calculado pela Equação 24 e a energia total gasta em cada experimento foi dada pela Equação 25:

$$P = 1.10. F. N \quad (24)$$

$$E = \int_0^{48h} P_t dt \quad (25)$$

4.8.4 – Análise reológica

A análise reológica para a polpa de celulose foi realizada no decorrer da hidrólise em tempos de 6,12, 24, 36 e 48h utilizando um reômetro digital (Brookfield, modelo LV DV-III) acoplado em um banho termostático (TC-650 MX-150, Brookfiel) e mantido a 50°C. Para a realização da análise foi utilizado *spindle* (SC4-18) e amostras de 8 mL de suspensão. O *software* usado para análise dos resultados e determinação das características reológicas foi o Rheocal 2.0®.

Após a determinação dos parâmetros reológicos (índice de consistência K e índice de comportamento de escoamento ou índice de fluxo *n*) foi possível obter a velocidade de cisalhamento média usando a Equação 26 (Sanchez Perez *et al.*, 2006):

$$\gamma_{m=0} = \left(\frac{4 Np \cdot \rho \cdot D_i^2}{27 \pi K} \right)^{\frac{1}{1+n}} \cdot N^{\frac{3}{1+n}} \quad (26)$$

A viscosidade aparente foi determinada pela Equação 4. O número de Reynolds modificado (Re_m) foi calculado pela Equação 5. O número de potência foi calculado pela Equação 27 (Badino Jr e Schimidell, 2001):

$$Np = \frac{P}{\rho \cdot N^3 D_i^5} \quad (27)$$

A densidade do material foi determinada com auxílio de um picnometro.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 – Caracterização química do substrato polpa de celulose de eucalipto

A caracterização química da polpa de celulose de eucalipto foi realizada segundo a metodologia descrita por Gouveia, *et.al.* (2009). Valores de celulose foram calculados baseados nos constituintes glicose e hidroximetil furfural, que pode ser convertido a ácido fórmico. Hemicelulose teve como análise as frações de xilose, arabinose, ácido acético e furfural. Os valores finais para os componentes principais da polpa de celulose utilizada são apresentados na Tabela 6. O total mostra que o balanço de massa foi satisfatório, considerando que o método utilizado foi eficiente para caracterizar o substrato polpa de celulose.

Tabela 6 - Composição química da polpa de celulose usada na hidrólise enzimática

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina total (%)	Cinzas (%)	Total (%)
75,6 ± 2,3	14,6 ± 0,6	6,7 ± 1,2	1,1 ± 0,12	97,5 ± 2,7

A caracterização realizada apresentou para polpa de celulose de eucalipto majoritariamente celulose, seguido de hemicelulose e apresentou baixo teor de lignina. Tais valores sugerem que o material tem potencial para hidrólise da celulose e obtenção de etanol 2G, sem a necessidade de etapas de pré-tratamento. Os valores de composição química obtidos para a polpa de celulose de eucalipto estão de acordo com valores encontrados na literatura. Teixeira e colaboradores (2015) apresentaram para polpa de celulose branqueada pelo processo kraft uma composição de 73,3% de celulose, 13,4% de hemicelulose e lignina total de 8,2%. A metodologia usada por estes autores se baseou no protocolo NREL descrito por Sluiter e colaboradores (2011). Os resultados apresentados neste trabalho foram próximos ao relatado por Teixeira e colaboradores (2015), tal semelhança se deve, provavelmente a utilização de metodologias baseadas em protocolos similares.

5.2 – Determinação da atividade enzimática do complexo enzimático Cellic CTec 3[®]

A análise da atividade enzimática foi feita com base em duas diluições da enzima Cellic Ctec 3[®], seguindo a metodologia proposta por Ghose, 1987. Foram utilizadas as

diluições de 1:400 e 1:500 (enzima: tampão), o que equivale a 0,002 (v/v) e 0,0025 (v/v), respectivamente. A Tabela 7 apresenta a relação de glicose liberada para as diluições.

Tabela 7 - Diluições do complexo enzimático Cellic CTec 3® e as respectivas liberações de glicose

Diluição da enzima	Concentração de enzima	Glicose liberada (mg)
400	0,0025	2,81 ± 0,004
500	0,0020	2,14 ± 0,007
600	0,0017	1,69 ± 0,008

A partir desse resultado foi então possível calcular a concentração de enzima utilizada para liberar 2 mg de glicose. O valor encontrado foi de 0,0022 (v/v) e a atividade enzimática encontrada foi de 205,6 ± 0,007 FPU/mL. Na literatura, foi encontrado atividade enzimática para o extrato Cellic CTec 3® de 213 FPU/ mL (Li *et al.*, 2013). Portanto, o extrato enzimático possui um alto valor de atividade e está bem próximo ao reportado na literatura. A pequena variação no valor encontrado na literatura se deve a possível diferença nos lotes do complexo enzimático ou ainda a imprecisões nas análises, dada às elevadas diluições requeridas.

5.3 – Determinação da concentração de proteína total do complexo enzimático Cellic CTec 3®

A concentração de proteína total do complexo enzimático Cellic CTec 3® foi determinada pelo método de Bradford, (1976). Esse dado foi utilizado para calcular as cargas enzimáticas para cada experimento de hidrólise enzimática, conforme apresentado na Tabela 4 do planejamento experimental.

O valor obtido de proteína total para o complexo Cellic CTec3® foi de 121,73 mg proteína/mL. Siqueira, (2015b) relatou 233 mg de proteínas / mL como valor de proteínas totais para o extrato comercial Cellic CTec3®. O autor não revelou o método utilizado para análise, o que pode ser atribuído à discrepância de valor encontrado.

5.4 – Perfil temporal da hidrólise enzimática da polpa de celulose

A hidrólise enzimática da polpa de celulose foi realizada utilizando diferentes teores de sólidos e cargas enzimáticas, conforme descrito na Tabela 4 em Materiais e Métodos. Para todas as condições apresentadas no planejamento experimental, a cinética de

reação foi levantada a fim de definir em qual tempo finalizar o processo. O valor mínimo estabelecido como condição aceitável para a concentração de glicose foi de 100 g/L, valor recomendado para favorecer as etapas de fermentação e destilação. Concentrações de monossacarídeos de 100 g/L, resultam em títulos de 50 g/L de etanol. Abaixo de 45 g/L de etanol, a etapa de destilação é ineficiente, elevando o consumo de energia no processo (Ximenes *et al.*, 2010). Para garantir a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, um dos principais microrganismos utilizados na fermentação alcoólica, a concentração máxima de 200 g/L de glicose é recomendada. Elevadas concentrações de açúcar causam estresse osmótico, ocasionando a perda de água levando a diminuição da célula, podendo ocorrer o turgor. Assim, como em qualquer microrganismo, a água é importante para o crescimento e a manutenção da atividade da levedura. Em condições de estresse a produção de glicerol é estimulada visando recuperar a turgência, sendo o glicerol responsável pela adaptação celular ao estresse osmótico (Mager e Siderius, 2002; Hohmann, 2009; Ortiz-Muniz *et al.*, 2010). A produção de glicerol torna-se um inconveniente para leveduras. A influência do glicerol afeta negativamente o crescimento da levedura, sendo a quantidade de glicerol relacionada diretamente com a quantidade inicial de glicose no meio (Cannella e Jorgensen, 2014). Portanto, essas informações precisam ser levadas em consideração para selecionar o melhor tempo de hidrólise. Na Figura 15, a produção de glicose (g/L) em função do tempo (h) é apresentada para as diferentes condições do planejamento experimental. Também foi calculada a conversão de celulose em glicose em função do tempo que é apresentado na Figura 16.

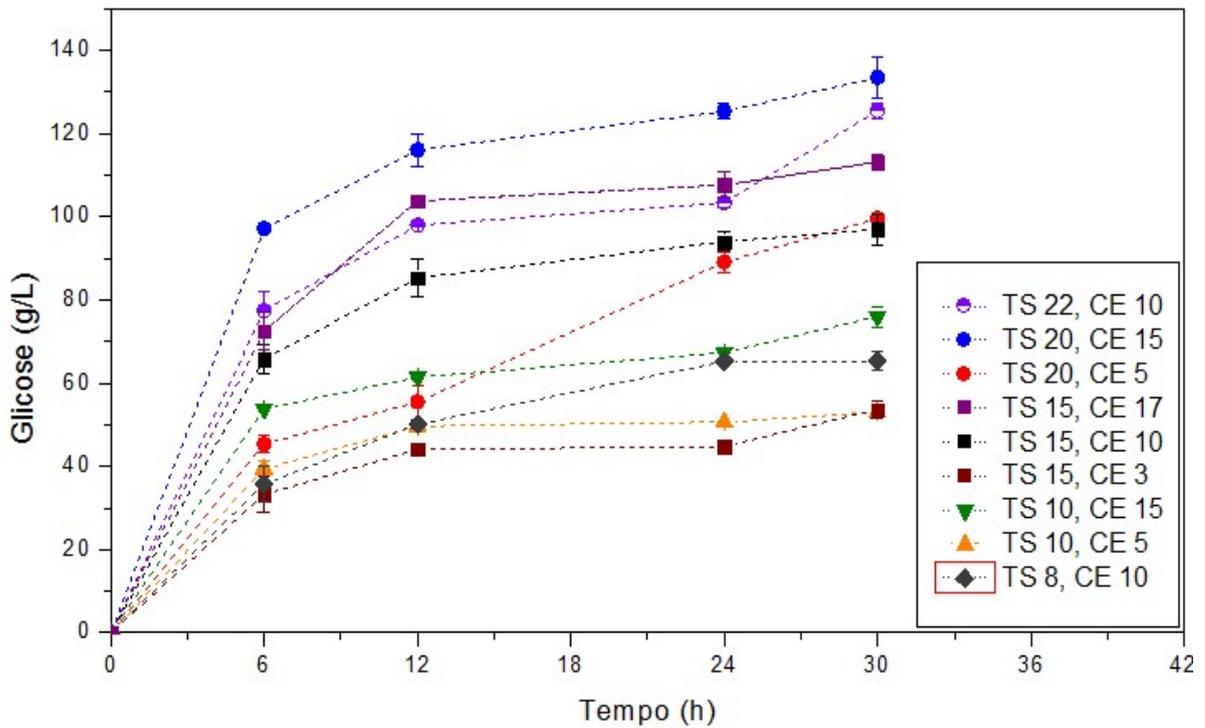


Figura 15 - Concentração de glicose (g/L) liberada em função do tempo (h) durante a hidrólise enzimática da polpa de celulose.

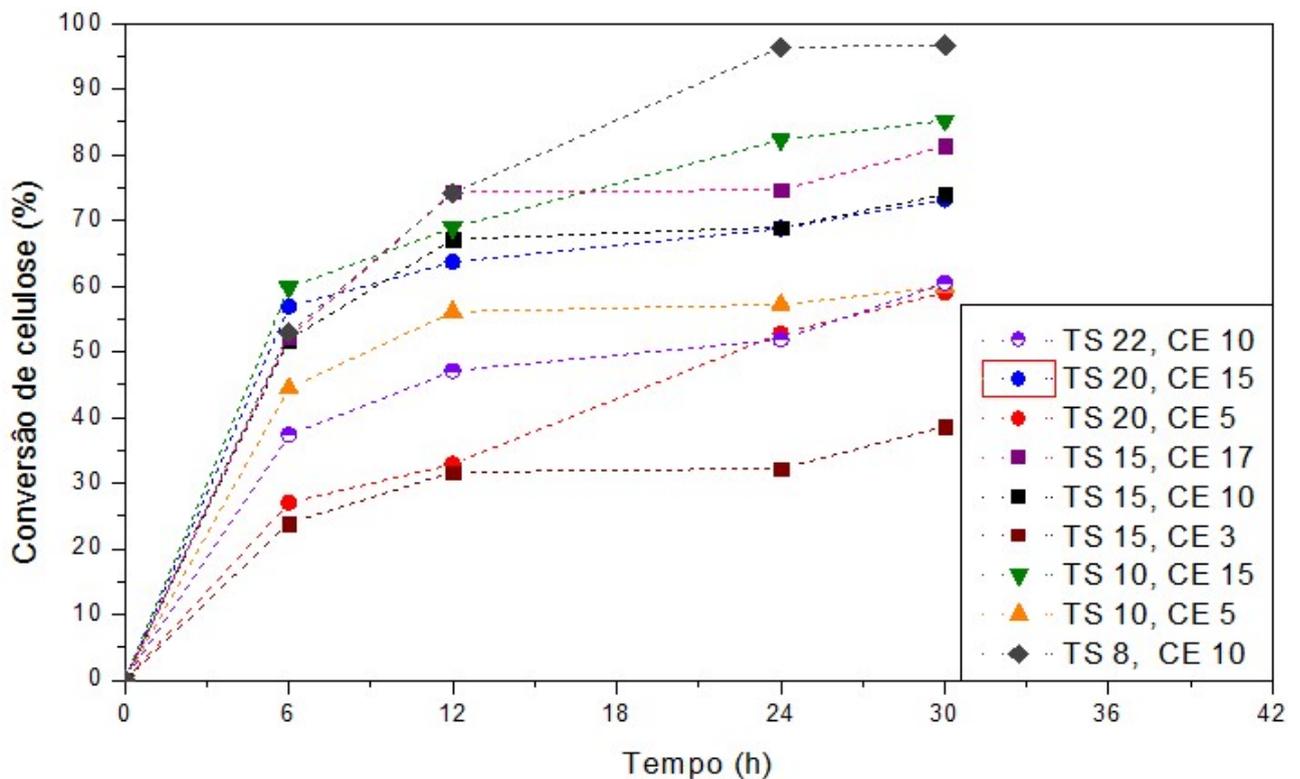


Figura 16 - Conversão de celulose (%) em função do tempo de hidrólise (h) para a polpa de celulose em diferentes condições.

A Figura 15 mostra que nas reações com maiores teores de sólido (TS) e maiores cargas enzimáticas (CE), a produção de glicose é maior, como já esperado. A reação de hidrólise resultou em concentrações próximas ou superiores a 100 g/L para tempos a partir de 24 h, quando se utilizou TS entre 15 e 22 % e CE a partir de 5 mg de proteína/g de celulose. Cargas de sólido abaixo de 15% tiveram produção de glicose considerável, quando trabalhado com altas concentrações de enzima. Para a condição TS 15 % e CE 17 mg/ g celulose, obteve-se em torno de 110 g/L de glicose a partir de 24 horas. Em contrapartida, para a condição de TS 15% e CE 3 mg/g de celulose, apresentaram valores abaixo de 50 g/L de glicose, o que pode ser relacionado a um problema difusivo devido a baixa carga enzimática. Considerando teores de sólido menores, como TS 10%, mesmo com altas cargas enzimáticas a concentração de glicose esteve abaixo de 80 g/L, o que é justificável devido a menor disponibilidade de celulose para conversão em glicose.

No entanto, a concentração de glicose não mostra a eficiência do processo, já que a quantidade gerada será limitada pela quantidade de massa de celulose presente no meio. Quando comparados dois teores de sólido, altas cargas fornecem maiores concentrações de glicose, o que justifica a proposta do aumento de sólidos pensando na eficiência do processo de fermentação. Portanto, eficiência enzimática deve ser analisada com auxílio de cálculos de conversão (Figura 16).

É possível notar que com o aumento da concentração de sólido e diminuição da carga enzimática, a conversão de celulose em glicose é afetada. Para teor de sólido de 8% e CE 10 mg/ g de celulose a conversão em 24 h foi em torno de 97% e permaneceu nesta faixa em 30h. Para a condição de hidrólise com TS 10% e carga enzimática de 15 mg/g de celulose a conversão foi de 82% em 24 h e 85% em 30h de reação. Com o aumento de 10% de sólido na condição, a conversão foi reduzida para 68% em 24h e 74% em 30h.

Devido a aumentos não tão significativos em tempos de 30 horas de reação, 24 h foi o tempo definido como a condição favorável para obtenção de concentrações adequadas de glicose por hidrólise enzimática para posterior fermentação.

Diferentes tempos de hidrólise enzimática são relatados na literatura, tempos que variam de 24 à 72 h. As diferenças no tempo de reação se devem a variações de carga e tipo enzima, teor de sólido e tipo de substrato e também estratégias do processo de obtenção de etanol. Li e colaboradores (2013) utilizaram teor de sólido de 15% na sacarificação do sorgo sacarino, usando o complexo Cellic CTec3 em dosagens variadas de 5 a 15 FPU/g de glicano. Os autores concluíram que o aumento da carga enzimática levou a maiores

concentrações de açúcares, com menor tempo de reação. Além disso, elevadas cargas de enzima permitiram maiores velocidades de conversão nas primeiras 12 h, e este incremento diminuía após 48h. No entanto, para conseguir elevadas concentrações de glicose, os autores realizaram a reação durante 72 h, obtendo concentrações de açúcares acima de 100 g/L em cargas a partir de 9 FPU/ g glicano.

Maiores cargas de sólido apresentadas neste trabalho levaram a altas concentrações de glicose, porém é relatado que este produto pode levar a inibição de algumas celulases. Jorgensen *et.al* (2007) relataram que cargas de sólido entre 20 e 40% têm efeito de inibição mais pronunciado em enzimas β -glicosidade devido ao aumento da concentração dos produtos. Hsieh e colaboradores (2014) relataram que o aumento de compostos solúveis no meio (gerados pelo processo de sacarificação), interagem na camada de hidratação da proteína em solução, eventualmente diminuindo seu desempenho. Tal fato pode ser atribuído a fortes interações de espécies solúveis com a água, buscando manter sua solubilidade, reduzindo a mobilidade do meio, levando a redução do rendimento do processo de hidrólise.

Zhang *et.al.* (2009) estudaram a hidrólise da polpa Kraft de madeira pré-tratada com organosolv, em frascos agitados, com teores de sólido de 2% e 5% e enzima em 20 FPU de celulase/g celulose. As concentrações de glicose foram de 17g/L e 40g/L, respectivamente. Em outro experimento, os autores usaram um reator de escala laboratorial em altos teores de sólidos de 20% e 30%, e como resultado obtiveram altas concentrações de glicose de 158 g/L e aproximadamente 190 g/L, respectivamente, após 48 h de reação. O material estudado, após o processo de tratamento possuía cerca de 90% de celulose e 3% de lignina, tendo baixa possibilidade de adsorção improdutiva, conseqüentemente a obtenção de maiores concentrações de glicose. Os estudos apresentados por Zhang e colaboradores (2009) mostraram que maiores teores de sólido devem ser utilizados buscando obter elevadas concentrações de glicose. Neste sentido, procurou se obter uma relação do processo de hidrólise envolvendo menores cargas enzimáticas e maiores teores de sólidos, e que são apresentados em estudos a seguir.

5.5 – Planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática

Após a escolha do tempo de reação de hidrólise, definido pela cinética de consumo de celulose apresentado no item 5.4, a próxima etapa foi determinar as condições do processo que resultasse em altas concentrações de glicose e com material residual suficiente para produção de nanocelulose. Para isso, foram analisadas como variáveis dependentes, a concentração de glicose (g/L) e a conversão de celulose (%) no tempo de 24 h. A princípio,

foi realizado um planejamento fatorial 2^2 com 3 repetições no ponto central e, em seguida foram adicionados 4 pontos axiais, obtendo assim um delineamento central composto rotacional (DCCR). A Tabela 8 apresenta a matriz com os valores codificados e reais para as condições da hidrólise enzimática, bem como os valores de concentração de glicose (g/L) e a conversão de celulose (%) no tempo de 24h de reação.

Tabela 8 - Matriz codificada para hidrólise enzimática da polpa de celulose com o extrato enzimático comercial Cellic Ctec 3, em 24 h de reação, com pH 5,0 e temperatura 50°C

Ensaio	Teor de sólido (TS,%)	Carga enzimática (CE, mg/g celulose)	Glicose (g/L)	Conversão (%)
1	-1 (10)	-1 (5)	50,7	57,2
2	+1 (20)	-1 (5)	89,1	52,8
3	-1 (10)	+1 (15)	67,4	82,3
4	+1 (20)	+1 (15)	125,35	68,8
5	-1,41 (8)	0 (10)	65,2	96,5
6	+1,41 (22)	0 (10)	107,7	55,3
7	0 (15)	-1,41 (3)	44,8	35,5
8	0 (15)	+1,41 (17)	103,4	74,6
9	0 (15)	0 (10)	87,6	68,9
10	0 (15)	0 (10)	94,0	74,5
11	0 (15)	0 (10)	94,2	74,6

As respostas obtidas para cada condição do planejamento também são apresentados nas Figuras 17, para variável dependente glicose (g/L) e na Figura 18 para variável dependente conversão de celulose (%).

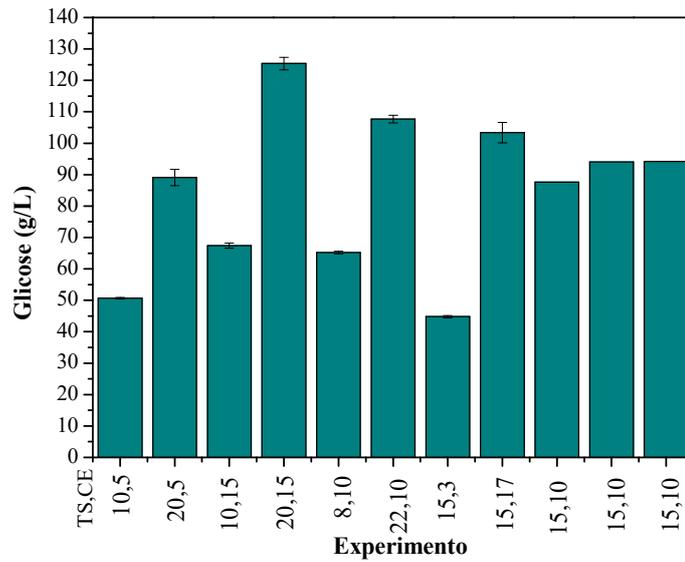


Figura 17 - Concentração de glicose para cada experimento do planejamento experimental em 24h de reação.

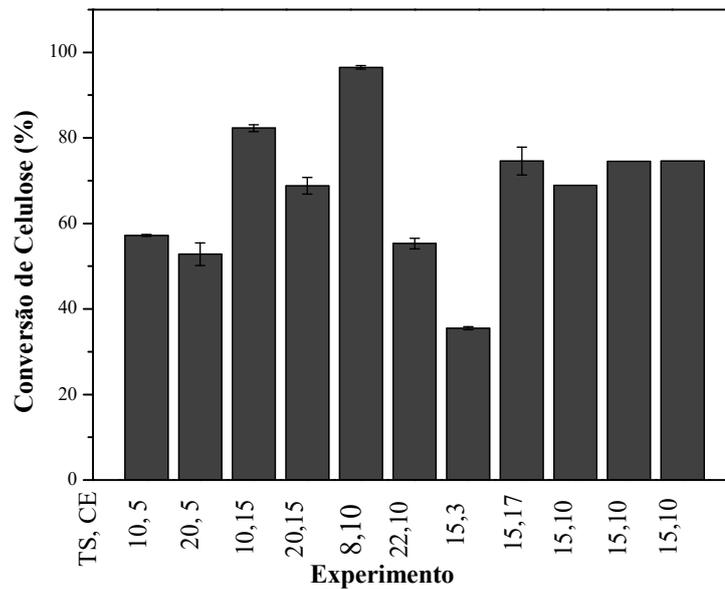


Figura 18 - Conversão de celulose (%) para cada condição estudada no planejamento experimental em 24h de hidrólise enzimática.

Como já relatado anteriormente, observa-se que maiores teores de sólidos resultaram em maiores concentrações de glicose (Figura 17), o que é desejável pensando nos custos do processo e no rendimento final do processo de fermentação. A Figura 18 mostra que o processo foi satisfatório, pois para maiores teores de sólidos, os valores de conversão foram superiores a 50%, exceto para uma condição (TS 15%, CE 3 mg/g de celulose) que esteve

abaixo de 40%. Para menores teores de sólido os valores de conversão foram próximos de 100%. A importância de se trabalhar com altos teores de sólido consiste em viabilizar o processo economicamente.

Buscando uma condição de equilíbrio entre a variável conversão de celulose e a concentração de glicose, os efeitos das variáveis independentes e superfícies de resposta foram analisados.

Os efeitos foram analisados considerando o erro residual e analisados os parâmetros t e p para verificar se a variável era significativa. O nível de significância trabalhado foi de 95% para ambas as análises.

Analisando os dados para a variável resposta concentração de glicose (Tabela 9), observa-se que o termo quadrático da variável teor de sólidos TS (%) e o efeito de interação das variáveis TS e CE não foram significativos ao intervalo de confiança de 95%, sendo eliminados do modelo.

Tabela 9 - Coeficientes de regressão obtidos para variável resposta concentração de glicose

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	Estimativas por Intervalo (95%)	
					Limite inferior	Limite superior
Interação	91,93	4,10	22,40	0,000003	81,38	102,488
TS % (L)	18,80	2,51	7,48	0,00062	12,35	25,26
TS % (Q)	-1,65	2,99	-0,55	0,60350	-9,34	6,03
CE (L)	17,74	2,51	7,06	0,000883	11,27	24,19
CE (Q)	-7,83	2,99	-2,62	0,047185	-15,52	-0,1432
1L*2L	3,39	3,55	0,95	0,383932	-5,75	12,52

A análise da variância do modelo (ANOVA) para variável concentração de glicose é apresentada na Tabela 10. Para que o modelo possa ser usado para fins preditivos, ele deve ser estatisticamente significativo e para que isso ocorra, o valor de F calculado deve ser maior que F tabelado e $p\text{-valor} \leq 0,05$.

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para variável concentração de glicose

Fonte de variação	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Regressão	5680,44	3,00	1893,48	42,20	<0,00001
Resíduo	5994,16	7,00	44,86		
Total	11674,60	10,00			

$$R^2 = 94,76\% ; F\text{-tab} = 3,71. F\text{-calc}/F\text{-tab}_{3,10} = 11,38$$

A análise de variância do modelo apresentou valor de F calculado 11,38 vezes maior que o F tabelado e p-valor menor que 0,05, mostrando que o modelo obtido é estatisticamente significativo para a variável concentração de glicose. Após a análise de variância e confirmação da significância do modelo, foi gerado o gráfico de superfície de resposta para a variável concentração de glicose (Figura 19). Na Figura 19 é apresentada em (a) superfície de resposta obtida pelo planejamento experimental para a resposta glicose (g / L) (eixo z) em função das variáveis Teor de sólidos (eixo x) e carga enzimática (mg proteína/g de celulose) (eixo y). Na Figura 19 (b) é apresentada a curva de contorno.

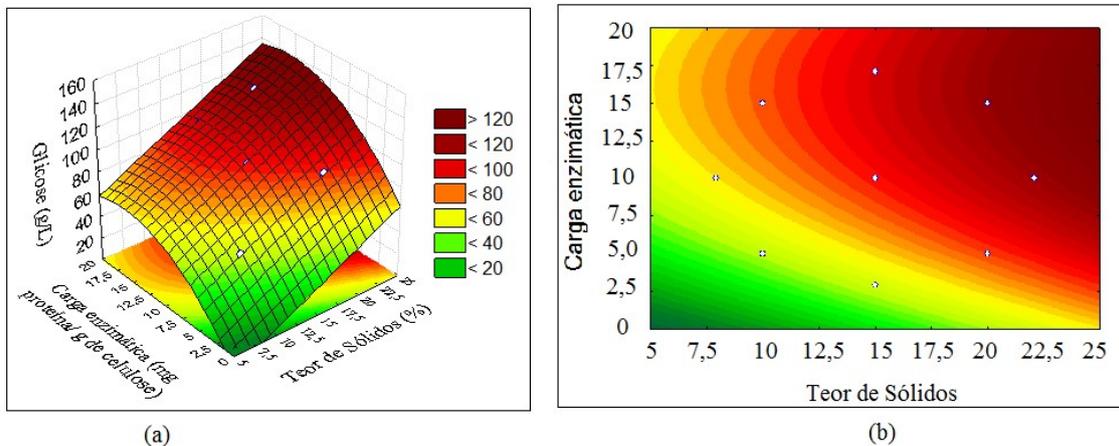


Figura 19 - (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno obtidas para a variável glicose em função do teor de sólidos e da carga enzimática.

Avaliando a superfície de resposta e a superfície de contorno apresentadas na Figura 19, é possível verificar que concentrações superiores a 100 g/L são alcançadas quando trabalhadas com variáveis acima da região do ponto central para ambas as variáveis.

A concentração de glicose liberada na reação de hidrólise enzimática pode ser descrita pela Equação 28. Os valores apresentados para TS (teor de sólidos) e CE (carga enzimática) são apresentados com seus valores codificados obtidos pelos valores

reparametrizados pela exclusão dos efeitos não significativos, que foram apresentados na Tabela 5.7.

$$\text{Glicose} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) = 90,37 + 18,80 \text{ TS} + 17,74 \text{ CE} - 7,34 \text{ CE}^2 \quad (28)$$

Pela Equação 28 é possível verificar a influência positiva das variáveis TS e CE no termo linear, mostrando que o aumento do teor de sólidos (TS) e carga enzimática (CE) resultam em maiores concentrações de glicose.

As análises dos efeitos principais e de interação das variáveis conversão de celulose foram feitas seguindo os mesmos critérios para a variável resposta glicose, e são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Coeficientes de regressão obtidos para variável conversão de celulose

Fatores	Efeito	Coeficiente de Regressão	Erro padrão	t(5)	p-valor	Estimativas por intervalo (95%)	
						Limite inferior	Limite superior
Interação	70,02	70,02	4,01	17,44	0,000011	59,70	80,34
TS % (L)	-19,03	-9,52	2,45	-3,87	0,001174	-15,83	-3,20
TS % (Q)	5,76	2,88	2,92	0,98	0,37013	-4,64	10,40
CE (L)	24,11	12,05	2,45	4,90	0,004459	5,73	18,37
CE (Q)	-15,05	-7,52	2,92	-2,57	0,049956	-15,05	-0,002
1L*2L	-4,55	-2,27	3,47	-0,65	0,54138	-11,22	6,66

Pela tabela 11 observa-se que assim como na variável concentração de glicose, o termo quadrático da variável teor de sólido TS % (Q) e os termos de interação de TS e CE não foram estatisticamente significativos ao nível de significância estabelecida (5%).

Com os efeitos não significativos eliminados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) do modelo para a variável conversão de celulose apresentados na Tabela 12. Para considerar a significância do modelo e verificar se o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, F-calc deve ser maior que F-tab e p-valor $\leq 0,05$.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para variável conversão

Fonte de variação	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F-calc	p-valor
Regressão	2320,98	3,00	773,66	17,50	<0,00001
Resíduo	2630,37	7,00	44,20		
Total	4951,36	10,00			

$$R^2 = 88,23\% ; F\text{-tab} = 3,71. F\text{-calc}/F\text{-tab}_{3,10} = 4,70$$

A análise da Tabela 12 para a variável resposta conversão de celulose apresentou regressão altamente significativa (<0,00001) e valor F calculado 4,70 vezes maior que o F tabelado. Além disso, a porcentagem de variação explicada foi de 88,23%, mostrando que o modelo obtido é estatisticamente significativo e se ajusta bem aos dados experimentais. Após a análise de variância e confirmação da significância do modelo, foi gerado o gráfico da superfície de resposta para a variável resposta conversão de celulose, apresentada na Figura 20.

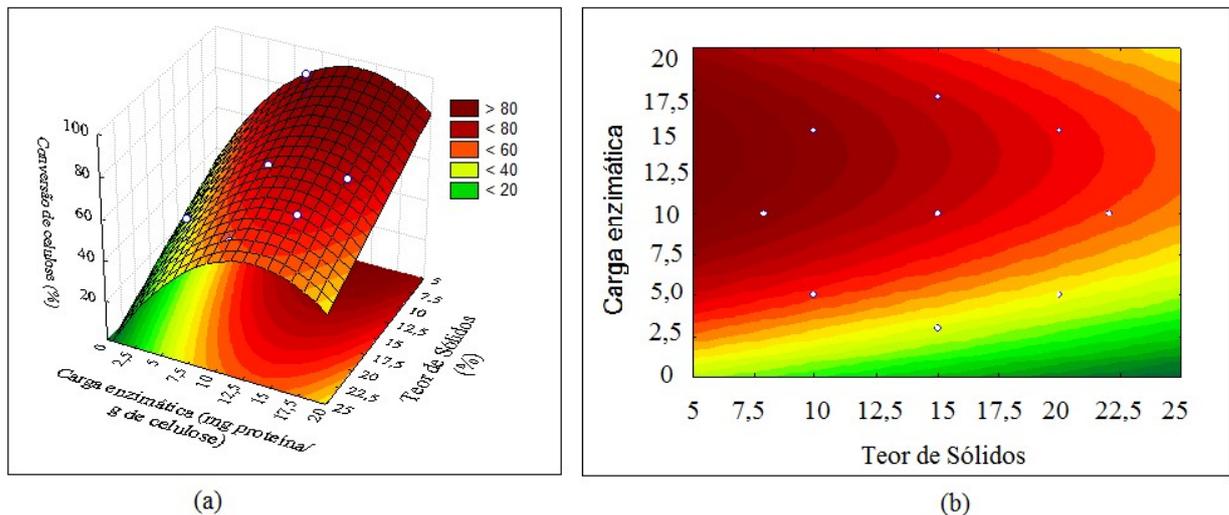


Figura 20 - (a) Superfícies de resposta e (b) curvas de contorno obtidas para a variável conversão de celulose em função do teor de sólidos e da carga enzimática.

A Equação 29 foi obtida pelos dados reparametrizados da Tabela 12 para conversão de celulose (%) para as variáveis codificadas.

$$\text{Conversão (\%)} = 72,73 - 9,51 \text{ TS} + 12,05 \text{ CE} - 8,37 \text{ CE}^2 \tag{29}$$

A análise da superfície de resposta e da superfície de contorno mostrou que para as condições de teor de sólidos entre 10 e 15%, com cargas enzimáticas entre 10 e 15 mg/g de celulose a resposta de conversões de celulose foram superiores a 60%.

Hidrólise com alto teor de sólidos pode ter a conversão afetada não apenas por fatores de inibição enzimática, como já citado, mas também por uma série de fatores de reologia interferindo no processo de transferência de massa, levando a menores conversões. O aumento da viscosidade interfere na mistura adequada do sistema, não sendo possível manter a homogeneidade do meio, dificultando difusão da enzima até o substrato (Modenbach e Nokes, 2013; Hsieh *et al.*, 2014). O acesso facilitado da enzima ao substrato permite que o processo catalítico ocorra em maior velocidade. A eficiência da mistura também permite a uniformidade térmica do meio, fator importante para manter a atividade da enzima.

Os resultados obtidos corroboram com condições apresentadas na literatura, sendo que para maiores teores de sólidos e maiores cargas enzimáticas maiores concentrações de glicose foram obtidas, porém com menores conversões. No trabalho anteriormente apresentado de Zhang e seus colaboradores (2009) foram relatadas conversões de aproximadamente 100% para carga de sólidos de 2% e de 95% para 5% de sólidos. Quando o teor de sólidos foi aumentado para 20%, à conversão máxima obtida foi de 85%, mostrando que altas conversões podem ser obtidas quando trabalhado em baixa consistência de sólidos, porém o reator utilizado pelos autores facilitou a mistura e homogeneidade do meio, permitindo altas conversões quando trabalhado em alta consistência de sólido. Jorgensen e colaboradores (2007) hidrolisaram palha de trigo com 52% de celulose e a reação foi feita com altas cargas de sólido, sendo entre 20 e 40% e com carga enzimática de 7 FPU/g de material seco. Eles propuseram um modelo de reator *in house* que permitiu a melhor homogeneização da mistura, através de impelidores que rotacionavam em sentidos horários e anti-horário. Constataram que para carga de 40% de sólidos, obtiveram cerca de 86 g/kg de glicose (equivalente a 86 g/L) e para 20% de teor de sólidos 76 g/kg de glicose foram obtidos. A conversão obtida foi abaixo de 80%, sendo maior para 20% de consistência.

O aumento da carga enzimática permite maiores conversões, já que até certo nível, aumentam a taxa inicial de hidrólise, apesar disso, é necessário avaliar o quanto isso é viável, devido ao considerável impacto econômico que as enzimas possuem. Observando TS 15% e CE 10 mg/g de celulose, a conversão foi em torno de 70 %, porém quando a concentração enzimática foi aumentada para 17mg/g de celulose, a conversão foi de 78%, um aumento de apenas 8%. Foi relatado por Zhang e colaboradores (2009), que após uma redução

de 50% de carga enzimática do processo de hidrólise, a conversão de glicose foi afetada em 21%, mostrando que uma otimização na carga enzimática é necessária, já que um aumento não tão significativo em termos de conversão poderia resultar em elevados custos, não retornando em glicose o custo adicional da enzima.

Como altas concentrações de glicose dependem do teor de sólidos aplicado, procurou-se manter um equilíbrio na reação, de maneira a utilizar baixa carga enzimática com maiores teores de sólidos, que resultassem em maiores concentração do produto glicose.

Com o objetivo de avaliar a morfologia dos resíduos da hidrólise enzimática realizada em diferentes cargas enzimáticas e diferentes teores de sólidos, foram obtidas as imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para cada condição estudada e as imagens estão apresentadas na Figura 21.

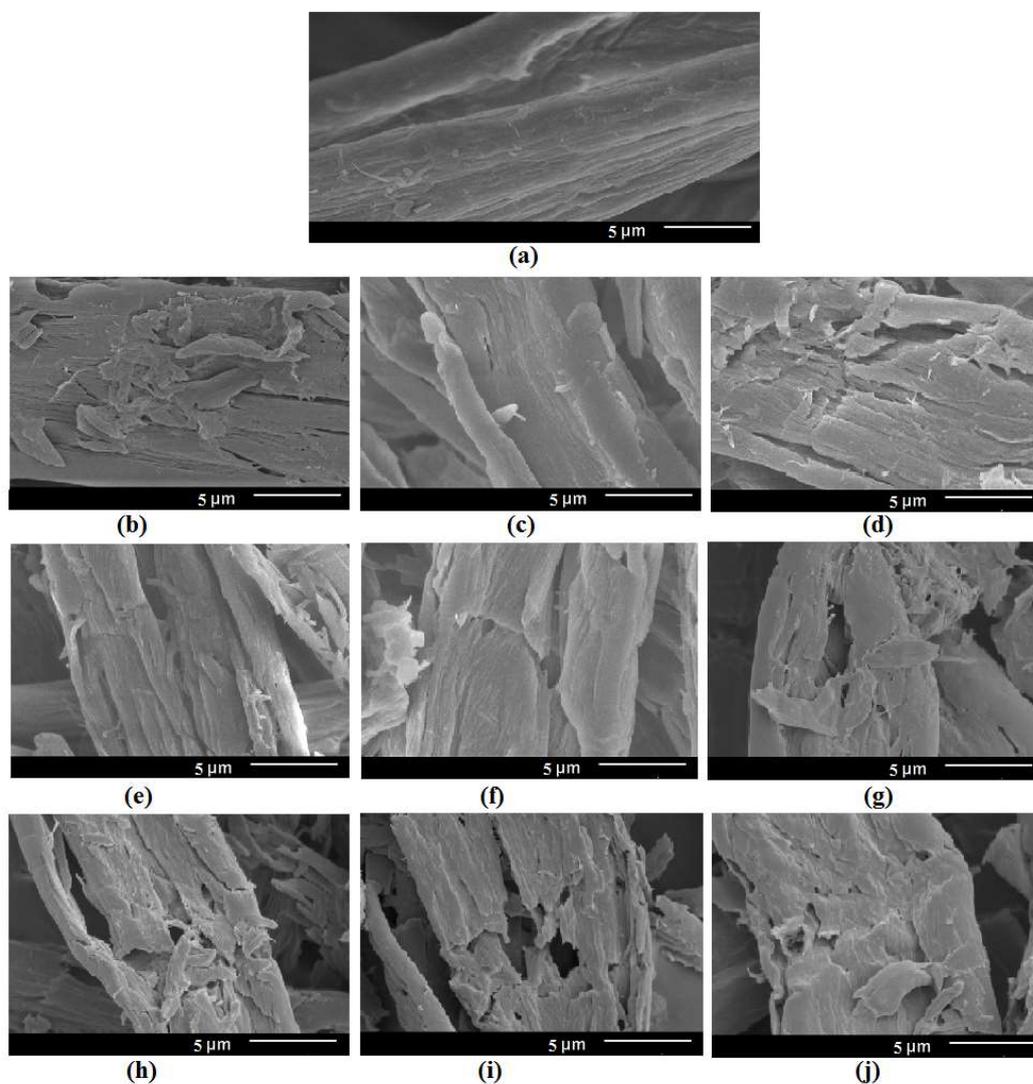


Figura 21 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do sólido residual da hidrólise. (a) Polpa de celulose; (b) TS 20%, CE 15; (c) TS 20%, CE 5; (d) TS 15%, CE 10; (e) TS 10%, CE 15; (f) TS 10%, CE 5; (g) TS 22%, CE 10; (h) TS 8%, CE 10; (i) TS 15%, CE 17; (j) TS 15%, CE.

Observa-se na figura 21 que o material inicial da hidrólise (a) apresenta-se com as fibras celulósicas intactas e sem aparente degradação. No decorrer da hidrólise, o material apresenta sinais de degradação evidenciados pela presença de poros, como observado na imagem (i) e também por fibrilamento como apresentado na imagem (b). É possível observar que a degradação foi aparentemente mais pronunciada em condições com maiores cargas enzimáticas e menores consistência de sólidos como o caso das imagens (h) de teor de sólido 8% e carga enzimática de 10 mg/g de celulose, (i) de 15% de teor de sólido e 17 mg/g de celulose de carga enzimática. A fibrilação do material indica que a hidrólise enzimática promoveu a separação das fibras de celulose, possibilitando a formação nanofibras de celulose. O processo de fibrilamento foi observado com maior facilidade nas condições de menores teores de sólidos e maiores cargas enzimáticas, evidenciando que estas condições levam a formação de nanofibras de celulose com mais facilidade do que quando o processo é realizado com maiores teores de sólidos e menores cargas enzimáticas, o que se deve a maior possibilidade de acesso da enzima ao material a ser hidrolisado.

5.6 – Integração do processo de obtenção de Nanocelulose e Etanol 2G

Como exposto anteriormente, a idéia deste trabalho foi estudar a integração dos processos de obtenção de etanol 2G e o aproveitamento do resíduo na obtenção de nanocelulose. Para obtenção de nanocelulose, seja na forma de nanofibras ou na forma de nanocristais de celulose, a celulose amorfa deveria ser convertida em glicose, deixando a celulose cristalina como um material residual de alto valor agregado. Visando uma condição de favorecimento para ambos os processos foi realizada a sobreposição das superfícies de respostas encontradas para cada variável resposta obtida e para cada condição desejada foi estabelecido um limite mínimo como sendo aceitável para cada resposta.

Para a condição de obtenção de etanol, esperava-se um mínimo de 100 g / L de glicose como aceitável, buscando favorecer o processo de fermentação e viabilizar a operação das etapas seguintes de destilação. Como condição aceitável de conversão para produção de nanocelulose, desejava-se que a maior porção amorfa fosse hidrolisada sem afetar a cristalinidade do material, assim 50% de conversão foi o mínimo aceitável como condição para o processo.

Pela função *desirability* os parâmetros citados foram os estabelecidos como aceitáveis, porém tomando os devidos cuidados para não favorecer apenas uma das condições, saindo do ótimo global do processo. A simulação no software Statistica 7[®] levou a região de

desirability global, em que buscou se trabalhar mais próximo da região igual a 1, que é o valor ideal e que as condições se encontram nos valores desejados. A Figura 22 apresenta a resposta para a simulação realizada.

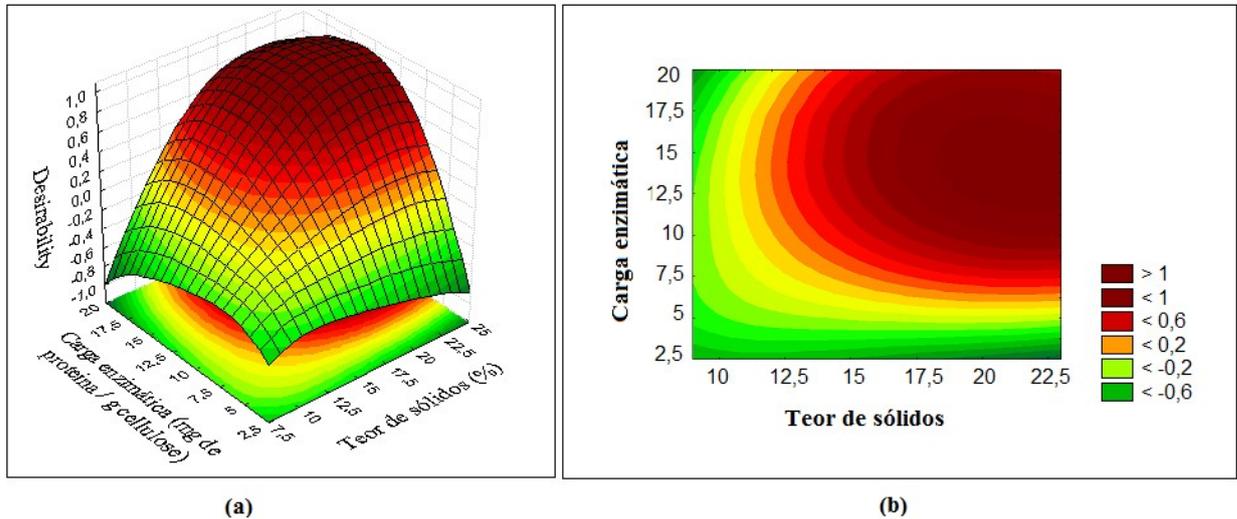


Figura 22 - Simulação para valores alvo de cada variável.

Valores para otimização global do processo foram apresentados pelo software Statistica® usando as variáveis previamente estabelecidas. Para a obtenção do valor alvo, a simulação apresentou valores de TS de 17,5 % a 22,5% e CE de 10 a 20 mg/g de celulose como valores de $D = 1$. Como já discutido, nem sempre o aumento da carga enzimática é viável economicamente. Assim, a faixa trabalhada foi a apresentada como maior TS e menor carga enzimática. A validação do experimento foi então realizada em TS 20% e CE 10 mg / g de celulose.

Observa-se que a *desirability* de cada variável encontra-se com peso 1 e a *desirability* global, conseqüentemente também possui peso 1, o que significa dizer que o processo global encontra-se dentro do ótimo estabelecido.

5.7 – Validação experimental do modelo estatístico

A validação experimental do modelo foi realizada de acordo com as condições apresentadas na Tabela 13, com valores já relatados anteriormente.

Tabela 13 - Condições utilizadas na validação experimental do modelo estatístico

Variáveis	Valor real	Valor codificado
TS (%)	20	+1
CE (mg de proteína/ g celulose)	10	0

Conforme descrito anteriormente, os valores apresentados na Tabela 13 foram estipulados baseados na função *desirability* e pelas Equações 28 e 29 de cada variável resposta. Foi possível verificar os valores preditos pelo modelo e compara-los com os obtidos experimentalmente. Os experimentos foram realizados em triplicata por 24 h a 50°C em TS 20% e CE 10 e as respostas para concentração de glicose e conversão de celulose são apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores preditos e valores experimentais obtidos para condição de ótimo do processo

Variáveis	Valor predito	Valor experimental
Glicose (g/L)	109,2	108,9 ± 1,8
Conversão de celulose (%)	63,2	63,3 ± 0,5

Os valores obtidos com a validação do modelo foram muito próximos aos valores preditos pelo modelo. Os baixos valores de desvios experimentais indicam que os valores experimentais foram praticamente iguais aos preditos, mostrando a qualidade do modelo obtido.

Assim, a utilização do planejamento experimental permitiu a otimização de mais de uma variável resposta, já que foi possível obter concentrações de glicose maiores que 100 g/L e conversão de celulose acima de 50%, conforme as metas previamente estabelecidas.

Visando a integração do processo de obtenção de etanol 2G e nanocelulose, a fração sólida residual do processo de hidrólise enzimática foi devidamente caracterizada para constatação de estruturas nanocelulósicas. Também foram realizados testes para obtenção de NCC utilizando uma estratégia em maiores tempos de reação em diferentes temperaturas, conforme detalhado a seguir. Como continuidade deste trabalho, a glicose liberada nesta condição otimizada foi fermentada a etanol para comprovar a eficiência do processo de integração.

5.8 – Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica foi conduzida partindo de concentração de $134,56 \pm 1,26$ g/L de glicose obtida para a condição de hidrólise TS 20%, CE 10 mg/g celulose; 72 h a 50°C . Na Figura 23 são apresentados os consumos de glicose e produção de etanol em função do tempo de fermentação alcoólica.

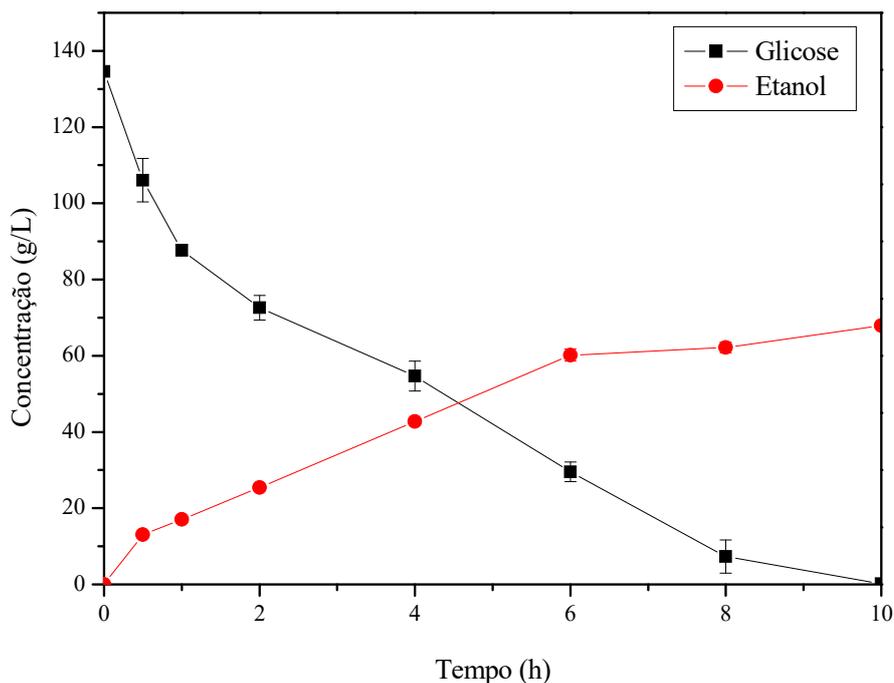


Figura 23 - Consumo de glicose e produção de etanol em função do tempo.

Após 8h de fermentação alcóolica a glicose foi quase totalmente consumida, restando $7,29 \pm 4,34$ g/L de glicose e tendo produzido $62,14 \pm 1,41$ g/L de etanol. Em 10 horas a glicose foi totalmente consumida, chegando a $67,98 \pm 0,70$ g /L de etanol. O fator de rendimento (Y) após 8h de fermentação alcóolica foi de 0,49, resultando em um rendimento de etanol de 95,5% e produtividade (Q) de 7,77 g/L.h. A caracterização química da polpa de celulose revelou baixa quantidade de constituintes hemicelulose e lignina, que poderiam interferir negativamente na produção de etanol, a esse fato e a alta concentração de glicose no hidrolisado pode-se associar o alto rendimento na produção de etanol.

Zhu e colaboradores (2009) apresentaram 91,6% de eficiência na produção de etanol com base na concentração inicial de glicose após a hidrólise da polpa de celulose. Os autores associaram à facilidade da fermentação a presença apenas de glicose no meio devido à

ausência de xilanases no complexo enzimático, não havendo a formação de açúcares C5 que não são fermentados pela levedura utilizada. Sabe-se que a presença de inibidores, derivados da degradação de açúcares de hemicelulose, como ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural e de fenólicos derivados de lignina interferem negativamente na fermentação alcoólica (Palmqvist e Hahn-Hagerdal, 2000; Jorgensen, 2009).

A produtividade apresentada por Zhu e colaboradores (2009) foi de 0,31 g/L.h após 48h de fermentação, tal diferença com os resultados apresentados podem ser associados ao fato de ter sido realizada neste trabalho a suplementação com nutrientes, o que levou a menor tempo de consumo de glicose e formação de etanol. A produtividade pode ser melhorada com a complementação de fontes de nutrientes, em especial nitrogênio. O crescimento de células anaeróbias é influenciado pela adição de nitrogênio, facilitando a formação do produto de interesse (Jorgensen, 2009; Koppram *et al.*, 2014).

Zhang e colaboradores (2009) realizaram a fermentação alcoólica de diferentes concentrações de glicose após hidrólise em alto teor de sólidos da polpa de celulose. Partindo de 149 g/L de glicose produziram aproximadamente 60 g/L após 12 horas de fermentação e iniciando a fermentação alcoólica com 112 g/L de glicose resultou em 44 g/L de etanol, chegando a rendimentos de 86 e 81% respectivamente. Os autores compararam a fermentação do hidrolisado produzido da polpa de celulose com a fermentação de glicose pura e relataram menores taxas iniciais de fermentação para o hidrolisado produzido, fato que associaram a adaptação da levedura ao meio que continha quantidade significativa de compostos fenólicos e ácido acético. Apesar da produção de inibidores o rendimento de etanol não foi significativamente afetado.

Os resultados apresentados neste trabalho se mostraram promissores quando comparado com a literatura, mostrando a alta fermentabilidade da glicose produzida pela hidrólise enzimática da polpa de celulose.

5.9 – Nanocelulose

Nanoestruturas de celulose apresentam alta área superficial e alta densidade de grupos hidroxilas, que interagem com soluções aquosas. As nanoceluloses, quando dispersas em água apresentam suspensão com aspecto coloidal.

O material residual da hidrólise enzimática apresentou aspecto coloidal quando dispersa em solução aquosa, evidenciando a presença de nanocelulose (Figura 24). A condição apresentada na Figura 24 refere-se à fração sólida residual da condição TS 20, CE 10 após 24 horas de reação.

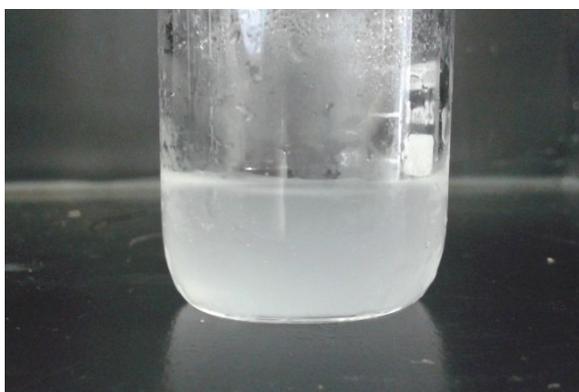


Figura 24 - Aspecto coloidal do sólido residual da hidrólise enzimática da condição TS 20%, CE 10 mg/g de celulose após dispersão em água (arquivo próprio).

A estabilidade da solução coloidal depende da dimensão e da dispersão das partículas na solução. Nanocelulose preparada com ácido sulfúrico tem maior estabilidade que soluções não carregadas, como são o caso das partículas obtidas por processos enzimáticos ou por ácidos clorídricos, por exemplo. Cargas negativas presentes no ácido sulfúrico permitem a repulsão entre si, evitando a aglomeração da celulose, que na ausência de cargas tendem a interagirem entre si, aglomerando e precipitando.

As amostras hidrolisadas de todas as condições do planejamento experimental e da validação foram caracterizadas quanto a microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), análise de cristalinidade por difração de raio X (DRX), análise de grupos funcionais (FTIR) e estabilidade térmica por termogravimetria (TGA). Na condição da validação experimental, para o tempo final de reação também foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (MET), conforme apresentado a seguir.

5.9.1. –Análise morfológica de nanocelulose por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV - FEG)

Foram constatadas a presença de nanofibras de celulose (NFC) no resíduo da hidrólise enzimática Figura 25 TS 15%, CE 10 e TS 10%, CE 5. No anexo 10.1 são apresentadas as imagens de MEV-FEG das demais condições do planejamento experimental.

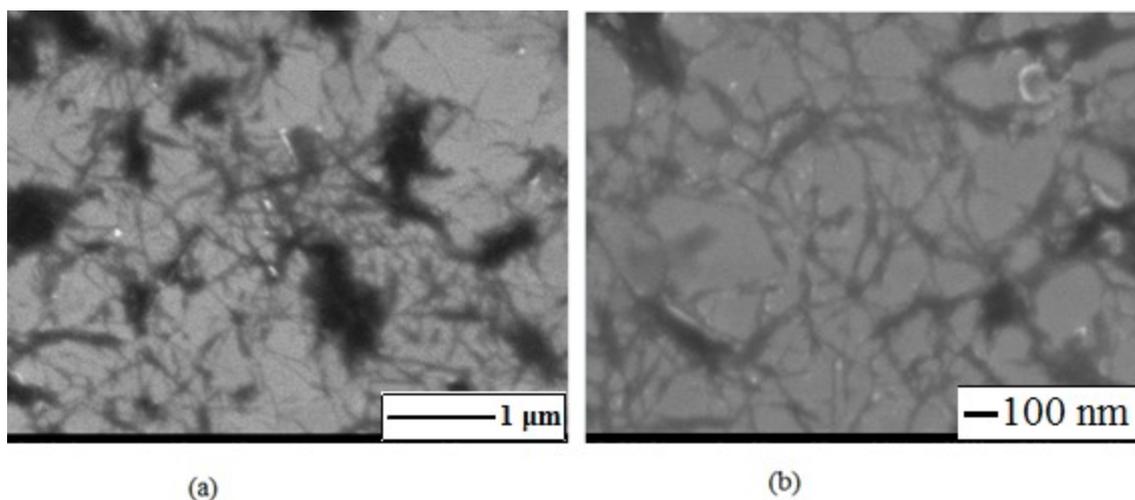


Figura 25 - MEV-FEG para condições do planejamento experimental (a) TS 15%, CE 10; (b) TS 10%, CE 5.

A imagem da Figura 25 (a) mostra NFC na forma de estruturas finas e longas, não rompidas com a hidrólise enzimática. Também são constatados pontos mais escuros emaranhados, que são aglomerados de NFC. A reação de hidrólise se deu em condições brandas (50°C) e em elevados teores de sólido, sem a presença de processos mecânicos para fibrilamento do material, o que facilitaria o acesso de celulasas a celulose. A ausência de processos de pré-tratamentos resultou em pequenos pedaços de fibras devido à incompleta digestibilidade do material celulósico, porém em pontos aleatórios e em pequena quantidade, sendo NFC predominantes neste segmento.

Pelas análises de MEV-FEG não foi possível o cálculo de razão de aspecto pela baixa qualidade das imagens e altos pontos de aglomeração. Apesar disso, foi possível constatar a presença de nanocelulose.

5.9.1 – Validação do planejamento experimental e obtenção de nanocristais de celulose (NCC)

Após a otimização com as condições apresentadas no tópico 5.6 (TS 20%, CE 10 mg/g de celulose), realizadas em temperatura de 50°C até o tempo de 24 h foi avaliada uma nova estratégia para a obtenção de NCC. Assim, após 24 horas de reação a temperatura foi reduzida para 35 e 40°C e o tempo estendido até 144 h. A Figura 26 apresenta o índice de cristalinidade do material residual e as respectivas concentrações de glicose em função da temperatura.

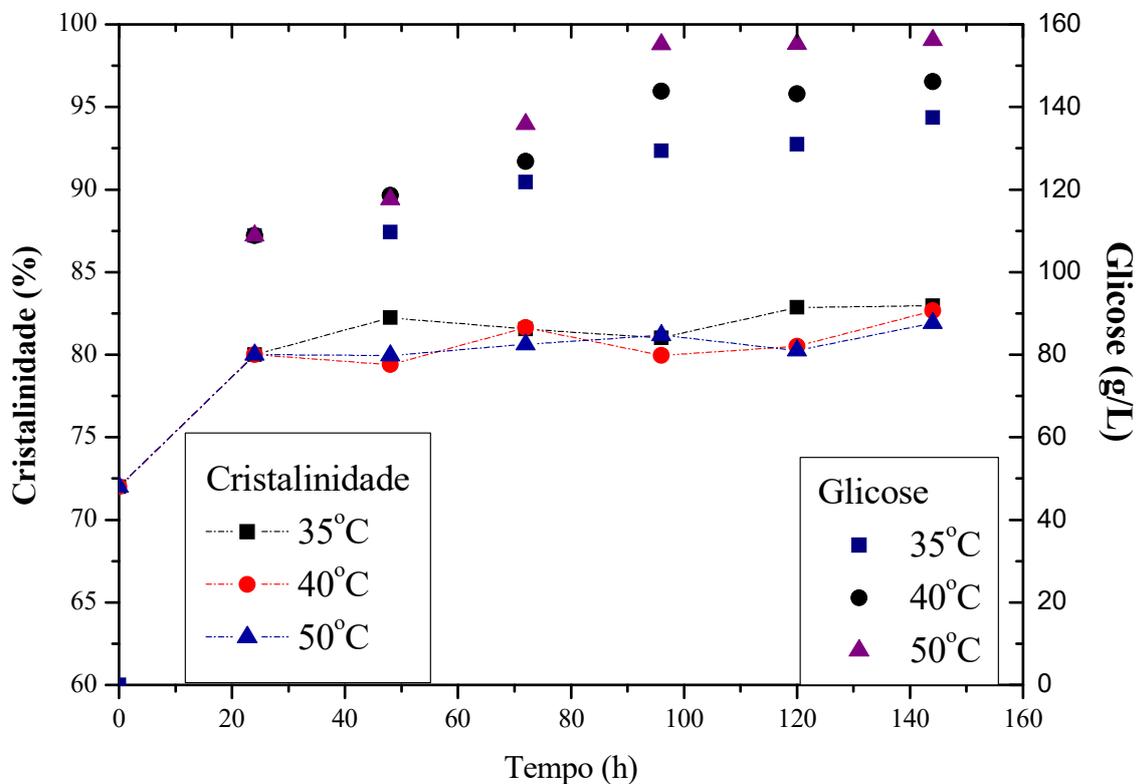


Figura 26 - Influência da temperatura na cristalinidade e na concentração de glicose em função do tempo.

O índice de cristalinidade é um importante parâmetro que determina a presença de porção amorfa no material. Na Figura 26 é possível verificar que houve aumento no índice de cristalinidade do material inicial, passando de 72% para 80% em 24h de reação. No entanto, com o decorrer do tempo, houve pequena variação no índice de cristalinidade, passando a um máximo de 83% em 144h de reação para todas as temperaturas, mostrando influência não tão significativa neste parâmetro. Mesmo com aumento pouco pronunciado no

índice de cristalinidade, a conversão de celulose amorfa em glicose pode ter sido um dos fatores importantes na predominância final de celulose cristalina. A redução da temperatura teve o intuito de impedir que a celulose cristalina fosse degradada pela aplicação de maiores tempos de reação, além disso, com a redução de temperatura o processo é favorecido economicamente pela diminuição de energia gasta na reação.

É importante ressaltar que quando o pool enzimático age em sinergia, a celulose cristalina pode sofrer degradação, porém isso não acontece quando as celulasas agem isoladamente (Puri, 1984). Com isso, é possível afirmar que um complexo mais rico em endoglicanase do que em outras celulasas favoreceria o processo de obtenção de nanocristais de celulose. Outra estratégia para obtenção de nanocristais após obtenção de glicose para produção de etanol seria a redução da sinergia do complexo, permitindo a ação de endoglicanases, desfavorecendo a ação das celobiohidrolases, responsáveis pela degradação da celulose cristalina. Tempos prolongados de reação também podem interferir na atividade enzimática das celulasas. Ye e colaboradores (2012) constataram que exoglicanases são mais suscetíveis à desativação quando comparada a outras celulasas quando submetidas a maiores tempos de reação, o que favorece a obtenção de nanocelulose.

No presente trabalho, a redução da eficiência do complexo foi observada pela menor concentração de glicose quando as temperaturas foram reduzidas. O máximo de glicose obtido foi 156 g/L e a conversão de 90% em temperatura de 50°C, após 144h de reação. Em 35° e 40°C as concentrações de glicose foram de 137 e 146g/L de glicose no mesmo tempo de reação, respectivamente. A influência da temperatura na conversão de celulose em glicose já era esperada, pois maiores temperaturas aumentam a conversão em produtos, no geral baseadas na lei de Arrhenius, porém o limite da faixa de ótimo de atuação da enzima deve ser respeitado, evitando a desnaturação e a desativação térmica por temperaturas acima do suportado pela enzima. A temperatura também interfere na viscosidade do sistema, pois em elevadas temperaturas a viscosidade é reduzida, levando a reações de hidrólise com maiores rendimentos (Szijarto, *et.al.*, 2011).

Ortega, Busto e Perez-Mateos, (2001) estudando a cinética de sacarificação de celulose por celulasas de *Trichoderma reesei* mostraram que maiores temperaturas levaram a maior produção de glicose para diferentes substratos, com destaque para celulose micro cristalina que para temperaturas de 40°C, 50°C e 60°C apresentaram 22,4, 37,2 e 73,4 mg de glicose/g de celulose em 48h de reação. Ahola e colaboradores. (2008), visando investigar a dinâmica de reação e atividade de celulasas, constataram que maiores temperaturas de reação

levaram a maiores taxas de degradação da celulose, para isso testaram temperaturas de 20°C e 40°C na degradação enzimática de filmes de nanofibras. Os autores também constataram que filmes com maior cristalinidade tinham a degradação dificultada, possivelmente devido a forte ligação de hidrogênio na rede cristalina de celulose, que a torna resistente à degradação enzimática.

O aumento do índice de cristalinidade após reação enzimática foi verificada por Zhu e seus colaboradores (2011), que após reação enzimática com complexo comercial de polpa de celulose de eucalipto verificaram um acréscimo de 24% na cristalinidade em 48h de hidrólise, porém a cristalinidade foi estabilizada com o prolongamento da reação até 72h. Hall e colaboradores (2010) indicaram que a menor cristalinidade do substrato (avicel) leva a taxas iniciais de conversão maiores e que após certo tempo de hidrólise a cristalinidade se torna constante e com aproximadamente 61% após 90 % de conversão. Os autores atribuíram a menor reação da celulose cristalina à estrutura firme da celulose com cadeias intimamente ligadas umas as outras, deixando pouco espaço para o início da hidrólise dentro do cristal.

Processos ácidos, por serem mais agressivos, favorecem a cristalinidade em menores tempos de reação quando comparados com processos enzimáticos. Tonoli e colaboradores (2012) submeteram polpa de celulose a hidrólise ácida por tempos de 30 e 60 minutos e verificaram cristalinidades de 76% e 82% respectivamente, um aumento significativo quando comparado a longos tempos de reação enzimática apresentados neste trabalho. Apesar de favorecer a obtenção de NCC, processos ácidos têm sido substituídos na literatura por processos enzimáticos, buscando o menor dano ambiental pela menor geração de resíduos.

5.9.2 – Análise morfológica de nanocristais de celulose obtidos por hidrólise enzimática

A morfologia dos NCC obtidos por hidrólise enzimática para condição TS 20, CE 10 em diferentes tempos de hidrólise foram observadas por análise de MEV-FEG, assim como apresentados no tópico 5.9.1 e são apresentados na Figura 27.

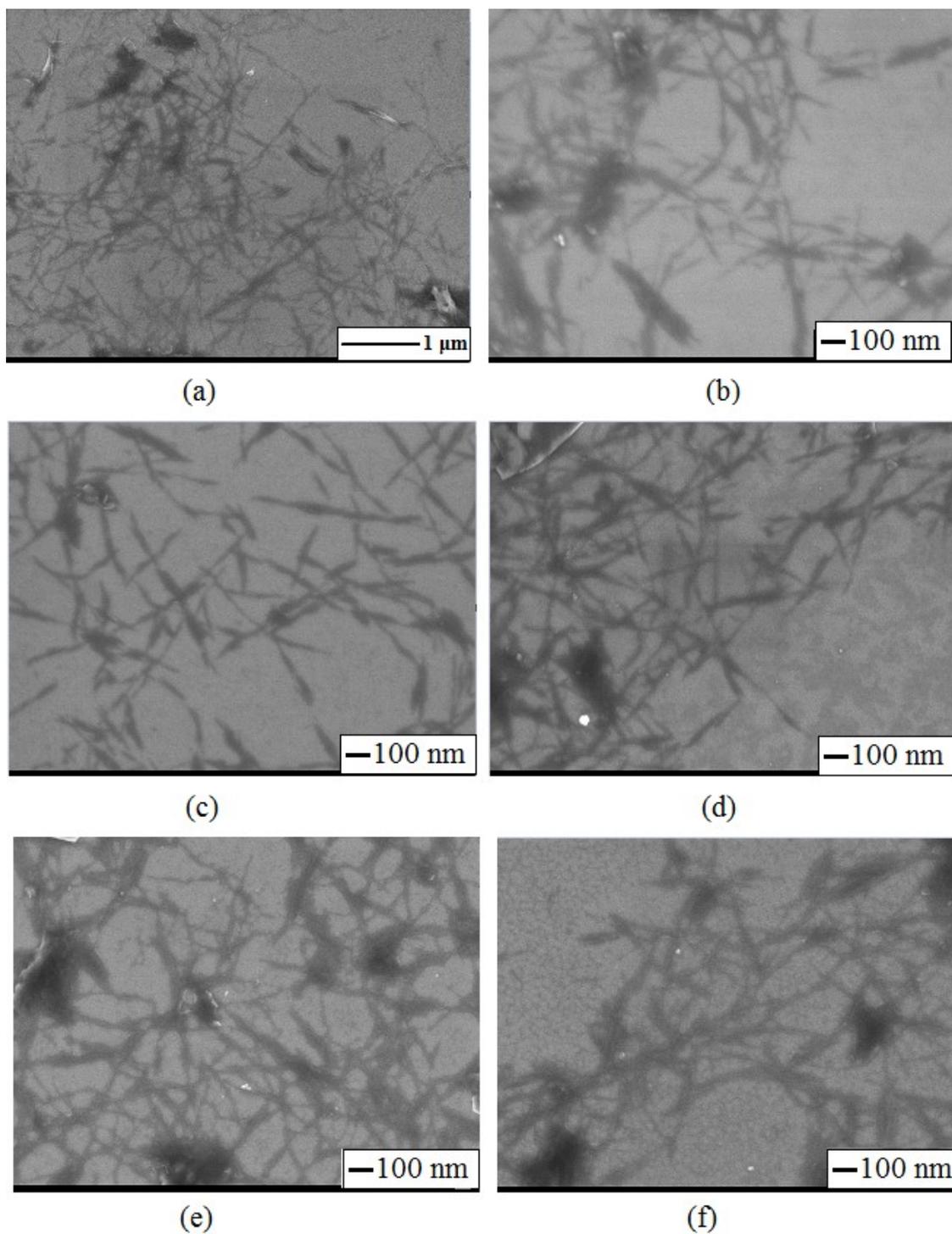


Figura 27–MEV-FEG das NCC para condição TS 20, CE 10 - (a) 24 h; (b) 48h; (c) 72h e (d) 96 h; (e) 120 h; (f) 144 h.

As imagens apresentadas na Figura 27 apresentam formato de hastes alongadas e finas, característicos de NCC, porém pontos de aglomeração, que podem ser vistos por pontos mais escuros nas imagens, impediram mensurar a nanocelulose obtida de maneira a garantir ser NCC. O aumento do tempo de reação levou ao fibrilamento dos pequenos pedaços

de material, que são mais facilmente observados pela imagem (a) de 24h de reação. Siqueira e colaboradores (2010) também relataram que após ação de celulases, tanto endoglicanases com exoglicanases as fibras hidrolisadas apresentavam características de nanocristais de celulose, porém com pequenos fragmentos não completamente hidrolisados pela enzima. Após 72h, apresentado pela imagem (c) da Figura 27 é possível visualizar a predominância de estruturas nanométricas finas e alongadas, sugerindo sucesso na obtenção de nanocelulose.

Para a condição de TS 20, CE 10 e tempo de 144 h também foram obtidas imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), apresentadas na Figura 28 e a partir delas foram calculados comprimento e diâmetro dos NCC.

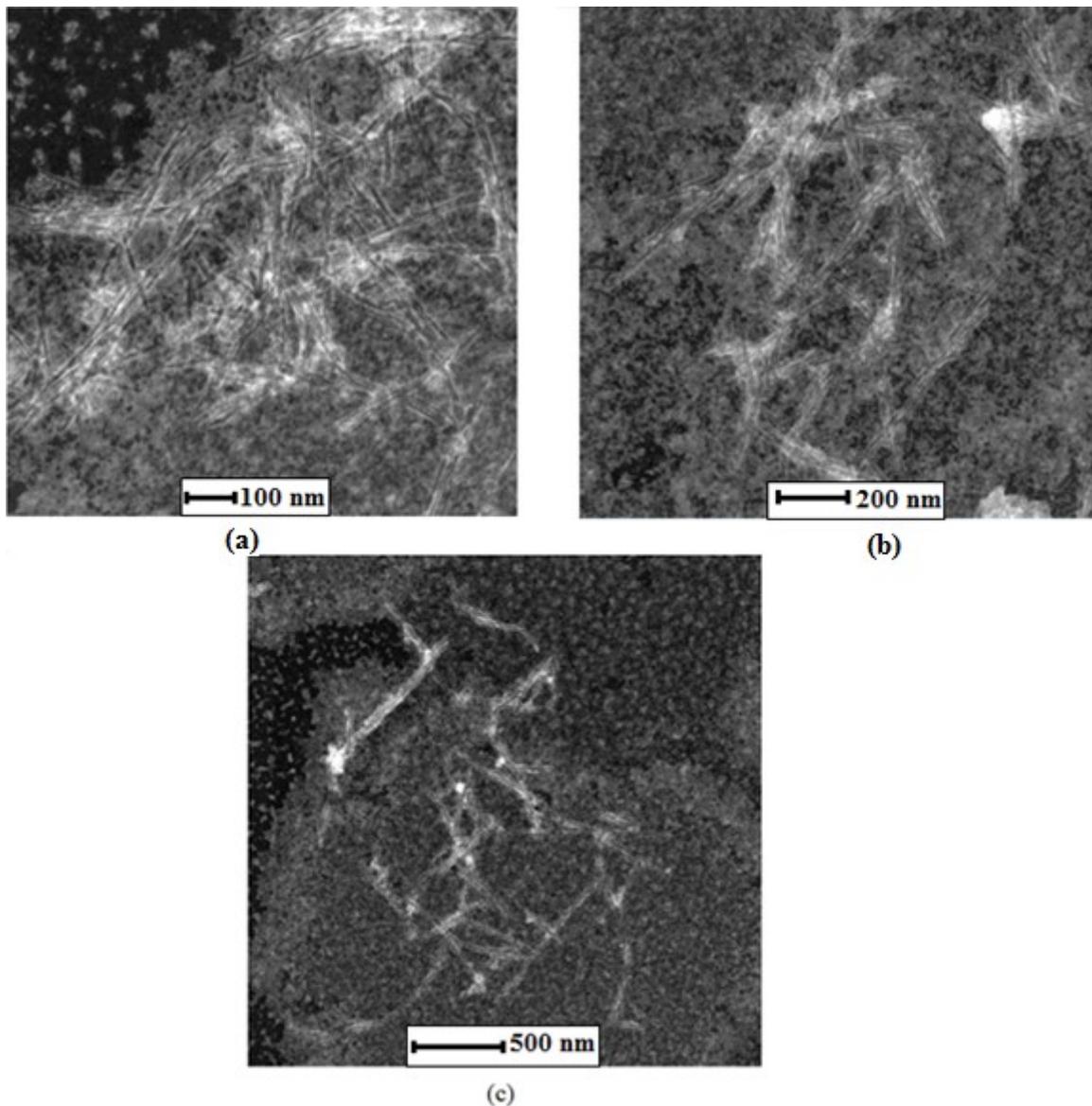


Figura 28 - MET para NCC de condição TS 20%, CE 10 e 144h. Escalas: (a) 100nm; (b) 200nm e (c) 500 nm.

Os NCC obtidos para condição de 144 h de reação da condição TS 20%, CE 10 apresentou formato acicular, característico de nanocristais de celulose (Klemm *et al.*, 2005). A dimensão do material apresentado foi calculada com auxílio do software image Pro-Plus e para garantir a veracidade dos valores, no mínimo 50 medidas foram realizadas. NCC com comprimento de $216 \text{ nm} \pm 86 \text{ nm}$ e diâmetro de $15 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$ e a relação L/d de 15. Os valores apresentados provam que as estruturas obtidas são características de NCC, encontrados na literatura com comprimentos de 100 a 250 nm e diâmetros entre 8 e 70 nm para NCC de fonte vegetal (Klemm *et al.*, 2011).

Filson, Dawson-Andoh e Schwegler-Berry, (2009) obtiveram nanocristais de comprimentos entre 100 e 1000 nm, com diâmetros entre 30 e 80 nm para polpa reciclada. O material foi submetido à hidrólise com enzimas endoglicanases do extrato comercial Celuclast em tempos de 50 a 60 minutos. Teixeira e colaboradores (2015) relataram a obtenção de nanocristais com comprimento de 500 nm e diâmetro de 6 nm quando submeteram polpa de celulose a processos enzimáticos com enzimas comerciais e *in house*, após 72 h de reação.

A variedade de comprimentos e diâmetros encontrados para NCC obtidos por hidrólise enzimática pode estar relacionada com a maneira de atuação de cada enzima, já que são encontrados trabalhos com diferentes teores de sólido em diferentes complexos enzimáticos do que foi relatado neste trabalho.

Quando comparado com processos ácidos, resultados de comprimento e diâmetro apresentados neste trabalho estiveram dentro dos valores encontrados na literatura. Tonoli e colaboradores (2012) após hidrolisarem polpa de celulose com ácido sulfúrico em tempos de 30 e 60 minutos, obtiveram medidas de comprimento de $175 \pm 38 \text{ nm}$ e diâmetro de $15 \pm 6 \text{ nm}$, com L/d de 12 para o menor tempo, medidas de comprimento de $142 \pm 49 \text{ nm}$, $11 \pm 4 \text{ nm}$ de diâmetro e L/d 14 nm para o maior tempo de reação. Bondeson, Mathew e Oksman (2006) hidrolisando com ácido sulfúrico celulose microcristalina derivada da conífera *Picea abies*, obtiveram NCC com comprimento entre 200 e 400 nm, diâmetro menor que 10 nm, após 2 h de reação.

Apesar do maior tempo de hidrólise relatado neste trabalho, houve a vantagem da obtenção de nanocristais de celulose de maneira ambientalmente limpa que quando comparada a processos ácidos torna-se uma vantagem. Além disso, a obtenção de nanocelulose associada à obtenção de produtos de biorrefinaria florestal como, por exemplo, a glicose ou biogás, ou mesmo a obtenção de nanocelulose oriundas de processos da indústria de celulose fazem o processo ser economicamente satisfatório.

Os resultados apresentados e comparados com a literatura mostraram o sucesso na obtenção de NCC para tempo de 144 h. As imagens apresentadas para tempos anteriores a 144 h sugerem a presença de NCC, porém a análise de comprimento e diâmetro deve ser realizada futuramente de maneira a comprovar a existência dessas estruturas.

5.9.3 – Análise do índice de cristalinidade por difração de raio-X (DRX)

Visando avaliar a possibilidade de utilizar os índices de cristalinidade como uma variável resposta no planejamento experimental, para todas as condições estudadas foram realizadas as análises de difração de raio-X e calculados os índices de cristalinidade. No entanto, as análises dos índices de cristalinidade não apresentaram diferenças significativas entre algumas condições estudadas, impossibilitando a análise pela superfície de resposta e a definição da melhor condição para obtenção de nanocelulose com base nessa resposta. A Figura 29 apresenta os difratogramas de raio-X para todas as condições experimentais da etapa de hidrólise estudadas no planejamento experimental, assim como os índices de cristalinidade.

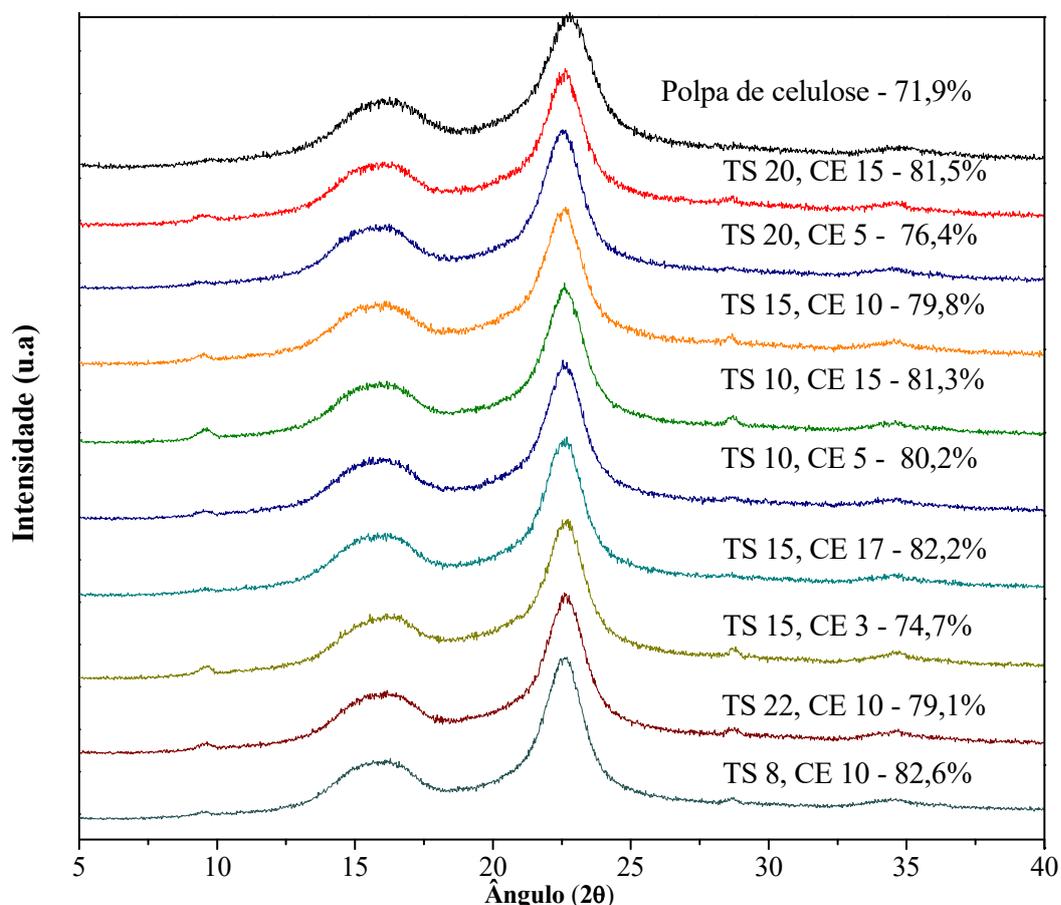


Figura 29 - Difratogramas de raio X para as diferentes condições de hidrólise enzimática.

A polpa de celulose de eucalipto utilizada como material de partida apresentou índice de cristalinidade de 71,9% e estrutura de celulose tipo I, com picos de difração característicos cristalino na faixa de $2\theta = 22,5^\circ$ e a intensidade referente ao halo de celulose amorfa na faixa de $2\theta = 18,0^\circ$, calculados pelo método de Segal, *et.al.* (1959) (Dufresne, 2012).

O processo de hidrólise enzimática promoveu o aumento da fração de celulose cristalina dos materiais, pela remoção seletiva de regiões amorfa. O índice de cristalinidade para cada condição do planejamento experimental variou de 74 a 82%, e são mostrados nos difratogramas na Figura 29. Os difratogramas apresentaram picos característicos de celulose I, sugerindo que o polimorfismo da celulose não foi alterado por endoglicanases (Filson, Dawson-Andoh e Schwegler-Berry, 2009). Em diferentes condições estudadas no planejamento experimental, observou-se que maiores cargas enzimáticas em relação ao teor de substrato levaram a maiores índices de cristalinidade, devido a maior enzima para a conversão de celulose amorfa, apresentada principalmente por TS 15%, CE 17; TS 15% CE 10 e TS 15%, CE 3; com índices de cristalinidade de 82,3%, 79,1% e 74,7%, respectivamente.

Xu e colaboradores (2013) compararam diferentes métodos para obter o índice de cristalinidade e constataram variação nos valores para cada metodologia apresentada. Os autores apresentaram NFC obtidas de polpa de eucalipto por processos mecânicos e NCC obtidos por processos ácidos e obtiveram índice de cristalinidade calculados pelo método de Segal, *et. al.* (1959) de 64,4% e 81,0% respectivamente. Quando analisado pelo software MDI Jade 6.5, os valores de cristalinidade foram de 95% para CNC e 39% para NFC. Teixeira e colaboradores (2015) determinaram um índice de cristalinidade de 59% para a polpa de celulose branqueada pelo processo kraft, já as NFC obtidas por hidrólise enzimática por celulase comercial (OptimashTM BG) posterior a fibrilação mecânica apresentaram índice de cristalinidade de 68,48%.

Os índices de cristalinidade apresentados neste trabalho estão acima dos valores encontrados na literatura (entre 65% e 69%) para NFC, valores estes significativos e que podem ser considerados bastante satisfatório, visto que não foram utilizados tratamentos químicos e físicos como os trabalhos citados previamente. A diferença pode ser associada tratamento realizado no material de partida (pelo processo Kraft), bem como na eficiência das enzimas na digestibilidade da celulose, pelo processo de obtenção de nanocelulose, ou mesmo na análise dos difratogramas pelo método escolhido.

A análise dos índices de cristalinidade demonstrou o potencial para aplicação do material residual da hidrólise enzimática, caracterizados como NFC. Propriedades físicas e mecânicas da celulose são afetadas diretamente pela cristalinidade, que irão interferir na eficiência como agente de reforço. Estruturas mais organizadas e com maior cristalinidade, oferecem ao filme maior barreira de reforço (Dufresne, 2012; Lavoine *et al.*, 2012). Assim, NFC obtidas pelo processo enzimático podem ser consideradas interessantes para aplicação como agente de reforço pelos índices de cristalinidade apresentados.

5.9.4 – Análise de grupos funcionais por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A análise de grupos funcionais presentes na polpa de celulose e no material residual a hidrólise enzimática é apresentada na Figura 30, para as condições da validação experimental TS 20%, CE 10 em tempos de 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. Como não houve diferença observável entre as condições estudadas no planejamento experimental, estes espectrogramas encontram-se no anexo 2.

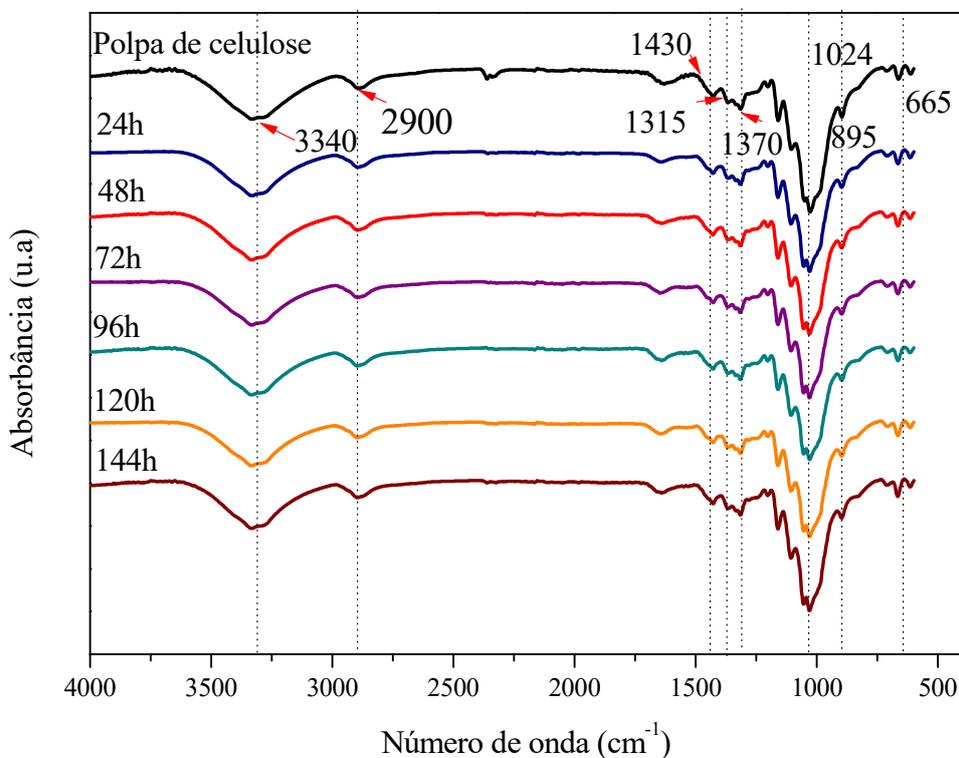


Figura 30 - Espectrogramas de FTIR para polpa de celulose e condição de validação do planejamento experimental (TS 20%, CE 10) em diferentes tempos de hidrólise para temperatura de 35°C.

Os espectros de infravermelho foram obtidos para cada condição de hidrólise estudada em comparação com a polpa de celulose inicial. Pouca diferença foi observada entre os espectros em relação ao material inicial e todas as condições hidrolisadas, que apresentam bandas referentes à celulose e hemicelulose.

Bandas de deformação e estiramento da celulose referente a ligações COC, CCO e CCH do anel de estiramento foram observadas na região 895 cm^{-1} para a polpa de celulose referente à celulose amorfa. Nas condições posteriores a hidrólise ocorreu pequena redução nestes picos e também um deslocamento para 898 cm^{-1} . A presença das bandas citadas indica presença de celulose amorfa para ser transformada em glicose por ação de endoglicanases/ β -glicosidasases. Na região 665 cm^{-1} atribuídas à grupos C-OH fora do plano, também pertencente à celulose. Deformações angulares assimétricas de grupos CH e COH em 1430 cm^{-1} e angulares simétricas de grupos CH_2 em 1315 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} são atribuídos à celulose cristalina, respectivamente (Silverstein, Bassler e Morrill, 1979; Oh *et al.*, 2005; Dai e Fan, 2011). A permanência das bandas 1315 cm^{-1} a 1430 cm^{-1} em todos os espectros mostra que não houve degradação de celulose cristalina por ação de exoglicanases.

Absorção de água é referenciada pelas bandas 1630 cm^{-1} . Picos com absorção entre 1023 e 1076 cm^{-1} referem-se a ligações C-O-C presentes em anéis de piranose e se referem a estruturas associadas à hemicelulose. Além das bandas já apresentadas, outras bandas características de hemicelulose e celulose também são vistas em 2900 cm^{-1} e 3339 cm^{-1} , e entre 1105 cm^{-1} e 1160 cm^{-1} que referem-se ao estiramento simétrico de C-H e OH, e ao estiramento de ligações C-O-C nos anéis de glicose (Dai e Fan, 2011).

Apesar da pequena diferença entre os espectros, quando relacionados com a análises de raio-X foi possível detectar a presença de celulose cristalina, caracterizando nanocelulose no material residual a hidrólise enzimática em todas as condições estudadas.

5.9.5 – Análise da estabilidade térmica por termogravimetria

A estabilidade térmica da polpa de celulose, das NFC e dos NCC foram avaliados e são apresentados na Figura 31. Devido as pequenas diferenças entre os termogramas das demais condições avaliadas, as curvas e as tabelas com os valores iniciais de degradação térmica foram apresentadas no anexo 3 e 4, respectivamente.

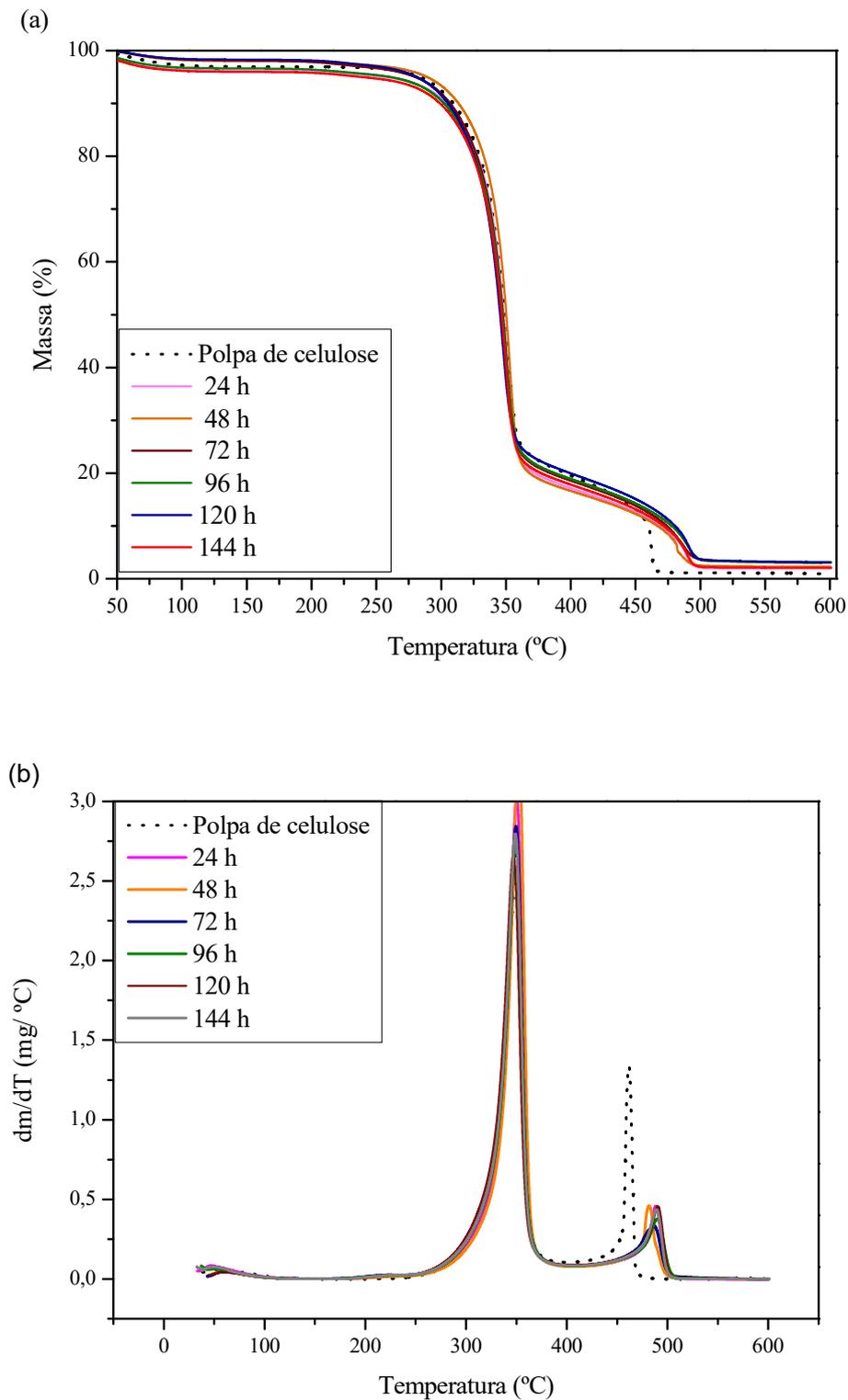


Figura 31 - (a) Termogramas da polpa de celulose e de NFC para condição TS 20, CE 10 em diferentes tempos de reação; (b) DTG da polpa de celulose e de NFC para condição TS 20, CE 10, em diferentes tempos de reação. Atmosfera: ar sintético.

O perfil das curvas de TG/DTG apresentados na Figura 31 para a polpa de celulose e NFC na condição TS 20, CE 10 é característico dos três principais constituintes de materiais lignocelulósicos (Yang *et al.*, 2007). Segundo Martins e colaboradores (2011) a complexidade da degradação da celulose se deve a etapas de reação paralelas e consecutivas, que foram relatadas por Corradini e colaboradores (2009) como sendo reações de despolimerização, desidratação e decomposição das unidades glicosídicas. Pela análise das curvas de TG/DTG são observados três estágios iniciais de perda de massa, sendo o primeiro entre 50 e 100°C, que corresponde a evaporação de água em 3% de massa em todas as amostras. O segundo evento térmico, ocorre em 331°C para polpa de celulose e em 323°C para NFC, sendo possível observar significativa queda em torno de 70% de massa atribuída à degradação de celulose. A pirólise da celulose acontece entre 310 e 360°C e está associada ao evento térmico da lignina, entre 200°C e 550°C e ao evento da hemicelulose, entre 240 e 310°C (Corradini *et al.*, 2009). Já o terceiro evento térmico observado nas curvas apresentadas ocorreu em 494°C para a polpa de celulose e 464°C para NFC, que foi atribuído ao baixo teor de lignina presente.

Nota-se que o terceiro evento térmico apresentado pelo pico da DTG apresentou-se com menor temperatura, o que pode ser atribuído à conversão de hemicelulose e lignina por enzimas acessórias presentes no complexo de enzima comercial. O aumento da cristalinidade da celulose também propicia ganhos na estabilidade térmica, característica desejada considerando a aplicação em materiais poliméricos, que são processados em elevadas temperaturas (Dufresne, 2012; Deepa *et al.*, 2015).

George e colaboradores (2011) constataram a superioridade térmica de NCC de celulose bacteriana obtidos via hidrólise enzimática em relação aos obtidos por ácido sulfúrico. Os NCC obtidos por hidrólise enzimática iniciaram o processo de degradação em 359°C, enquanto os NCC obtidos por processos ácidos foram reportados como 184°C. A presença de grupos sulfatos na superfície da celulose levou a menor estabilidade térmica pelo efeito catalítico que estes grupos exercem na temperatura (Roman e Winter, 2004). Sendo assim, NFC e NCC obtidos por hidrólise enzimática apresentaram superioridade nas propriedades térmicas em relação à utilização de hidrólise ácida como via de degradação de celulose amorfa e consequente obtenção de nanocelulose.

6 – Experimentos em Biorreator

Algumas das melhores condições de hidrólise enzimática da polpa de celulose selecionadas nos experimentos realizados em frascos agitados foram avaliadas em experimentos em biorreator de 5L visando à obtenção dos parâmetros necessários para estudos de aumento de escala, bem como para avaliar as características dos produtos gerados sob as diferentes condições operacionais. Dentre os parâmetros determinados se incluem o tempo de mistura e rotação, o consumo de potência, a viscosidade aparente e o número de Reynolds modificado para as condições TS 10%, CE 5 e 10 mg/ g de celulose e TS 15%, CE 10 mg/g de celulose.

6.1 – Determinação do tempo de mistura e rotação

O tempo de mistura (t_m) é um importante parâmetro de desempenho econômico e tem influência direta no custo operacional do processo, bem como nas características do produto gerado.

Para a combinação de impelidores EEUP-EEDP foram avaliados o tempo de mistura em rotações 282, 375, 470, 563 e 750 rpm, determinados pelo método de pulso de temperatura, para a polpa de celulose com um teor de sólidos de 10% (m/v) e são demonstrados na Figura 32.

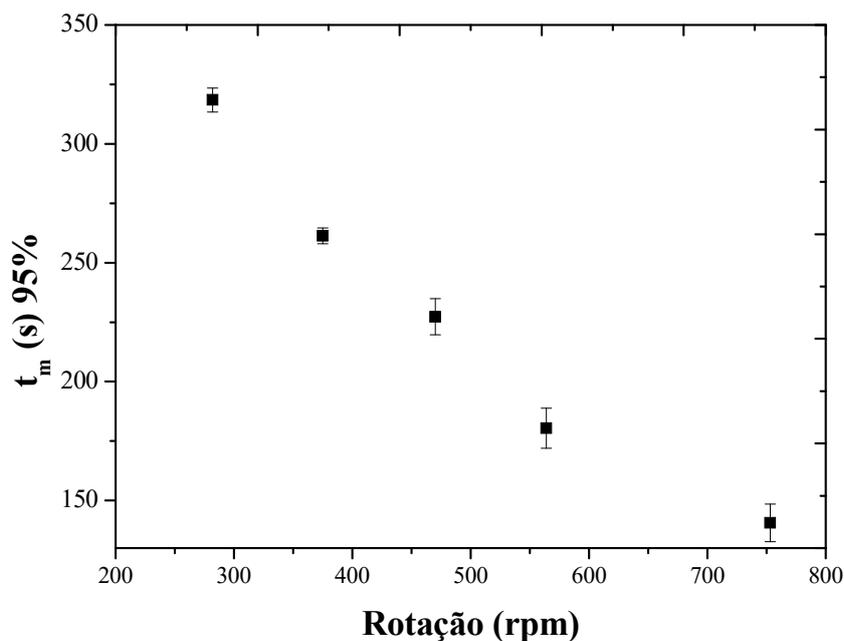


Figura 32 - Tempo característico de reação em diferentes rotações para a configuração de impelidores EEUP-EEDP em diferentes rotações.

A escolha da rotação a ser trabalhada nos experimentos de hidrólise se deu com base nos dados apresentados na Figura 32.

Os resultados obtidos mostram que com o aumento da rotação ocorreu diminuição no tempo de mistura. Isso pode ser explicado pelo fato da agitação melhorar o processo de transferência de massa, melhorando a homogeneização do sistema. No entanto, o consumo de potência é proporcional a N^3 , o que faz com que maiores rotações levem a maiores gastos de energia, aumentando os custos da operação. Portanto, um compromisso entre esses dois parâmetros deve ser considerado.

Assim, a rotação de 470 rpm foi selecionada, pois o tempo de mistura em 470 rpm mostrou-se 13% menor do que a rotação de 375 rpm. Em comparação com a rotação 564 rpm, o tempo de mistura em 470 rpm apresentou-se 21% maior. Apesar das diferenças apresentadas entre 470 rpm e 564 rpm, procurou-se trabalhar na rotação que consumisse menos energia, porém tivesse uma mistura eficiente, o que não foi o caso em relação à rotação de 375 rpm, que não apresentou boa homogeneização, levando a presença de zonas estagnadas.

Corrêa, Cruz e Badino (2016) avaliaram o parâmetro tempo de mistura para selecionar a melhor rotação para estudar a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar. Os autores selecionaram a rotação de 476 rpm como a rotação que apresentou um tempo de mistura adequado para homogeneização do material associada a um menor consumo de potência em relação às rotações de 659 e 753 rpm, utilizando o mesmo sistema e carga de sólidos do presente estudo. Os valores de tempo de mistura reportados foram inferiores (47,5 s) aos aqui apresentados (221 s), porém a diferença de material justifica tal discrepância. A polpa de celulose apresenta aparência característica de algodão, possuindo uma alta capacidade de absorver a fração líquida utilizada no experimento, e com isso preenchendo grande parte do volume do reator. Já o bagaço de cana possui aparência de fibras e ocupa menor volume no reator na presença do líquido (tampão), não absorvendo tanto o líquido em comparação com a polpa de celulose. Essas características certamente contribuíram para a diferença na homogeneização desses materiais.

Palmqvist e Wiman e Lidén (2011) realizaram estudos de mistura de uma conífera (*Picea abies*) e compararam diferentes rotações no processo de hidrólise enzimática da biomassa utilizada. Variando entre 25 e 500 rpm concluíram que maiores rotações levavam a maiores conversões enzimáticas. O aumento da rotação leva a maiores taxas de cisalhamento, já que a velocidade do impelidor é proporcional à taxa de cisalhamento.

Maiores taxas de cisalhamento promovem a desagregação das fibras, facilitando o acesso da enzima. Além disso, maiores velocidades de agitação resultam em menores películas de líquido estagnado em torno de cada fibra, levando a menores distâncias necessárias de difusão. No entanto, altas taxas de cisalhamento também podem comprometer a integridade das enzimas. Assim, um compromisso entre esses efeitos devem ser avaliados.

A escolha do tipo de impelidor também influencia no parâmetro tempo de mistura. Szoplik e colaboradores (2008) trabalhando com um fluido não-Newtoniano mostraram que impelidor axial de fluxo descendente (*down pumping*) apresentou t_m 30% menor em relação ao impelidor de fluxo ascendente (*up pumping*). Bustamante e colaboradores (2013) mostraram que a associação de impelidores EEUP e EEDP promovem boa homogeneização, melhoram no processo de transferência de massa e apresentam baixo cisalhamento, sendo indicadas principalmente para suspensões com elevada viscosidade, como é o caso da polpa de celulose. Ainda neste sentido, Corrêa, Cruz e Badino (2016) quando compararam diferentes configurações de impelidores (RT e RT, RT-EE e EEUP-EEDP) avaliando o t_m , observaram que a combinação entre os impelidores orelha de elefante levaram a menores t_m para estas configurações em todas as rotações avaliadas.

6.2 – Hidrólise enzimática da polpa de celulose em biorreator

Após a escolha da rotação, foram definidas as condições de hidrólise enzimática da polpa de celulose a serem realizadas no reator. Foram realizados testes em condições de TS 10%, CE 5 e 10 mg/g de celulose e também na condição TS 15%, CE 10 mg/g de celulose. As escolhas das condições foram baseadas nos resultados encontrados na região *desirability*, apresentados no item 5.6. Os resultados obtidos para produção de glicose em função do tempo estão apresentados na Figura 33.

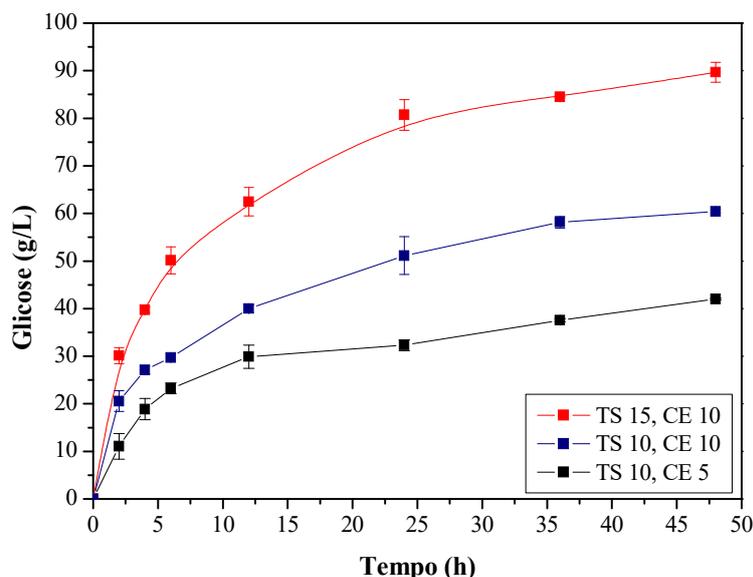


Figura 33 - Produção de glicose em função do tempo de hidrólise enzimática da polpa de celulose para diferentes condições realizadas em biorreator a 50°C, pH 5.0 e 470 rpm.

É possível observar que a produção de glicose foi maior para TS 15%, CE 10mg/g de celulose, chegando próximo a $90,6 \pm 0,80$ g/L de glicose em 48 horas de reação. Em comparação com os experimentos realizados em frascos agitados em incubadora shaker a produção em 24 h foi de $94,0 \pm 2,26$ g/L. A diferença entre os valores se deve provavelmente a limitações de transferência de massa mais pronunciada nos experimentos de maior escala. No entanto, considera-se que esses valores obtidos no reator são bastante satisfatórios.

Para os experimentos em reator de TS 10% e CE 5mg/g de celulose a produção de glicose foi de $42,0 \pm 0,2$ g/L em 48h. Em comparação com os experimentos realizados em frascos agitados, a produção de glicose em reator foi menor. Para os experimentos realizados em frascos agitados, a produção de glicose em 24h foi de $50,6 \pm 0,3$ g/L enquanto que no reator foi de $38,1 \pm 1,1$. Tal discrepância na produção se também se justificam a limitações de transferência de massa, que foram mais pronunciadas nos experimentos com CE 5 mg/g de celulose devido a menor concentração de enzima. Para os experimentos com carga enzimática de 10 mg/g celulose, a atuação da enzima diminui os problemas causados pelas limitações de transferência de massa, o que justifica os valores mais próximos dos experimentos realizados em frascos agitados e reator.

Além dos problemas de transferência de massa pronunciados no início dos experimentos, que posteriormente são contornados pela atuação das enzimas, pode-se associar as menores conversões nos experimentos realizados em biorreator ao excesso de cisalhamento

causado nas enzimas devido a agitação mais rigorosa em comparação com os experimentos em frascos agitados. Os mecanismos de atuação catalítica da enzima envolvem mecanismos de transferência de massa e de transporte da enzima ao substrato, bem como características reológicas relacionadas com a viscosidade e a taxa de cisalhamento. A liquefação do substrato no decorrer da hidrólise pode levar um aumento no cisalhamento, podendo levar a desativação da enzima devido a longos tempos de exposição a esta condição (Samaniuk *et al.*, 2011). A desativação das enzimas vem acompanhada de mudanças na conformação estrutural como relatado por Kim e colaboradores (1982), impedindo que a enzima atue de maneira efetiva na conversão de celulose em glicose. Estudos de Tengborg, Galbe e Zacchi, (2001) mostraram que a agitação em excesso afeta a conversão de celulose, por desativação da enzima causadas pelas forças de cisalhamento na região do impelidor. Além disso, esses autores relataram que β -glicosidases são mais sensíveis a forças de cortes em comparação com outras celulases, levando a redução na produção da glicose.

O estudo de Jorgensen e colaboradores (2007) relatam que a mistura do substrato em adequadas agitações promovem um adequado contato com a enzima, favorecendo processos de conversão. Assim, para evitar a desativação enzimática, uma proposta para trabalhos futuros seria o estudo da redução da agitação no decorrer da hidrólise após a liquefação do substrato insolúvel.

Para esse conjunto de experimentos em biorreator, também foram construídas as curvas de conversão de celulose (Figura 34).

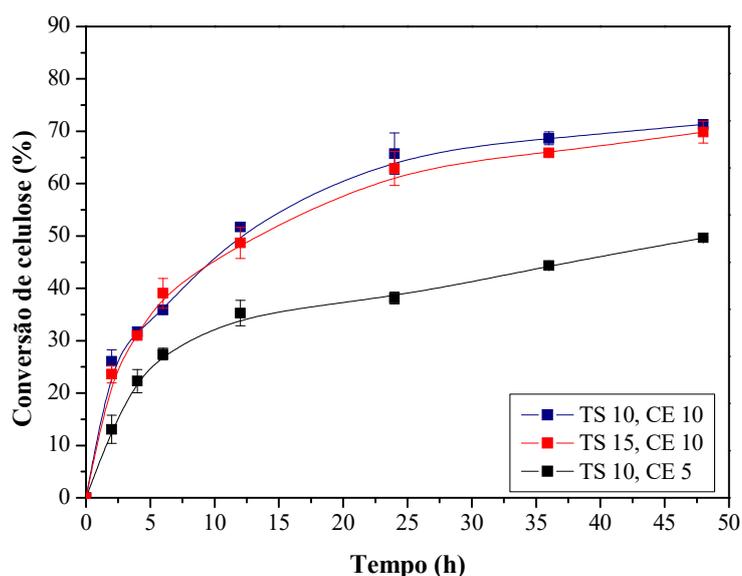


Figura 34 - Conversão de celulose em glicose para a hidrólise enzimática da polpa de celulose realizada em biorreator.

É possível verificar que as conversões foram próximas para os experimentos TS 15%, CE 10 mg/g de celulose e TS 10%, CE 10 mg/g de celulose, mostrando que a carga enzimática de 10 mg/g de celulose é suficiente para contornar as limitações causadas pelo processo de transferência de massa e de calor, mesmo na condição de 15% de sólidos. Já nos experimentos TS 10%, CE 5 mg/g de celulose, a conversão foi significativamente menor.

Em todos os experimentos foram observadas a formação cavernas, um processo em que o material fica estagnado nas paredes do reator, dificultando os processos de difusão, levando a limitações na conversão. A Figura 35 mostra o efeito caverna em TS 15%, CE 10 mg/g de celulose após 1h30 de reação.



Figura 35 - Efeito caverna durante a hidrólise enzimática.

Misturas em maior escala para fluidos não-Newtonianos são mais complexas que para fluidos Newtonianos, uma vez que a viscosidade aparente é afetada pela taxa de cisalhamento, podendo variar consideravelmente de uma região para outra dentro do reator. Na região próxima às paredes do vaso, a velocidade do líquido é baixa ou mesmo estagnada. Este efeito levou ao termo caverna, para descrever a estagnação da mistura junto à parede (McCabe, Smith e Harriott, 2005).

O efeito caverna foi observado em todas as condições de hidrólise avaliadas. No entanto, para as condições de maiores cargas de enzima e menores teores de sólidos, como na condição de TS 10% e CE 10 mg/g de celulose tiveram a completa homogeneização em menores tempos de reação, sendo em torno de 2 h para a condição TS 10 e CE 10 mg/g de celulose, 4 h para TS 10% e CE 5 mg/g de celulose e 6 h para TS 15% e CE 10 mg/g de celulose.

Em condições experimentais em que a concentração de enzima foi maior em menor teor de sólidos (TS 10% e CE 10 mg/g de celulose), observa-se que o tempo necessário para homogeneização do sistema foi reduzido em comparação a condição TS 10% e CE 5 mg/g de celulose. Assim, pode-se sugerir que a atuação da enzima foi responsável pela diminuição das zonas estagnadas, levando a liquefação do fluido, melhorando a transferência de massa do sistema. Na condição em que havia maior concentração de enzima, esse processo foi facilitado. Para TS 15%, CE 10 mg/g de celulose a menor presença de líquido no sistema também dificultou a eliminação das zonas estagnadas, sendo necessários maiores tempos para que o material tivesse completa homogeneização. Em maiores teores de sólidos a mistura adequada torna-se crucial, não apenas por evitar a formação de gradientes de concentração, mas também pela mistura facilitar o acesso da enzima ao substrato, tornando-se um efeito sinérgico. Para os experimentos com carga de enzima de 10 mg/g de celulose as conversões chegaram próximas a 72%, mostrando que as limitações iniciais do processo foram contornadas, chegando a altas concentração de glicose e em tempos menores de reação aos encontrados na literatura.

Palqmist e colaboradores (2011) realizaram a hidrólise enzimática em reator do tipo tanque agitado com impelidores *pitched blade* de uma conífera (*Picea abies*) em teor de sólido de 10% em duas diferentes cargas enzimáticas de Cellic CTec, sendo 10 e 20 FPU/g de glican. Os autores verificaram a conversão de 60% do material utilizado em 50 h de reação a rotação de 500 rpm em 20 FPU/g de glican. Somente após 96 hs autores obtiveram em torno de 70% de conversão do material. Em comparação, para a hidrólise na rotação de 300 rpm os autores obtiveram conversões em torno de 50%, após 96 h de reação. Quando a carga de enzima foi reduzida à metade (10 FPU/g glican), o máximo de conversão que se alcançou em 500 rpm foi de 50% e de 40% quando trabalhado com 300 rpm de agitação. Os autores concluíram que o efeito de mistura propiciado por maiores velocidades de agitação mantiveram-se positivos em todo o tempo de hidrólise para ambas as cargas de enzima.

Kadic, Palmqvist e Liden, 2014 hidrolisaram a madeira pré-tratada (*Picea abies*) em 7 e 13% de teor de sólidos com enzima Cellic CTec 2em reator do tipo tanque agitado e impelidores *pitched-blade* em velocidades de 100, 300 e 600 rpm. Quando trabalhado em 13% de teor de sólidos, a agitação teve grande influência na conversão de celulose em glicose sendo reportados valores de 20, 32 e 37% para 100, 300 e 600 rpm, respectivamente. Grandes zonas estagnadas foram observadas no decorrer da hidrólise a 100 rpm, explicando menores valores de conversão. Para 7% de teor de sólidos as conversões

foram de 31% a 100 rpm e 32% a 300 rpm após 48 h. A menor viscosidade da condição de menor teor de sólido permitiu que o impelidor promovesse movimento ao longo do reator, mesmo em menores rotações, reduzindo as limitações de transferência de massa pelo aparecimento das zonas estagnadas.

Corrêa, Badino e Cruz (2016) hidrolisaram bagaço de cana-de-açúcar utilizando como complexo enzimático a Cellic CTec 2. Na reação apresentada, os autores obtiveram 75,5% de conversão na hidrólise, chegando a produção de 35,9 g/L de glicose com a combinação de impelidores EEDP-EEUP. Os autores concluíram que a configuração de impelidores selecionada promoveu melhor homogeneização do material utilizado, levando a melhores conversões em comparação com outros tipos de impelidores.

6.3 – Consumo de Potência

A estimativa do consumo de potência é necessária para estudos de aumento de escala, pois o consumo de energia requerido para o processo de mistura contribui significativamente nos custos do processo.

O consumo de potência em função do tempo de hidrólise para as três condições estudadas foram acompanhadas e são apresentadas na Figura 36 para as condições de TS 10%, CE 5 mg/g de celulose e TS 10%, CE 10 mg/g de celulose e na Figura 37 para a condição de TS 15%, CE 10 mg/g de celulose.

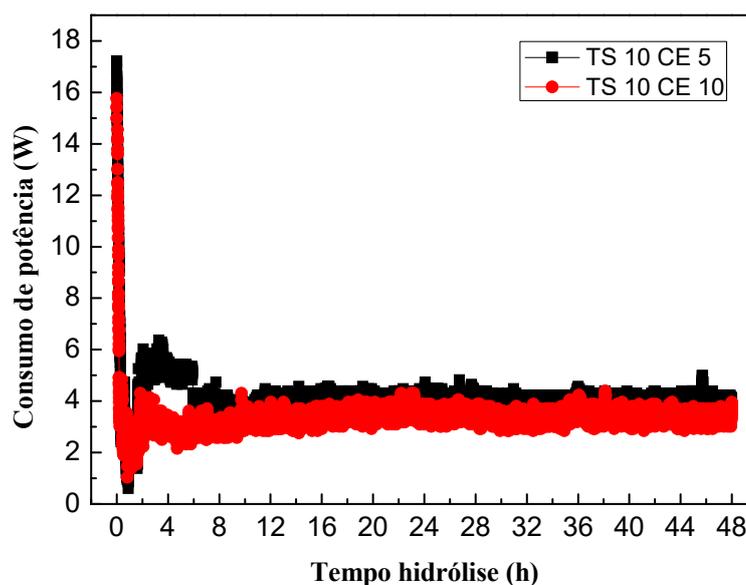


Figura 36 - Consumo de potência em função do tempo de hidrólise para os experimentos de 10% de TS, 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.

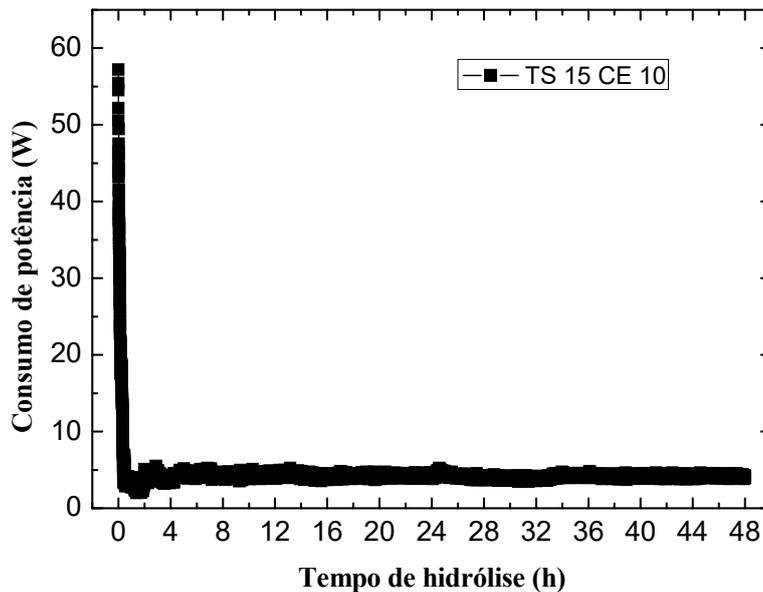


Figura 37 - Consumo de potência em função do tempo para o experimento de 15% de TS 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.

Observa-se que para as hidrólises com TS 10% (Figura 36) tiveram perfis de consumo de potência semelhantes. O consumo foi rapidamente reduzido sendo inicialmente de 16,80 W para TS 10%, CE 5 mg/g de celulose chegando a 3,70 W ao fim das 48 h de hidrólise. Para TS 10%, CE 10 mg/g de celulose o consumo de potência foi de 15,42 W sendo reduzido para 3,96 W ao fim da hidrólise. A redução no consumo de potência pode ser atribuída à atuação da enzima, resultando na diminuição da viscosidade do material devido à degradação da fibra, sendo necessária menor energia para rotação dos impelidores. A energia total gasta na reação foi de 197,47 W.h para TS 10%, CE 5 mg/g de celulose e 160,88 W. h para TS 10% e CE 10 mg/g de celulose. Pode ser observado na Figura 36 que em torno de 2 h para TS 10% e CE 10 mg/g de celulose e 3h40 para TS 10% e CE 5 mg/g de celulose houve um pequeno aumento no consumo de potência atribuído ao momento em que todo o material estagnado na parede do reator é misturado com o material próximo ao impelidor, tendo assim um momentâneo aumento na viscosidade. Para a condição TS 15%, CE 10 mg/g de celulose este evento ocorreu em torno de 6h.

Para TS 15%, CE 10 mg/g de celulose o consumo de potência inicial foi significativamente maior em comparação aos experimentos de TS 10%. O consumo foi de 57,19 W sendo reduzido para 4,22 W ao final das 48 h de hidrólise. Neste experimento, a energia total gasta foi de 206,93 w.h.

Os dados de consumo de potência mostram que além do teor de sólidos, a carga de enzima usada na reação é de grande importância, já que maiores concentrações de enzima reduzem consideravelmente a energia gasta no processo. Com o aumento da concentração de enzima em TS 10% a energia gasta no processo teve uma redução em torno de 20%. Essa redução no consumo de energia, quando associado a maior concentração de glicose produzida e maior conversão de celulose, contribui para justificar o aumento da carga enzimática, desde que se busque favorecer o processo econômico global.

Palmqvist e Wiman e Lidén (2011) observaram uma rápida redução no consumo de potência durante a hidrólise enzimática de *Picea abies* e associaram maiores consumos de energia nos processos que ocorreram com menores cargas de enzima. Dobrando a carga de enzima, houve uma redução de 15 a 25%, dependendo da agitação utilizada. Além disso, o aumento na carga de enzimas resultou em maiores conversões, chegando a 72% com o dobro de enzima contra 54% em menor carga enzimática. No entanto, vale ressaltar que o custo da enzima deve ser levado em consideração na análise econômica global do processo.

Correa, Badino e Cruz (2016) relataram gasto energético de 267,1 W.h na hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar em 10% de TS e CE de 10 FPU/g de celulose do complexo enzimático Cellic CTec 2. O consumo de potência no início do processo foi em torno de 13 W para os impelidores EEDP_EEUP, chegando próximo a 3 W no decorrer do processo. O maior gasto energético relatado pode estar associado à atuação menos eficiente do complexo enzimático usado, além da diferença entre as biomassas hidrolisadas.

6.4 – Análises Reológicas

A determinação das características reológicas do fluido ao longo do processo de hidrólise são necessárias para o estudo de aumento de escala, pois irão impactar diretamente no tipo de mistura, de equipamentos e condições necessárias para garantir a eficiência do processo.

Tendo avaliado os valores de massa específica (ρ) e os valores de n e K para cada condição de teor de sólido e carga enzimática, foram obtidas as viscosidades aparentes para todas as condições de hidrólise avaliadas por meio da Equação 4 e os dados estão apresentados na Figura 38.

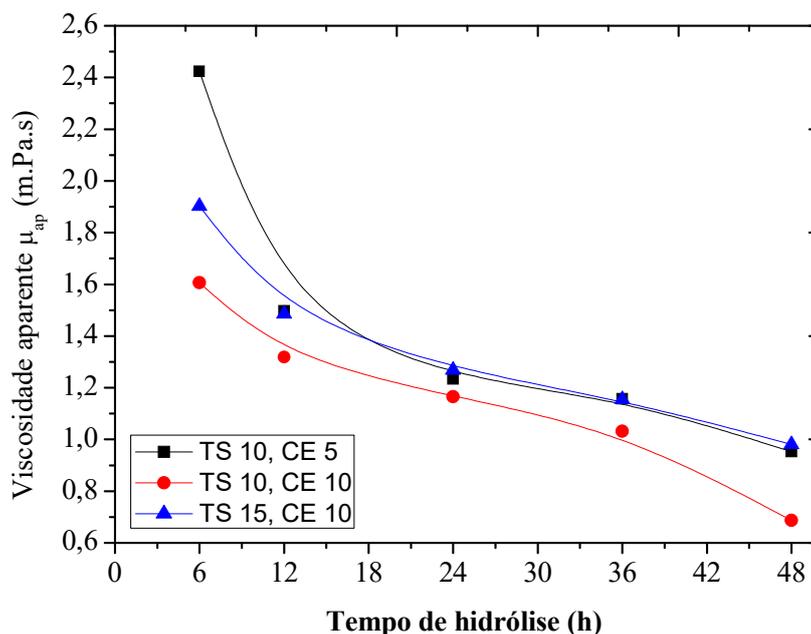


Figura 38 - Viscosidade aparente em função do tempo de hidrólise

A viscosidade aparente para os fluidos trabalhados apresentaram perfis semelhantes. Antes de 6h de reação a elevada densidade do material não permitiu que fosse avaliada a viscosidade aparente. Em todas as condições houve significativa redução da viscosidade aparente do material. Observa-se que para a condição de TS 10%, CE 10 mg/g de celulose a viscosidade aparente foi menor em todos os tempos avaliados. Para a condição de TS 15%, CE 10 mg/g de celulose também houve significativa redução da viscosidade aparente do material, estando em valores intermediários às condições trabalhadas. Os valores de conversão apresentados na Figura 34 mostram que em 6h de reação, na condição TS 10%, CE 5 mg/g de celulose somente em torno de 28% de celulose havia sido convertida em glicose, justificando a maior viscosidade aparente em relação as demais condições que apresentaram em torno de 40% de conversão.

A menor concentração de água livre no meio leva a uma maior interação entre as partículas, aumentando a viscosidade do meio, especialmente na presença de um emaranhado de partículas amorfas. A aglomeração do material pelo contato partícula-partícula resulta em maior resistência para fluir, por consequência maior viscosidade (Du *et al.*, 2014). Assim, maiores teores de sólidos resultam em maiores viscosidades. Com o decorrer da hidrólise, a redução da viscosidade aparente era esperada, já que a ação das enzimas favorece a degradação das fibras, levando a diminuição na concentração de sólidos insolúveis no meio, sendo os componentes solubilizados para a fase líquida. Além disso, durante a hidrólise,

ocorrem mudanças na morfologia do material por ação das enzimas pela redução das cadeias médias de celulose e hemicelulose ou pela degradação das ligações das cadeias de água presentes nas estruturas dos materiais lignocelulósicos.

Observa-se que para a condição de TS 10%, CE 10, a viscosidade aparente é reduzida em maior velocidade que TS 10%, CE 5. O mesmo foi observado por Du e colaboradores (2014), que constataram significativa redução na viscosidade aparente durante a hidrólise da palha de milho em cargas enzimáticas de 7 e 10 FPU/g de material em 25% de teor de sólidos, sendo esta queda mais pronunciada na maior concentração de enzima.

Caldas Pereira e colaboradores (2011) avaliaram a viscosidade aparente no decorrer da hidrólise para o bagaço de cana-de-açúcar e verificaram significativa redução durante o decorrer da reação. A viscosidade aparente inicial do material utilizado a 10% foi de 3,5 MPa, aproximando a 0,007 MPa no hidrolisado final. Os autores ainda relataram que a viscosidade aparente é fortemente dependente do tempo de hidrólise e também da taxa média de cisalhamento.

Em altos teores de sólidos, materiais lignocelulósicos tem característica não-Newtoniana, tendo grandes viscosidades aparentes e taxas médias de cisalhamentos que aumentam com o acréscimo da concentração de sólidos insolúveis no meio (Du *et al.*, 2014). As taxas médias de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m^0$) foram obtidas em função do tempo de hidrólise para cada condição estudada, bem como o K (índice de consistência) e n (índice de comportamento de escoamento) em função do tempo de hidrólise. Estes dados são apresentados nas Figuras 39, 40 e 41, respectivamente.

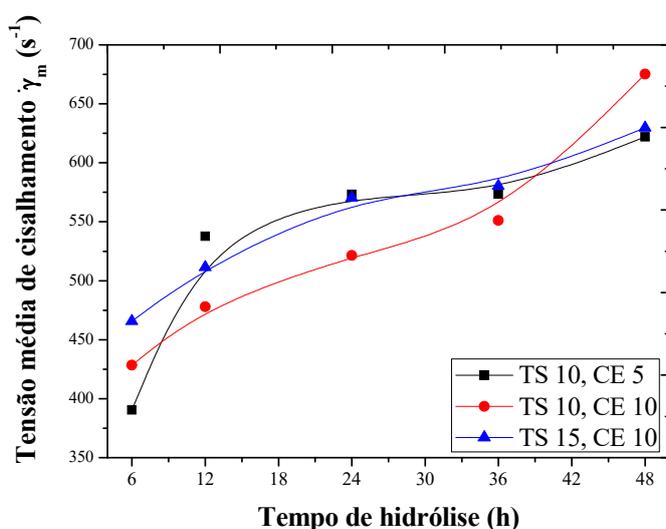


Figura 39 - Taxa de cisalhamento média em função do tempo de hidrólise para 10% e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.

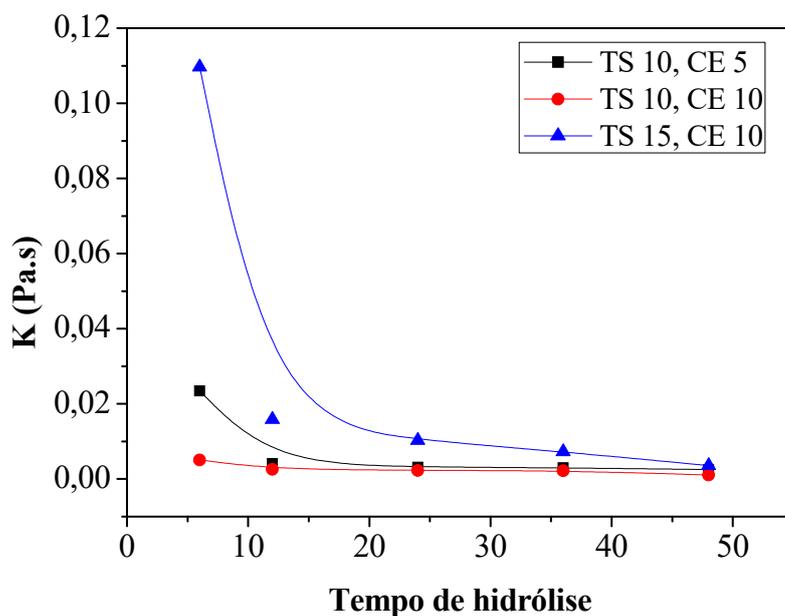


Figura 40 - Índice de consistência em função do tempo de hidrólise enzimática da polpa de celulose em 10 e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.

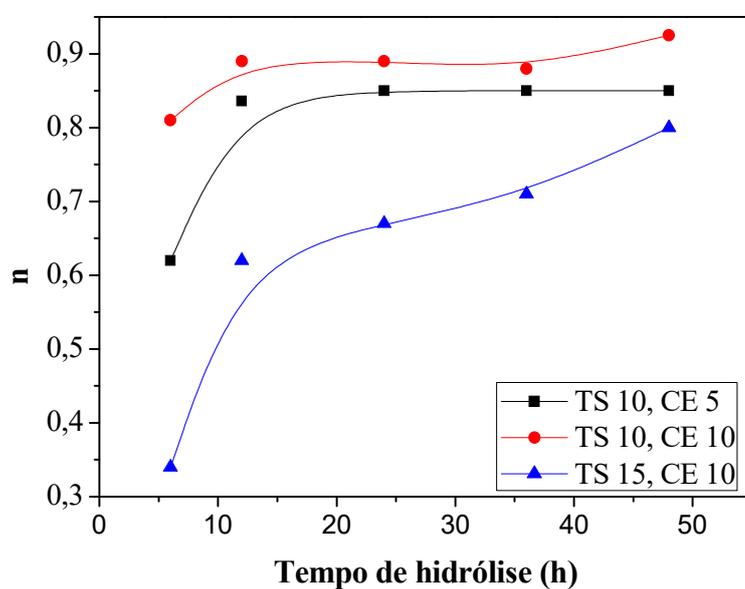


Figura 41 - Índice de comportamento de escoamento em função do tempo de hidrólise 10 e 15% de TS a 50°C, pH 5,0 e 470 rpm.

No decorrer da hidrólise observa-se uma redução nos valores de índice de consistência K (Figura 40) e consequente aumento no índice de comportamento de escoamento n (Figura 41), fazendo com que haja aumento na taxa média de cisalhamento (Figura 39) e consequente redução na viscosidade aparente.

Observa-se um comportamento inversamente proporcional entre os dados de viscosidade aparente e taxa média de cisalhamento, característica relatada em fluidos pseudoplásticos. Para a condição TS 10%, CE 10 mg/g de celulose foi observado maior taxa média de cisalhamento no final da hidrólise, além de menores valores de K em relação às demais condições, levando a menor viscosidade aparente e, conseqüentemente, maior índice de comportamento de escoamento. Este fato se deve a atuação da enzima que foi desfavorecida em processos de maiores teores de sólido, como TS 15% e também na condição de menor carga enzimática TS 10%, CE 5 mg/g de celulose. Apesar dos altos valores de K para as condições desfavorecidas pelas limitações encontradas, a ação enzimática associada à agitação do impelidor atuou de maneira a aumentar o índice de comportamento de escoamento, tendo mudança bastante significativa na condição TS 15%, CE 10 mg/g de celulose, que apresentou significativo aumento do índice de comportamento de escoamento com o passar da reação.

Du e colaboradores (2014) ao compararem o desempenho de dois tipos de reatores para hidrólise da palha de milho observaram que o reator cuja eficiência foi mais significativa no processo de liquefação do material resultou em um hidrolisado com baixos valores de K e conseqüente aumento no valor de n, refletindo a baixa pseudoplasticidade da suspensão. Os autores também associaram o aumento de n com a diminuição no grau de polimerização da celulose e seu colapso estrutural. Por fim, concluíram que os parâmetros n e K permitiram acompanhar o a viscosidade aparente e a taxa de cisalhamento da suspensão, auxiliando na compreensão da reologia do material sendo possível determinar a força necessária de operação do equipamento.

6.5 - Número de Reynolds modificado

O número de Reynolds é uma das variáveis de projeto mais importante para o estudo de um sistema de agitação, pois relaciona as características do sistema com as propriedades do fluido.

Foram obtidos os valores de Re_m para as hidrólises realizadas e os dados são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Número de Reynolds modificado em função do tempo de hidrólise

Tempo (h)	Re _m		
	TS 10, CE 5	TS 10, CE 10	TS 15, CE 10
6	2,17 x 10 ⁴	3,28 x 10 ⁴	2,82 x 10 ⁴
12	4,86 x 10 ⁴	3,99 x 10 ⁴	3,61 x 10 ⁴
24	5,72 x 10 ⁴	4,51 x 10 ⁴	4,23 x 10 ⁴
36	6,08 x 10 ⁴	5,10 x 10 ⁴	4,64 x 10 ⁴
48	7,36 x 10 ⁴	7,66 x 10 ⁴	5,47 x 10 ⁴

Para valores de Re maiores que 2×10^4 o regime de escoamento é turbulento e para esta condição Np é constante, e o consumo de potência (P) não depende mais da viscosidade do material (Côrrea, Badino e Cruz, 2016).

Observa-se que nas condições experimentais nas quais a viscosidade aparente foram maiores, como para TS 10%, CE 5 mg/g de celulose e TS 15%, CE 10 mg/g de celulose os valores de Re_m foram menores, sendo uma relação inversamente proporcional conforme apresentado na Equação 5.

O aumento do tempo de hidrólise resultou em maiores valores de Re_m, tornando o escoamento cada vez mais turbulento, tendo uma redução na pseudoplasticidade do material. O mesmo comportamento foi mostrado por Caldas Pereira e colabores (2011) na hidrólise do bagaço de cana, um fluido pseudoplástico teve o aumento no número de Reynolds com o decorrer da hidrólise, passando de um regime de transição um regime de escoamento turbulento.

Considerando que parte do regime da hidrólise seja laminar há a necessidade de entender e contornar as limitações apresentadas por este escoamento. Neste sentido, Wu e colaboradores (2015) visando melhorias no projeto de tanques agitados estudaram a eficiência de mistura de materiais viscosos. Os autores relataram que misturas com alta viscosidade apresentam maior resistência, já que o número de Reynolds é reduzido. Observaram também que nas regiões de cavernas e zonas estagnadas, para melhor homogeneização é necessário quebrar a simetria característica de fluxo laminar de maneira a produzir uma mistura caótica e eficiente. Uma alternativa encontrada pelos autores é trabalhar no design dos reatores, como por exemplo, pelo deslocamento ou inclinação dos impelidores, conceito que ainda deve ser trabalhado para desenvolvimento de escala industrial. Por fim, os autores concluíram que a

otimização do processo pelo design do reator poderia melhorar o processo de mistura, com a redução de zonas estagnadas facilitando a entrada de energia no sistema.

Em estudos de ampliação de escala dentre os critérios mais utilizados para biorreatores de mistura estão: a constância no tempo de mistura, a constância da potência por unidade de volume (P/V) e constância no número de Reynolds (N_{Re}) (Badino Jr e Schimidell, 2001). Pode-se concluir que foram levantados os parâmetros necessários para o estudo de aumento de escala do processo, podendo ser futuramente avaliado o melhor critério para a hidrólise em escala piloto.

6.6 - Nanocelulose produzida em biorreator

Após o processo de hidrólise enzimática realizado em biorreator convencional do tipo tanque agitado, o material sólido foi caracterizado quanto à presença de nanocelulose e alteração no índice de cristalinidade. As imagens de microscopia obtidas para cada condição são apresentadas na Figura 42.

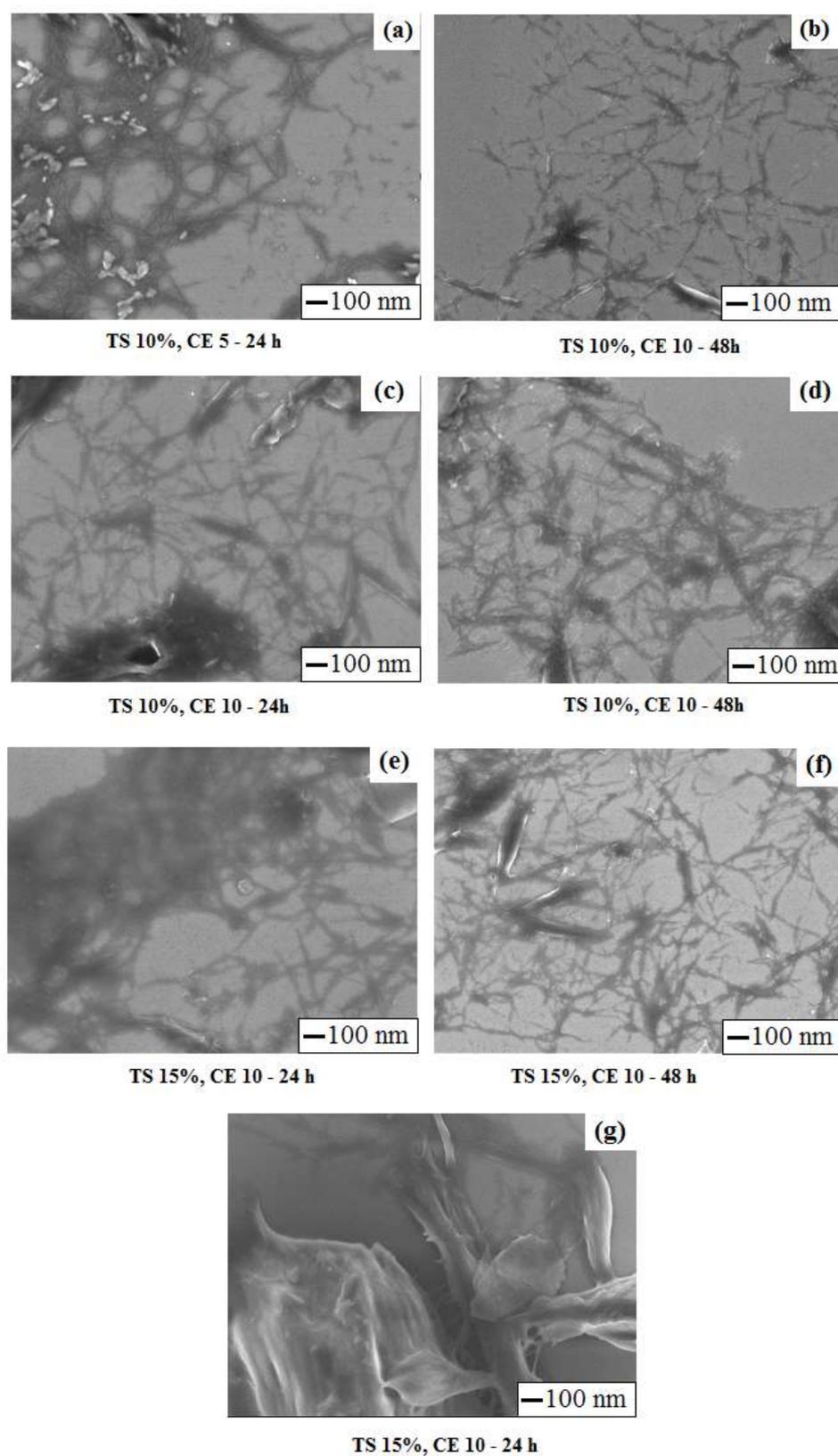


Figura 42 - MEV-FEG da nanocelulose obtida em biorreator: (a) TS 10%, CE 5 – 24h; (b) TS 10%, CE 5 – 48 h; (c) TS 10%, CE 10 – 24h; (d) TS 10%, CE 10 – 48h; (e) TS 15%, CE 10 – 24h; (f) TS 15%, CE 10 – 48h; (g) TS 15%, CE 10 – 24h.

Para todas as condições estudadas foram constatadas a presença de nanocelulose no material. É possível verificar na Figura 42 (a) que para a condição TS 10%, CE 5 mg/g de celulose há nanofibras, porém ainda é possível visualizar a presença de microfibras não degradadas pela ação das celulases. Apesar disso, observou-se que a predominância no material é de nanocelulose. Prosseguindo na reação de hidrólise, em 48 h observa-se a presença de nanofibras, porém com a diminuição das microfibras (Figura 42 b).

Na condição de TS 10%, CE 10 mg/g de celulose em 24h (Figura 42 c), o mesmo comportamento que a condição anteriormente apresentada foi verificado, porém a presença de nanofibras predominou em relação às microfibras residuais. No entanto, quando se avaliou a condição de TS 15%, CE 10 mg/g de celulose nas primeiras 24h de reação (Figura 42 e), observou-se a predominância de microfibras em relação à quantidade de nanofibras, mostrando que o alto teor de sólidos da reação dificultou o processo de fibrilação e transformação de microfibras em nanofibras. Na Figura 42 (g) é apresentada a mesma condição de 24 h, em que é possível verificar este processo de desagregação das nanoestruturas, representado por estruturas mais finas entre as microfibras. Por fim, em 48h é possível verificar a presença de nanocelulose em maior quantidade em relação às estruturas não degradadas, já que nesta condição a conversão chegou a 70%, resultando predominantemente em estruturas nanocelulósicas (Figura 42f).

Pela técnica microscópica realizada não é possível verificar a presença de NCC devido o alcance permitido pelo microscópio, sendo necessária a realização de microscopia eletrônica de transmissão para visualizar a presença destas estruturas. A caracterização quanto ao índice de cristalinidade foi realizada para as condições apresentadas nas microscopias e são mostradas na Tabela 16.

Tabela 16 - Índice de Cristalinidade para nanocelulose produzida em biorreator

Tempo (h)	IC (%)		
	TS 10, CE 5	TS 10, CE 10	TS 15, CE 10
0	72,0	72,0	72,0
24	81,0	81,4	81,9
48	81,7	82,5	82,9

A nanocelulose obtida em biorreator apresentou aumento no índice de cristalinidade no decorrer da hidrólise enzimática para todas as condições avaliadas, tendo aumentado de 72% para valores próximos de 83% (Tabela 16).

Observa-se pelos valores de índice de cristalinidade que apesar do cisalhamento causado pela presença dos impelidores, a agitação associada à atuação enzimática não degradou a celulose cristalina, favorecendo o processo de obtenção de nanocelulose. Os resultados aqui apresentados seguiram o mesmo perfil das nanoceluloses obtidas em frascos agitados, apresentadas nos tópicos 5.9.1 e 5.9.3. Para a produção de nanocelulose integrada à obtenção de glicose em biorreator não foram encontrados trabalhos na literatura para comparação, mostrando a inovação e a contribuição deste trabalho.

A caracterização do material obtido nos experimentos realizados em biorreator quanto à presença de NC e o aumento do índice de cristalinidade revelaram que o processo de obtenção das NCs associado à produção de glicose para a obtenção de etanol 2G mostrou-se viável nessa escala maior (5L). Além disso, este bioprocessos mostrou ser viável a implementação do conceito de biorrefinaria florestal.

Os dados obtidos nos experimentos em biorreator permitirão estudar o escalonamento desta integração de processos, que poderá contribuir para produção de nanocelulose e etanol 2G, diversificando os produtos da indústria de papel e celulose.

7 – CONCLUSÕES

A caracterização química da polpa de celulose de eucalipto branqueada revelaram altas concentrações de celulose (75,6%) e baixas concentrações de constituintes hemicelulose (14,6%) e lignina (6,7%), mostrando-se como um material modelo adequado para obtenção de nanocelulose e etanol.

Os estudos realizados mostraram o potencial da polpa de celulose para produção de etanol, já que quando hidrolisada em alto teor de sólidos levaram a altas concentrações de glicose. A realização do planejamento experimental em frascos agitados, com auxílio da função *desirability*, permitiu à escolha da condição de teor de sólidos 20% e carga enzimática 10 mg/g de celulose, condição de favorecimento do processo de obtenção de nanocristais de celulose integrada a obtenção de glicose para a produção de etanol 2G, com alto teor de sólidos e menor carga enzimática.

Estudos de índice cristalinidade do material residual de cada condição de hidrólise estudadas no planejamento experimental comprovaram a remoção de celulose amorfa e consequente aumento da cristalinidade do material, variando de 72% a 83%, que quando acoplados à análise morfológica revelaram a presença de nanofibras de celulose.

A obtenção de nanocristais de celulose foi realizada com sucesso em frascos agitados pelas condições de validação de TS 20 %, CE 10 mg/g de celulose do modelo proposto pelo planejamento experimental em temperatura de 35°C em tempos 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h. A hidrólise enzimática na obtenção de estruturas nanométricas forneceu um processo ambientalmente favorável devido à redução de resíduos ácidos e apresentou material com características comparáveis e em alguns aspectos superiores a processos de obtenção por métodos químicos. As estruturas obtidas apresentaram formato alongado e fino, com aspecto de L/D considerável e com boa estabilidade térmica, condições estas importantes para aplicação de reforço em materiais poliméricos. Por fim, para os experimentos realizados em frascos agitados, a fermentação alcoólica de uma condição de hidrólise (TS 20%, CE 10 em 72h) foi realizada partindo de 134 g/L, resultando em 62% de rendimento após 8h, em que pode-se concluir que o resultado foi um processo com alta fermentabilidade dos açúcares obtidos.

A realização de experimentos de hidrólise enzimática da polpa de celulose em biorreator permitiram a produção de nanocelulose associada à produção de açúcares fermentescíveis para produção de etanol 2G. Diferentes condições avaliadas (TS 10%, CE 5; TS 10%, CE 10 e TS 15%, CE 10) revelaram a produção de nanocelulose para todas as

condições, com índice de cristalinidade entre 80 e 82%, revelando a presença de nanocelulose cristalina. As análises de glicose e conversão de celulose mostraram que foi possível a obtenção de concentrações de glicose entre 30 e 90 g/L e conversão entre 40 e 70% ao final de 48 h de reação para diferentes condições avaliadas. Os experimentos de reologia para as condições estudadas permitiram observar o comportamento do fluido, sendo de característica pseudoplástica e que após 6 h de reação encontravam-se em escoamento turbulento. Nas condições trabalhadas, o consumo de energia foi de 197,47 W.h para a condição de TS 10%, CE 5, 167,88 W.h para TS 10%, CE 10 e 206,93 W.h para TS 15%, CE 10. O consumo de potência do processo, bem como os demais parâmetros determinados permitirá futuramente o avaliar as condições necessárias para aumento de escala do processo.

Por fim, conclui-se que a integração do processo de obtenção de nanocelulose e etanol de 2G mostrou-se promissora, podendo contribuir para a implementação das biorrefinarias florestais e diversificação do setor de papel e celulose, permitindo a realização de processos adequados a química verde, importantes para a manutenção do planeta nos próximos anos.

8 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Como sugestão de continuação deste propõe-se:

- (a) Estudo de diferentes enzimas na produção de nanocelulose;
- (b) Estudo de diferentes biomassas para integração dos processos de obtenção de etanol e nanocelulose;
- (c) Integração de métodos mecânicos e enzimáticos para obtenção de nanocelulose;
- (d) Estudo de diferentes impelidores e condições em biorreator visando melhorar a produção de nanofibras e também buscando a obtenção de nanocristais de celulose pela utilização de diferentes enzimas;
- (e) Estratégias para redução do consumo de potência da hidrólise em biorreator;
- (f) Aplicação da nanocelulose obtida em matrizes poliméricas;
- (g) Obtenção de diferentes produtos a partir da glicose obtida pelo processo de hidrólise enzimática.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHOLA, S. et al. Enzymatic Hydrolysis of Native Cellulose Nanofibrils and Other Cellulose Model Films: Effect of Surface Structure. **Langmuir**, v. 24, n. 20, p. 11592-11599, 2008.

ANGLES, M. N.; DUFRESNE, A. Plasticized starch/tunicin whiskers nanocomposite materials. 2. Mechanical behavior. **Macromolecules**, v. 34, n. 9, p. 2921-2931, 2001.

ASCANIO, G.; CASTRO, B.; GALINDO, E. Measurement of power consumption in stirred vessels - A review. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 82, n. A9, p. 1282-1290, 2004.

ASENJO, J. A.; MERCHUCK, J. C. **Bioreactor System Design**. New York: 1995.

AZEREDO, H. M. C. D. Nanocomposites for food packaging applications. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1240-1253, 2009.

BADINO, A. C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Power Input and Oxygen Transfer in Fed-Batch Penicillin Production Process. **Advances in Bioprocess Engineering**, p. 157-162, 1994

BADINO JR, A. C.; SCHIMIDELL, W. Variação de escala. In: (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, v.2, 2001. cap. 15, (Engenharia Bioquímica).

BARNETT, J. R.; BONHAM, V. A. Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres. **Biological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 461-472, 2004.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 2a. Campinas, SP, 2001.

BECK-CANDANEDO, S.; ROMAN, M.; GRAY, D. G. Effect of reaction conditions on the properties and behavior of wood cellulose nanocrystal suspensions. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 1048-1054, 2005.

BELLUZO, L. G.; FRISCHTAK, C. R.; LAPLANE, M. **Produção de commodities e desenvolvimento econômico**. Campinas, Unicamp. Instituto de Economia 2014.

BONDESON, D.; MATHEW, A.; OKSMAN, K. Optimization of the isolation of nanocrystals from microcrystalline cellulose by acid hydrolysis. **Cellulose**, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2006.

BOUSSAID, A.; SADDLER, J. N. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 138-143, 1999.

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2010). Setor de celulose e papel. Disponível em www.bracelpa.org.br. Acessado em: 25 de julho de 2014

BRACELPA – Associação Brasileira de Celulose e Papel. (2014). Dados do setor. Disponível em <http://bracelpa.org.br/bra2/sites/default/files/estatisticas/booklet.pdf>. Acessado em 05/10/2015.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRAGATTO, J. **Avaliação do potencial da casca de Eucalyptus spp. para a produção de bioetanol**. 2010. 154 (Doutorado). ESALQ - USP, Universidade de São Paulo

BREWSTER, M. E. et al. The use of polymer-based electrospun nanofibers containing amorphous drug dispersions for the delivery of poorly water-soluble pharmaceuticals. **Pharmazie**, v. 59, n. 5, p. 387-391, 2004.

BUSTAMANTE, M. C. C. **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante**. 2013. 228 (Doutorado). Departamento de Engenharia Química, Ufscar, São Carlos, Sp.

BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92-100, 2013.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statística**. Rio de Janeiro: 2003. 260.

CALDAS PEREIRA, L. T. et al. Sugarcane bagasse enzymatic hydrolysis: rheological data as criteria for impeller selection. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 901-907, Aug 2011. ISSN 1367-5435.

CALLISTER JR., W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução**. 7a. Rio de Janeiro: 1940.

CAMPOS, A. et al. Obtaining nanofibers from curaua and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1491-1500, 2013.

CAMPOS, A. et al. Properties of thermoplastic starch and TPS/polycaprolactone blend reinforced with sisal whiskers using extrusion processing. **Polymer Engineering and Science**, v. 53, n. 4, p. 800-808, 2013.

- CAMPOS, A. D. et al. Obtaining nanofibers from curaua and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication. **Cellulose**, v. 20, n. 3, p. 1491-1500, 2013.
- CANNELLA, D.; JORGENSEN, H. Do New Cellulolytic Enzyme Preparations Affect the Industrial Strategies for High Solids Lignocellulosic Ethanol Production? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 59-68, 2014.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- CASTRO, A. M. D.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHUN, S.-J. et al. Eco-friendly cellulose nanofiber paper-derived separator membranes featuring tunable nanoporous network channels for lithium-ion batteries. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 32, p. 16618-16626, 2012.
- COLLIGNON, M.-L. et al. Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors: Methodology based on the impeller comparison at just-suspended speed of rotation. **Chemical Engineering Science**, v. 65, n. 22, p. 5929-5941, 2010.
- CORRADINI, E. et al. Thermal stability and degradation kinetic study of white and colored cotton fibers by thermogravimetric analysis. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 97, n. 2, p. 415-419, 2009.
- CORREA, A. C. et al. Cellulose nanofibers from curaua fibers. **Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 1183-1192, 2010.
- CÔRREA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess Biosystems Engineering**, 39: 285-294 p. 2016.
- DAI, D.; FAN, M. Investigation of the dislocation of natural fibres by Fourier-transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, n. 2, p. 300-306, 2011.
- DE CARVALHO, D. M. et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118-126, 2015.
- DEEPA, B. et al. Utilization of various lignocellulosic biomass for the production of nanocellulose: a comparative study. **Cellulose**, v. 22, n. 2, p. 1075-1090, 2015.
- DELABONA, P. D. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass & Bioenergy**, v. 37, p. 243-250, 2012.

DU, J. et al. Enzymatic liquefaction and saccharification of pretreated corn stover at high-solids concentrations in a horizontal rotating bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 2, p. 173-181, 2014.

DUFRESNE, A. **Nanocellulose: From Nature to High Performance Tailored Materials**. Walter de Gruyter. Berlin: 2012. 460.

DUGAN, J. M.; GOUGH, J. E.; EICHHORN, S. J. Directing the Morphology and Differentiation of Skeletal Muscle Cells Using Oriented Cellulose Nanowhiskers. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 9, p. 2498-2504, 2010.

DURAN, N. et al. A minireview of cellulose nanocrystals and its potential integration as co-product in bioethanol production. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 56, n. 2, p. 672-677, 2011.

DURAN, N.; LEMES, A. P.; SEABRA, A. B. Review of Cellulose Nanocrystals Patents: Preparation, Composites and General Applications. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 16-28, 2012.

EICHHORN, S. J. Cellulose nanowhiskers: promising materials for advanced applications. **Soft Matter**, v. 7, n. 2, p. 303-315, 2011.

FILSON, P. B.; DAWSON-ANDOH, B. E.; SCHWEGLER-BERRY, D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. **Green Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1808-1814, 2009.

FOELKEL, C. E. B. **As fibras de Eucalipto e as qualidades requeridas na celulose Kraft para a fabricação de papel**. Eucalyptus Online Book & Newsletter: 48 p. 2007.

FOUCAULT, S.; ASCANIO, G.; TANGUY, P. A. Mixing times in coaxial mixers with Newtonian and non-Newtonian fluids. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45, n. 1, p. 352-359, 2006.

FRATZL, P.; WEINKAMER, R. Nature's hierarchical materials. **Progress in Materials Science**, v. 52, n. 8, p. 1263-1334, 2007.

FREDERICK, W. J., JR. et al. Co-production of ethanol and cellulose fiber from Southern Pine: A technical and economic assessment. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, n. 12, p. 1293-1302, 2008.

GANDINI, A.; BELGACEM, M. N. The State of the Art. In: ELSERVIER: OXFORD, U. (Ed.). **Monomers Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1a, 2008. p.401-418.

GATENHOLM, P.; KLEMM, D. Bacterial Nanocellulose as a Renewable Material for Biomedical Applications. **Mrs Bulletin**, v. 35, n. 3, p. 208-213, 2010.

GEORGE, J. et al. Bacterial cellulose nanocrystals exhibiting high thermal stability and their polymer nanocomposites. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 50-57, 2011.

- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.
- GOUVEIA, E. R. et al. Validation of methodology for the chemical characterization of sugarcane bagasse. **Quimica Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.
- GUPTA, A.; VERMA, J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 550-567, 2015.
- HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 6, p. 3479-3500, 2010.
- HALL, M. et al. Cellulose crystallinity - a key predictor of the enzymatic hydrolysis rate. **Febs Journal**, v. 277, n. 6, p. 1571-1582, 2010.
- HEMRAJANI, R. R.; TATTERSON, G. B. Mechanically Stirred Vessels. In: PAUL, E. L.; ATIEMO-OBENG, V. A., et al (Ed.). **Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice**. New York: Wiley Interscience, 2004. cap. 6, p.345-389.
- HENRIKSSON, M. et al. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 8, p. 3434-3441, 2007.
- HOHMANN, S. Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Febs Letters**, v. 583, n. 24, p. 4025-4029, 2009.
- HON, D. N. S. CELLULOSE - A RANDOM-WALK ALONG ITS HISTORICAL PATH. **Cellulose**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 1994.
- HORN, S. J. et al. Novel enzymes for the degradation of cellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, 2012.
- HSIEH, C.-W. C. et al. Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3800-3805, 2014.
- HU, J.; ARANTES, V.; SADDLER, J. N. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 36, 2011.
- HUBBE, M. A. et al. Cellulosic nanocomposites: a review. **Bioresources**, v. 3, p. 929-980, 2008.
- HYTOENEN, E.; STUART, P. R. Integrating Bioethanol Production into an Integrated Kraft Pulp and Paper Mill: Techno-Economic Assessment. **Pulp & Paper-Canada**, v. 110, n. 5, p. 25-32, 2009.
- IBA. **Exportações de celulose, painéis de madeira e papel têm alta no primeiro semestre de 2015**. Indústrias brasileiras de árvores. <http://www.iba.org/pt/9-conteudo->

[pt/579-exportacoes-de-celulose-paineis-de-madeira-e-papel-tem-alta-no-primeiro-semester-de-2015](#). 2015

JORGENSEN, H. Effect of Nutrients on Fermentation of Pretreated Wheat Straw at very High Dry Matter Content by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, n. 1-2, p. 44-57, 2009.

JORGENSEN, H.; KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 1, n. 2, p. 119-134, 2007.

JORGENSEN, H. et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 5, p. 862-870, 2007.

KADIC, A.; PALMQVIST, B.; LIDEN, G. Effects of agitation on particle-size distribution and enzymatic hydrolysis of pretreated spruce and giant reed. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, 2014.

KIM, M. H. et al. Surface Deactivation of Cellulase and its Prevention. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 2, p. 99-103, 1982 1982.

KIM, Y. et al. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreated distillers' grains at high-solids loadings. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 12, p. 5206-5215, 2008.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005 2005.

KLEMM, D. et al. Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 50, n. 24, p. 5438-5466, 2011.

KO, J. K. et al. Adsorption of Enzyme Onto Lignins of Liquid Hot Water Pretreated Hardwoods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 447-456, 2015.

KOPPRAM, R. et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 46-53, 2014.

KRISTENSEN, J. B.; FELBY, C.; JORGENSEN, H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, 2009.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LADISCH, M. R. et al. Process considerations in the enzymatic-hydrolysis of biomass. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 2, p. 82-102, 1983 1983.

LARSEN, J. et al. The IBUS process - Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 5, p. 765-772, 2008.

- LAVOINE, N. et al. Microfibrillated cellulose - Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 2, p. 735-764, 2012.
- LE NORMAND, M.; MORIANA, R.; EK, M. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from spruce bark in a biorefinery perspective. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 979-987, 2014.
- LI, J. et al. A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, 2013.
- LIMA, M. M. D.; BORSALI, R. Rodlike cellulose microcrystals: Structure, properties, and applications. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 25, n. 7, p. 771-787, 2004.
- LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, v. 59, p. 302-325, 2014.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, 2002.
- MA, H. et al. Ultrafine Polysaccharide Nanofibrous Membranes for Water Purification. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 4, p. 970-976, 2011.
- MACHADO, A. T.; ZANGIROLAMI, T. C.; ADRIANO, W. S. **Obtenção de etanol a partir de derivados do processamento do eucalipto para produção de celulose por sacarificação e fermentação simultâneas.** VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Minas Gerais 2009.
- MACHADO, D. L. et al. Adsorption characteristics of cellulose and B-gucosidase on Avicel, pretreated sugarcane bagasse, and lignin. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1-9, 2015.
- MAGER, W. H.; SIDERIUS, M. Novel insights into the osmotic stress response of yeast. **Fems Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 251-257, 2002. ISSN 1567-1356.
- MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 804-816, 1999.
- MARIANO, A. P. How Brazilian Pulp Mills will look in the future? **O Papel**: Technical article. 76 n. 6: 51-66 p. 2015.
- MARTIN, I.; WENDT, D.; HEBERER, M. The role of bioreactors in tissue engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 80-86, 2004.
- MATHEW, A. P. et al. Process scale up and characterization of wood cellulose nanocrystals hydrolysed using bioethanol pilot plant. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 212-219, 2014.

MATTOSO, L. H. C. et al. Electrically Conductive Nanocomposites Made from Cellulose Nanofibrils and Polyaniline. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 9, n. 5, p. 2917-2922, 2009.

MC CABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOUT, P. **Unit Operations of Chemical Engineering**. 7a. New York: 2005.

MESQUITA, J. P. **Nanocristais de celulose para aplicação de bionanocompósitos com quitosana e carbonos nanoestruturados para aplicação tecnológicas e ambientais**. 2012. 165 Departamento de Química, UFMG, Belo Horizonte, MG.

MEYABADI, T. F.; DADASHIAN, F. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Waste Cotton Fibers for Nanoparticles Production Using Response Surface Methodology. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 3, p. 313-321, 2012.

MILANEZ, A. Y. et al. **De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar –uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública**: BNDES Setorial. 41: 237-294 p. 2015.

MIRRO, R.; VOLL, K. Wich Impeller is right for your cell line? [A guide to impeller selection for Stirred-Tank bioreactors](#). *BioProcess International*. 7 (1): 52 - 57 p. 2009.

MISSOUM, K.; BELGACEM, M. N.; BRAS, J. Nanofibrillated Cellulose Surface Modification: A Review. **Materials**, v. 6, n. 5, p. 1745-1766, 2013.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. **Biomass & Bioenergy**, v. 56, p. 526-544, 2013.

MORAES DE MOURA, A.; FOELKEL, C. E. B.; FRIZZO, S. M. B. Characterization of the reduced sulphur compounds generated in kraft and pre-hydrolysis kraft pulping. **Ciencia Florestal**, v. 12, n. 1, p. 49-58, 2002.

MOURA, A. L.; GARCIA, C. H. **A cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade brasileira de Silvicultura 2000.

NAGY, Z. K. et al. High speed electrospinning for scaled-up production of amorphous solid dispersion of itraconazole. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 480, n. 1-2, p. 137-142, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de bioquímica**. 3a. São Paulo: 2002.

NG, H.-M. et al. Extraction of cellulose nanocrystals from plant sources for application as reinforcing agent in polymers. **Composites Part B-Engineering**, v. 75, p. 176-200, 2015.

NYKO, D. **Avaliação do potencial competitivo do E2G no Brasil - O panorama brasileiro e mundial**. BNDES., D. D. B. 2015.

- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.
- OH, S. Y. et al. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 15, p. 2376-2391, 2005.
- OKSMAN, K. et al. Cellulose nanowhiskers separated from a bio-residue from wood bioethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 146-152, 2011.
- OKSMAN, K. et al. Manufacturing process of cellulose whiskers/polylactic acid nanocomposites. **Composites Science and Technology**, v. 66, n. 15, p. 2776-2784.
- ORTEGA, N.; BUSTO, M. D.; PEREZ-MATEOS, M. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, n. 1, p. 7-14, 2001.
- ORTIZ-MUNIZ, B. et al. Kinetic study on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 yeast isolated from sugar cane molasses. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 10, p. 1361-1367, 2010.
- PAAKKO, M. et al. Enzymatic hydrolysis combined with mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1934-1941, 2007.
- PALMQVIST, B.; WIMAN, M.; LIDEN, G. Effect of mixing on enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce: a quantitative analysis of conversion and power consumption. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, 2011.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.
- PALONEN, H. et al. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. **Journal of Biotechnology**, v. 107, n. 1, p. 65-72, 2004.
- PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ: Series on Biotechnology. 2: 45 p. 2008.
- PETERSEN, N.; GATENHOLM, P. Bacterial cellulose-based materials and medical devices: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1277-1286, 2011.
- PIROTA, R. D. P. B.; BALEEIRO, F. C. F.; FARINAS, C. S. Saccharification of Biomass Using Whole Solid-State Fermentation Medium to Avoid Additional Separation Steps. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 6, p. 1430-1440, 2013.

PURI, V. P. Effect of crystallinity and degree of polymerization of cellulose on enzymatic saccharification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 10, p. 1219-1222, 1984.

RAFIONE, T. et al. The Green Integrated Forest Biorefinery: An innovative concept for the pulp and paper mills. **Applied Thermal Engineering**, v. 73, n. 1, p. 74-81, 2014.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. Campinas, SP: 2009.

ROMAN, M.; WINTER, W. T. Effect of sulfate groups from sulfuric acid hydrolysis on the thermal degradation behavior of bacterial cellulose. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1671-1677, 2004.

ROWELL, R. M.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S. Characterization and factors affecting fiber properties. In: FROLLINI, E.; LEÃO, A., *et al* (Ed.). **Natural Polymers and Agrogibers based Composites**. São Carlos, Sp, 2000. p.292 p.

SAMANIUK, J. R. et al. The effect of high intensity mixing on the enzymatic hydrolysis of concentrated cellulose fiber suspensions. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 6, p. 4489-4494, 2011.

SAMIR, M.; ALLOIN, F.; DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 612-626, 2005.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANCHEZ PEREZ, J. A. et al. Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, n. 1-3, p. 1-5, Nov 1 2006

SATYAMURTHY, P. et al. Preparation and characterization of cellulose nanowhiskers from cotton fibres by controlled microbial hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 1, p. 122-129, 2011.

SEGAL, L, CREELY, J.J., MARTIN, A.E., CONRAD, C.M An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-Ray diffractometer. **Text Res J** 29(10):786–794, 1959.

SCHIMIDELL, W.; FACCIOTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, v.2, 2001. cap. 8, (Engenharia Bioquímica).

SCHMIDELL, W. Agitação e Aeração de Biorreatores. In: (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. Edgard Blücher Ltda. São Paulo, v.2, 2001. cap. 14, (Engenharia Bioquímica).

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering**. Second Edition. New Jersey: 2002. 553.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação de Compostos Orgânicos**. 3a. Guanabara, 1979. 81-109.

SIQUEIRA, G.; BRAS, J.; DUFRESNE, A. Cellulose Whiskers versus Microfibrils: Influence of the Nature of the Nanoparticle and its Surface Functionalization on the Thermal and Mechanical Properties of Nanocomposites. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 2, p. 425-432, 2009.

SIQUEIRA, G. et al. Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers. **Cellulose**, v. 17, n. 6, p. 1147-1158.

SIQUEIRA, L. **Maior usina de etanol 2G será construída na china**. Novacana 2014. Disponível em <<http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/china-maior-usina-etanol-2g-mundo-310714/>> Acesso em: 10/09/2015.

SIQUEIRA, L. **Novas usinas de etanol começam a operar, mas etanol celulósico vive momento delicado**. Nova cana 2015a. Disponível em:<<http://www.novacana.com/n/etanol/2-geracao-celulose/usinas-operar-etanol-celulosico-momento-delicado-290115/>>

SIQUEIRA, G. A. **Efeito da lignina de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratados na hidrólise enzimática da celulose**. 2015b. (Doutorado). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

SLUITER, A. et al. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Laboratory Analytical Procedure (LAP): NREL/TP-510-42628: 13 p. 2011.

SONEGO, J. L. S. et al. Extractive Batch Fermentation with CO₂ Stripping for Ethanol Production in a Bubble Column Bioreactor: Experimental and Modeling. **Energy & Fuels**, v. 28, n. 12, p. 7552-7559, 2014.

SONG, Q. et al. Nanofibrillated Cellulose (NFC): A High-Value Co-Product that Improves the Economics of Cellulosic Ethanol Production. **Energies**, v. 7, n. 2, p. 607-618, 2014.

SPIRIDON, I.; POPA, V. I. Hemicelluloses: major sources, properties and applications. In: ELSERVIER:OXFORD, U. (Ed.). **Monomers Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1a, 2008. p.401-418.

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

- SZOPLIK, J.; KAR CZ, J. Mixing time of a non-Newtonian liquid in an unbaffled agitated vessel with an eccentric propeller. **Chemical Papers**, v. 62, n. 1, p. 70-77, 2008.
- TAN, R.-K.; EBERHARD, W.; BUECHS, J. Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. **Chemical Engineering Science**, v. 66, n. 3, p. 440-447, 2011.
- TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 160-167, 1997.
- TEIXEIRA, E. D. M. et al. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 63-66, 2011.
- TEIXEIRA, E. D.M et al. Cellulose nanofibers from white and naturally colored cotton fibers. **Cellulose**, v. 17, n. 3, p. 595-606, 2010.
- TEIXEIRA, E. D.M et al. Starch/fiber/poly(lactic acid) foam and compressed foam composites. **Rsc Advances**, v. 4, n. 13, p. 6616-6623, 2014.
- TEIXEIRA, R. S. S. et al. Combining biomass wet disk milling and endoglucanase/beta-glucosidase hydrolysis for the production of cellulose nanocrystals. **Carbohydrate Polymers**, v. 128, p. 75-81, 2015.
- TENGBORG, C.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 1, p. 110-117, Jan-Feb 2001.
- TEODORO, K. B. R. et al. Whiskers from Sisal Fibers Obtained under Different Acid Hydrolysis Conditions: Effect of Time and Temperature of Extraction. **Polimeros-Ciencia E Tecnologia**, v. 21, n. 4, p. 280-285, 2011.
- TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: Spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.
- TIBOLLA, H.; PELISSARI, F. M.; MENEGALLI, F. C. Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1311-1318, 2014.
- TONOLI, G. H. D. et al. Cellulose micro/nanofibres from Eucalyptus kraft pulp: Preparation and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 80-88, 2012.
- TSUKAMOTO, J.; DURAN, N.; TASIC, L. Nanocellulose and Bioethanol Production from Orange Waste using Isolated Microorganisms. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 9, p. 1537-1543, Sep 2013.
- UNICA. **União das Indústrias de Cana-de-açúcar**.<http://www.unica.com.br/namidia/4146132920322101782/novas-usinas-de-etanol-2g-no-brasil-vaocustar-r-porcento24-2-porcento2C5-bilhoes-ate-2024/2015>.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458-1480, 2012.

VAN HEININGEN, A. Converting a kraft pulp mill into an integrated forest biorefinery. **Pulp & Paper-Canada**, v. 107, n. 6, p. 38-43, 2006.

VAN SPEYBROECK, M. et al. Combined use of ordered mesoporous silica and precipitation inhibitors for improved oral absorption of the poorly soluble weak base itraconazole. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 3, p. 354-365, 2010.

WOEHL, M. A. et al. Bionanocomposites of thermoplastic starch reinforced with bacterial cellulose nanofibres: Effect of enzymatic treatment on mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 866-873, 2010.

WU, J. et al. Improved viscous slurry agitation for minerals processing. **Minerals Engineering**, v. 78, p. 21-31, 2015.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass - Technology, economics and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 3-16, 1994 1994.

XIMENES, E. et al. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p. 170-176, 2010.

YANG, H. et al. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. **Fuel**, v. 86, n. 12-13, p. 1781-1788, 2007.

ZHANG, X. et al. High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5890-5897, 2009.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 6, n. 4, p. 465-482, 2012.

ZHU, H. et al. Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping 'Elephant Ear' agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 87, n. 3A, p. 307-317, 2009.

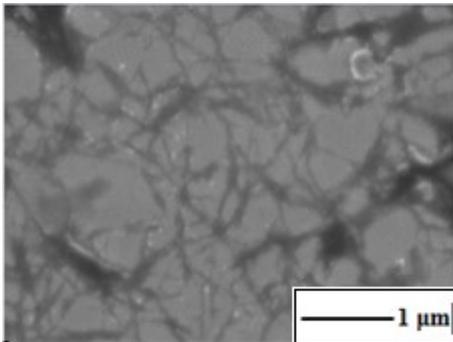
ZHU, J. Y.; SABO, R.; LUO, X. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. **Green Chemistry**, v. 13, n. 5, p. 1339-1344, 2011 2011.

Fontes de internet:

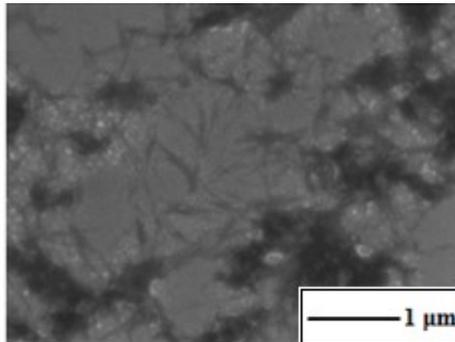
https://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor

10 – ANEXOS

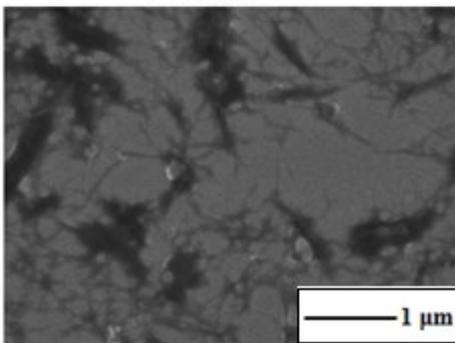
10.1 – Estruturas nanocelulósicas de todas as condições do planejamento experimental



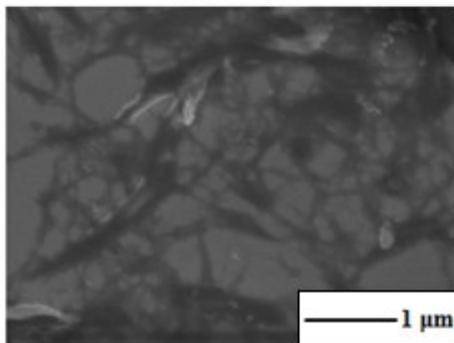
TS 10, CE 5



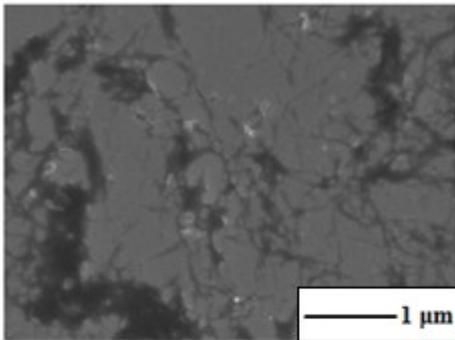
TS 10, CE 15



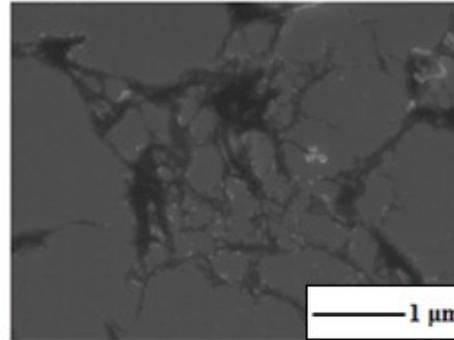
TS 20, CE 15



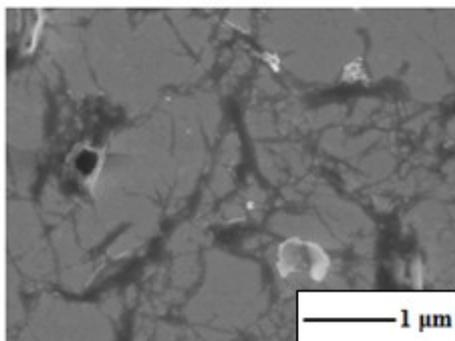
TS 20, CE 5



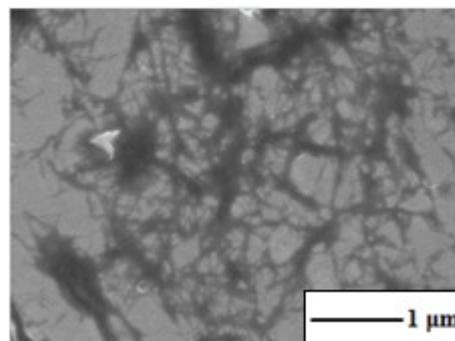
TS 15, CE 17



TS 15, CE 3

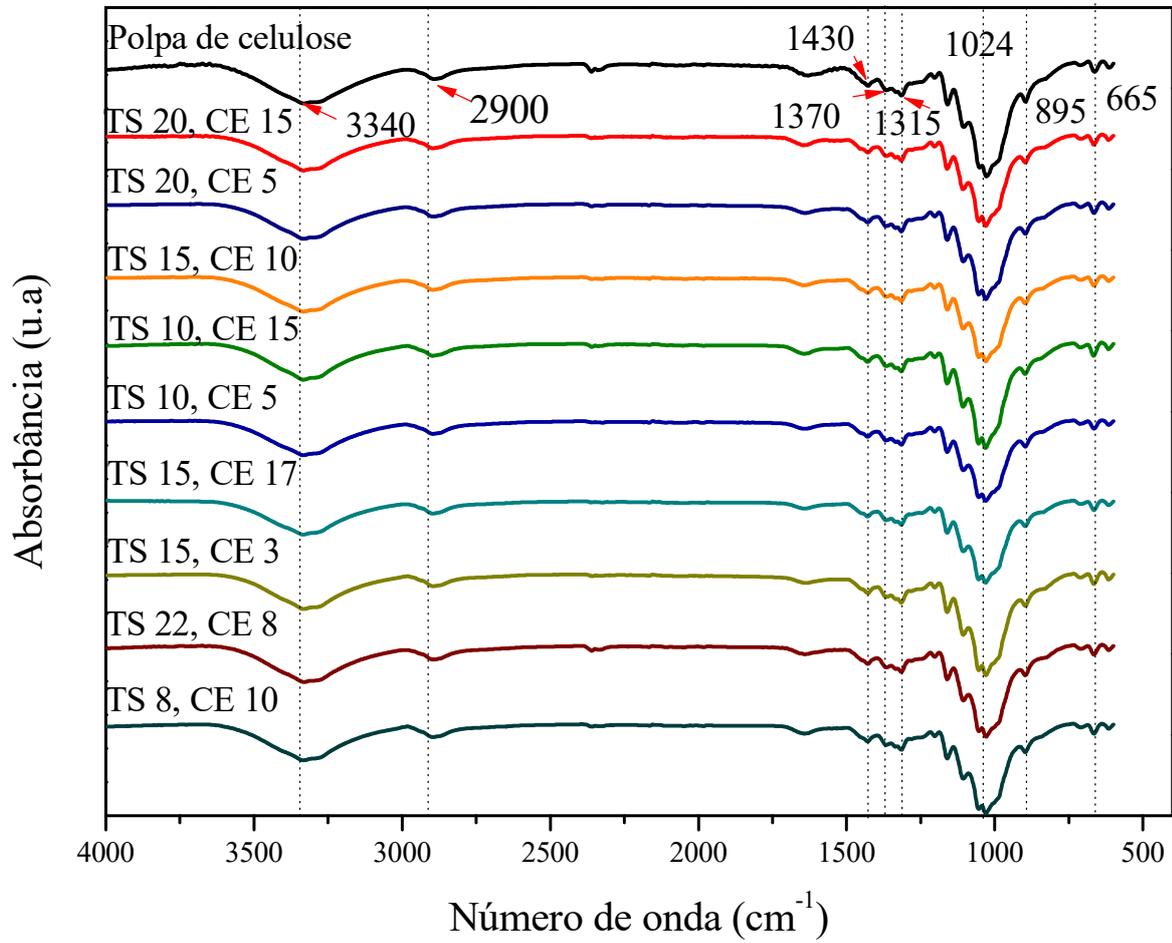


TS 22, CE 10

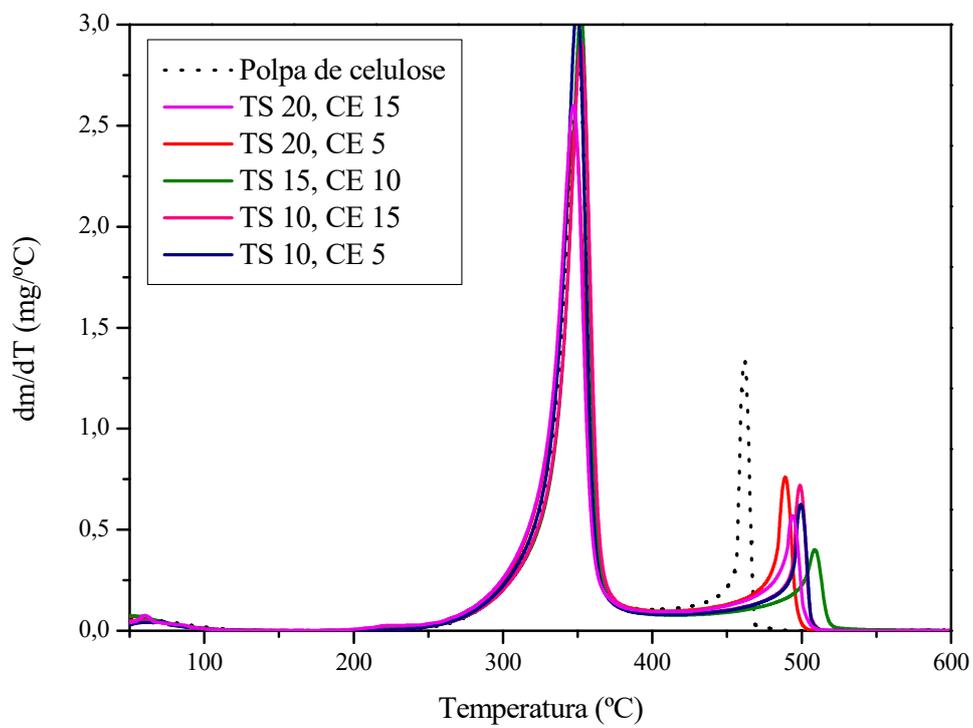
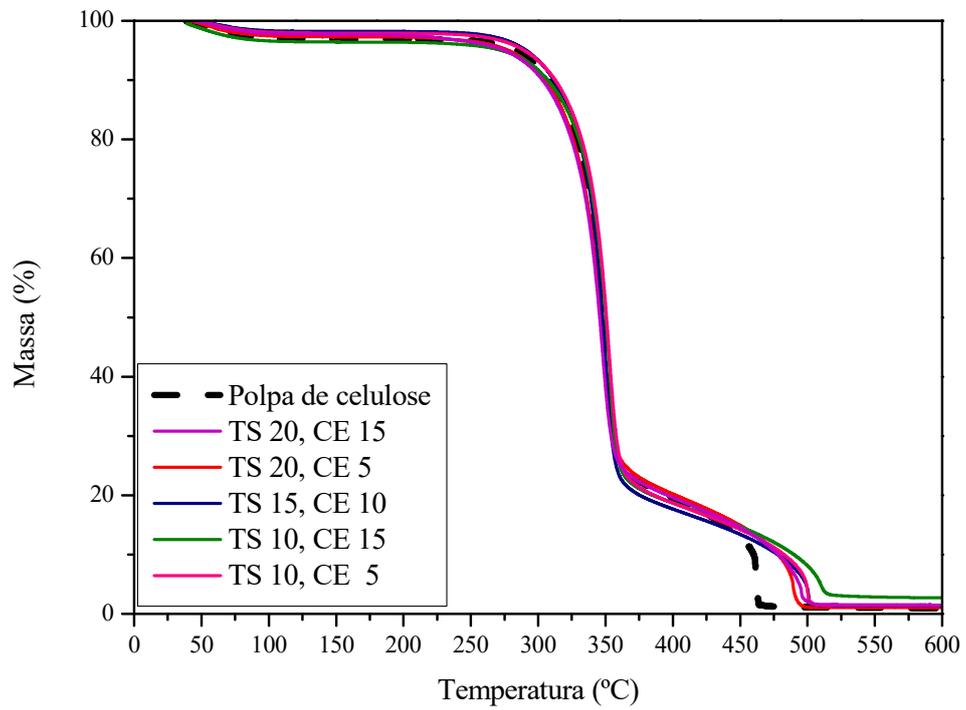


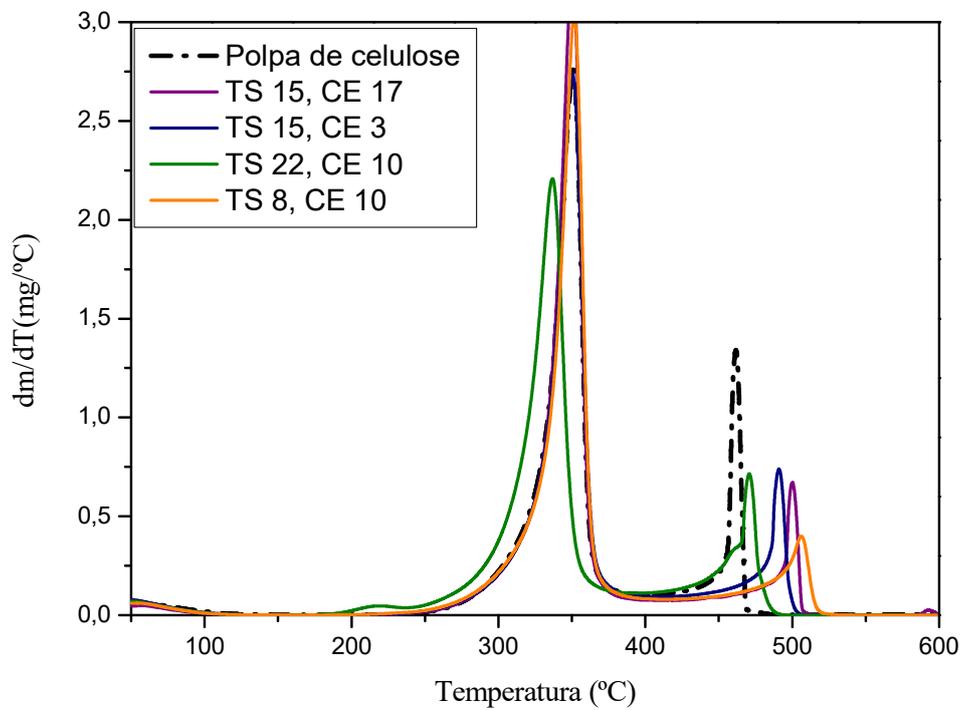
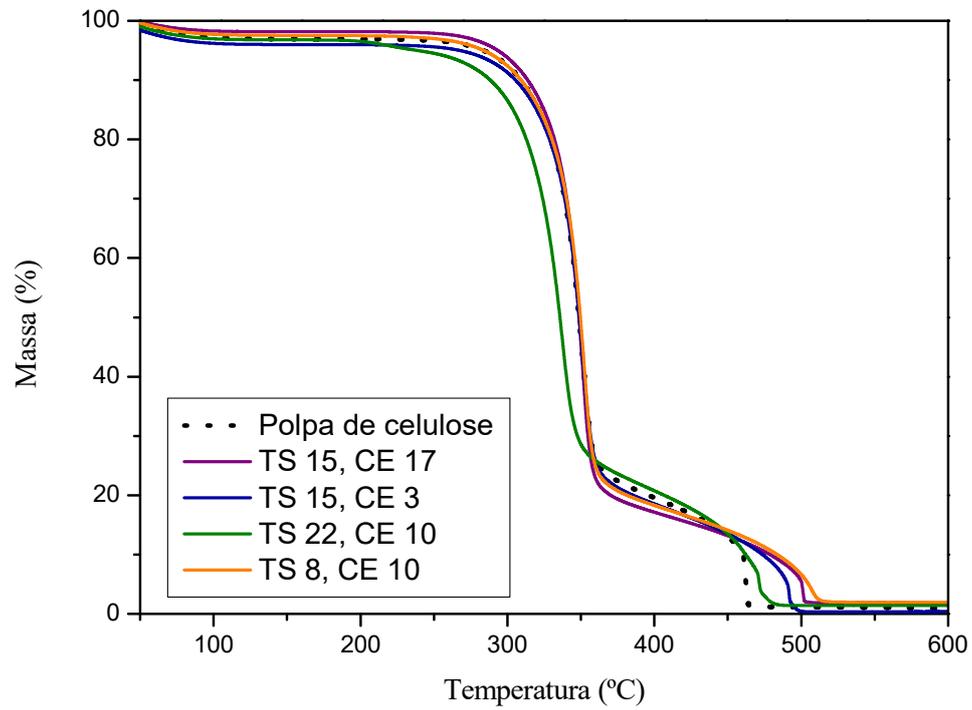
TS 8, CE 10

10.2 – Difractogramas de FTIR obtidos para todas as condições do planejamento experimental



10.3 – TG e DTG para diferentes condições do planejamento experimental





10.4 – Tabelas de início degradação térmica (Ti) para diferentes condições do planejamento calculadas pelas curvas de TG

Condição	Ti (°C)
TS 20, CE 15	323,0
TS 20, CE 5	322,9
TS 15, CE 10	329,2
TS 10, CE 15	332,1
TS 10, CE 5	331,0
TS 15, CE 17	331,1
TS 15, CE 3	328,7
TS 22, CE 10	310,1
TS 8, CE 10	331,2

Condição	Ti (°C)
TS 20, CE 10 – 24h	327,8
TS 20, CE 10 – 48h	331,6
TS 20, CE 10 – 72h	323,1
TS 20, CE 10 – 96h	325,6
TS 20, CE 10 – 120h	317,4
TS 20, CE 10 – 144h	324,6