Planejamento Experimental DCCR aplicando a Hidrólise Enzimática do bagaço de Laranja empregando as enzimas Celulases e Pectinases

Experimental Planning DCCR applying Orange Bagasse Enzymatic Hydrolysis using the enzymes Cellulases and Pectinases

DOI:10.34117/bjdv7n1-216

Recebimento dos originais: 15/12/2020
Aceitação para publicação: 10/01/2021

Júlia Maria Andrade Rosa
Graduação em Engenharia
UFES-Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço:Rua Vitório Albani, s/n, Guararema, Alegre/ES, CEP: 29500-000
E-mail:julia.m.rosa@hotmail.com

Iara Rebouças Pinheiro
Doutorado
UFES-Universidade Federal do Espírito Santo
Endereço:Alto Universitário, s/n, Guararema, Alegre/ES, CEP 29500-000
E-mail:iararp.ufes@gmail.com

RESUMO
A importância do pré-tratamento e hidrólise em resíduos lignocelulósicos, afim de encontrar processos adequados para modificar a estrutura da biomassa, para permitir que as enzimas convertem a celulose em glicose, em seguida, aplicar este hidrolisado na produção de etanol. Neste contexto, este trabalho tem como objetivo estudar as condições de hidrólise enzimática do bagaço de laranja. Os experimentos foram realizados utilizando os resíduos cítricos da indústria do processamento do suco de laranja, primeiramente foi feito a trituração e a secagem do material lignocelulósico, posteriormente realizou o pré-tratamento hidrotérmico foi feito caracterização dos resíduos. Em seguida, foi realizado a hidrólise enzimática com enzimas comerciais (Celluclast 1.5 L), para avaliar as melhores condições para se obter os açúcares fermentescíveis, pela análise de determinação de açúcares redutores totais (ART). O estudo foi realizado por meio do planejamento delineamento composto central rotacional (DCCR), analisando os fatores concentração de enzimas celulases (8 a 15 FPU/mL) e pectinases (4 a 10 U/mL) e o tempo (2 a 24 horas). Analisando os resultados, a caracterização dos resíduos industrializados in natura foi de 18,8% de celulose, 10,7% de hemicelulose, 3,14% de lignina e 15,1% de pectina, e a pós o pré-tretamento hidrotérmico 19,52% de celulose, 7,41% de hemicelulose, 1,33% de lignina. O fator mais significativo no planejamento experimental analisado foi o tempo, e a condição otimizada para concentração máxima de açúcares foi encontrada em 12,5 FPU/mL de celulase, 4,4 U/mL pectinase e 37,4 horas de hidrólise resultando em 21,06 g/L de ART.

Palavras-chave: Bagaço de laranja, Hidrólise enzimática, pré-tratamento hidrotérmico.

ABSTRACT
The importance of pre-treatment and hydrolysis in lignocellulosic residues, in order to find adequate processes to modify the biomass structure, to allow enzymes to convert cellulose into glucose, then apply this hydrolysate in ethanol production. In this context, this work aims to study the conditions of enzymatic hydrolysis of orange bagasse. The experiments were carried out using the citrus residues from the orange juice processing industry, first the lignocellulosic material was crushed and dried, then the hydrothermal pre-treatment was carried out and the residues were characterized. Then, the enzymatic hydrolysis with commercial enzymes (Celluclast 1.5 L) was performed to evaluate the best conditions to obtain fermentable sugars, by the total reducing sugars determination analysis (ART). The study was performed by means of the rotational central compound design (DCCR), analyzing the cellulase (8 to 15 FPU/mL) and pectinases (4 to 10 U/mL) enzyme concentration factors and the time (2 to 24 hours). Analyzing the results, the characterization of the industrialized residues in natura was 18.8% cellulose, 10.7% hemicellulose, 3.14% lignin and 15.1% pectin, and after the hydrothermal pre-treatment 19.52% cellulose, 7.41% hemicellulose, 1.33% lignin. The most significant factor in the experimental planning analyzed was time, and the optimized condition for maximum sugar concentration was found in 12.5 FPU/mL of cellulase, 4.4 U/mL pectinase and 37.4 hours of hydrolysis resulting in 21.06 g/L of ART.

Keywords: Orange bagasse, enzymatic hydrolysis, hydrothermal pre-treatment.

1INTRODUÇÃO

A busca por matérias-primas renováveis torna-se uma meta importante para produzir produtos químicos e combustíveis devido à crescente demanda de energia, e preocupações ambientais, juntamente com a diminuição das reservas de combustíveis fósseis. A biomassa lignocelulósica é uma alternativa promissora aos recursos fósseis (BUSIC *et al,* 2018; HOU *et al.,* 2017).

Nas indústrias cítricas, durante o processamento da laranja, apenas metade do peso da fruta fresca é transformado em suco, enquanto os outros 50% geram grandes quantidades de resíduos (casca, polpa e semente) (WILKINS *et al.,* 2007). A produção de laranja no Brasil na safra de 2019/2020 foi cerca de 15,6 milhões de toneladas de laranja (USDA,2020), grande parte dessa produção é destinada para as indústrias de processamento de suco. Isto significa que são descartados cerca de 8 milhões de toneladas de resíduos de laranja por ano.

A composição dos resíduos da laranja são ricos em açúcares fermentescíveis, como glicose, frutose e sacarose, junto com polissacarídeos celulósicos insolúveis (celulose, hemicelulose, lignina) e pectina. A baixa presença de lignina em comparação

com outras biomassas lignocelulósicas se torna vantajoso para formação de produtos à base de fermentação (produção de biotanol). Porém, a presença de pectina requer que as etapas de hidrólise e pré-tratamento sejam mais rigorosas, para a obtenção de açúcares, e por isso requer diversas pesquisas a fim de desenvolver métodos eficazes para produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos (GROHMANN *et al.*, 1995).

O pré-tratamento tem a finalidade de reduzir a cristalinidade da celulose, remover grande parte da lignina, aumentar a porosidade (área de superficie acessível) dos materiais e tornar o substrato significativamente mais suscetível à ação enzimática, assim alcançar altos rendimentos de glicose (CARDONA *et al.*, 2010). O pré-tratamento hidrotérmico tem sido muito estudado recentemente, O processo consiste no uso de água juntamente com a biomassa, no qual são submetidos a altas temperaturas e pressão (geralmente de 160ºC a 240ºC por 20 mim), removendo a fração hemicelulósica (MOSIER *et al.*, 2005).

No processo de hidrólise enzimática de material celulósico, a catálise ocorre pela ação das celulases, que convertem a celulose em glicose, rompendo as ligações glicosídicas das microfibras da celulose, liberando glicose, a qual em seguida pode ser fermentada por leveduras para produção do bioetanol (DILLON, 2004; RABELO, 2010). Diversos estudos sobre produção e aplicação das celulases vêm sendo desenvolvidos, a fim de aplicá-las no processo de hidrólise, Pires (2020) estudou diversas condições de cultivo para produção de celulases em fermentação sólida, tendo sido obtida boa produtividade nos meios de baixo custo analisados, resultando atividade enzimática de 7,92 U/gms e 2,9874 U/gms, no frasco e na coluna, respectivamente.

O emprego de enzimas em biomassas lignocelulósicos apresenta diferentes vantagens ao comparar com hidrólise ácida, pois o processo é realizado em condições mais brandas, possibilitando maiores rendimentos, menores custos com equipamentos já que não apresenta problemas de corrosão (BALAT *et al.*, 2008). Consequentemente, a hidrólise enzimática pode ser considerada mais apropriada para produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos (AWAN, 2013).

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo obter a concentração máxima de açúcares redutores totais (ART) da hidrólise enzimática no bagaço de laranja analisando as variáveis concentração de enzimas celulase e pectinase, e o tempo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os resíduos da laranja (casca, polpa, sementes) utilizados nos ensaios experimentais foram fornecidos pela empresa Pró-laranja Sucos, indústria e comércio de suco de laranja em Vitória/ES. Os resíduos cítricos foram triturados em uma forrageira TRF 400. Em seguida, foram colocados em uma estufa com circulação de ar a 55°C, até atingir peso constante por aproximadamente 24 horas para a secagem da amostra.

2.1 PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO

O pré tratamento hidrotérmico foi adaptado do trabalho de Carlos(2014). Para tal, foi usada uma concentração de biomassa de 5 g do resíduo cítrico triturado e seco para 100 mL de água destilada na proporção 1:20 (m/v) . A mistura foi feita em um frasco erlemeyer, o processo foi conduzido em uma autoclave a 121°C e 1 atm durante 60 mim. Após o processo de pré-tratamento toda a suspensão foi filtrada a vácuo sendo separadas em fração líquida e fração sólida. A fração sólida foi seca na estufa a 55°C até atingir temperatura constante. E em seguida, foi obtida rendimento mássico (%RM) por meio da Equação 1.

$$RM(\%) = \frac{m_{amostrafinal}}{m_{amostra\ inicial}} * 100 \quad (1)$$

Em que: $m_{amostrafinal}$ é a massa do resíduo após o pré-tratamento, $m_{amostrainicial}$ é a massa do resíduo antes do pré-tratamento.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS RESÍDUOS DA LARANJA

A caracterização da biomassa cítrica foi realizada com material seco in natura e após o pré-tratamento hidrotérmico, considerando o seu teor de umidade, extrativos, cinzas, lignina, holocelulose (celulose e hemicelulose) e pectina. A determinação do teor de extrativos foi realizada adaptação à norma TAPPI T204 cm-07, utilizando tolueno e álcool etílico como solventes. O teor de umidade, cinzas e holocelulose (celulose e hemicelulose) foram realizados com adaptação do trabalho de Morais et al. (2010). A determinação do teor de lignina foi realizado com base na adaptação da norma da TAPPI T222 cm-11. A determinação da pectina foi feita de acordo com Sudhakar e Maini (2000).

Ensaios Da Hidrólise Enzimática

A hidrólise enzimática empregada nos estudos foi adaptada do trabalho de Nogueira (2017), foi utilizado dois tipos de enzimas comerciais, celulase 1,5 L e Pectinex ULtra Tropical, que foram doadas pela LNF Latino Americana (Bento Gonçalves-RS), com o objetivo de aumentar a obtenção de açúcares liberados nesta etapa. Os fatores estudados nesta hidrólise foram 3 fatores, concentração de celulase, concentração de pectinase e tempo.

Os ensaios enzimáticos foram preparados em erlenmeyer, com a concentração de 5% de biomassa pré-tratada, com 100 mL de tampão acetato de sódio com pH 4,8, e em seguida, as enzimas foram adicionadas em concentrações variadas, de acordo com o planejamento experimental (tabela 1). Durante a hidrólise e os frascos de erlenmeyer foram agitados 150 rpm à 45° C e o tempo de duração varia de acordo com o planejamento.

No fim da hidrólise, as amostras coletadas foram mantidas em um banho maria à 100°C por 15 min, a fim de desativar as enzimas. Logo após o processo, o meio foi filtrado a vácuo e armazenado na geladeira para ser usado na fermentação. E foi feito a quantificação da concentração de açúcares redutores totais, por espectrofotômetro pelo método de DNS.

3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DCCR

O DCCR foi o planejamento utilizado para determinar o ponto ótimo de obtenção de açúcares redutores Totais (ART) e obter um modelo quadrático completo que descreva o processo enzimático. O delineamento adotado para o DCCR 2^3, contendo 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. A tabela 1 apresenta os valores codificados e decodificados analisados para a hidrólise enzimática.

Tabela 1 - Matriz do planejamento experimental DCCR para a hidrólise enzimática com os valores codificados e decodificados para os fatores analisados.

Experimento	Conc. de celulases (FPU/mL) x_1	Conc. de pectinases (U/mL) x_2	Tempo (horas) x_3
1	7,8 (-1)	3,6 (-1)	14,5 (-1)
2	7,8 (-1)	3,6 (-1)	33,5 (1)
3	7,8 (-1)	8,4 (1)	14,5 (-1)
4	7,8 (-1)	8,4 (1)	33,5 (1)
5	13,2 (1)	3,6 (-1)	14,5 (-1)
6	13,2 (1)	3,6 (-1)	33,5 (1)
7	13,2 (1)	8,4 (1)	14,5 (-1)
8	13,2 (1)	8,4 (1)	33,5 (1)
9	6 (-1,6818)	6 (0)	24 (0)
10	15 (1,6818)	6 (0)	24 (0)
11	10,5 (0)	4 (-1,6818)	24 (0)
12	10,5 (0)	10 (1,6818)	24 (0)
13	10,5 (0)	6 (0)	8 (-1,6818)
14	10,5 (0)	6 (0)	40 (1,6818)
15	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)
16	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)
17	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)

O planejamento experimental DCCR foi analisado utilizando-se o software de estatística para obtenção da regressão dos dados experimentais, o modelo experimental, os testes de normalidade, testes estatísticos para a regressão e o diagrama de Pareto, com objetivo de avaliar a influência dos fatores estuados.

Determinação da concentração de açúcares redutores totais (ART)

Para determinar a concentração de ART no hidrolisado proveniente do resíduo cítrico será empregado a metodologia proposta por Vasconcelos et al. (2013), sendo baseada na metodologia de Bernfeld (1995) e Miller (1995) que visa a utilização do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para isso, construiu-se uma curva-padrão de glicose com concentrações de 0 a 1 g/L para análise das amostras. Quando necessário foi efetuadas diluições das amostras empregadas na determinação dos ART para que a leitura da absorbância estivesse contida dentro do intervalo da curva padrão.

Resultados e Discussões

Os experimentos foram preparados em frascos Erlenmeyer para realizar o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja com os resíduos previamente triturado e seco, seguindo a metodologia descrita detalhadamente. E o rendimento da massa obtido após o pré-tratamento com valor médio de 36%, este valor é inferior ao encontrado por Carlos (2014), que apresentou um resultado em média de 50% para o bagaço de laranja.

Na tabela 2, mostra os valores obtidos após a caracterização da composição dos materiais lignocelulósico dos resíduos cítricos com outros autores.

Tabela 2 - Comparação da caracterização química do bagaço de laranja industrializado in natura processamento com outros autores.

	In Natura					
Referências	Umidade(%)	Cinzas(%)	Celulose(%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)	Pectina(%)
Este trabalho	7,78	1,53	18,8	10,7	3,14	15,1
AWAN (2013)	80,93±0,53*	1,95±0,35*	4,98±0,47*	3,67±1,03*	4,4±0,19*	4,65 ±0,52*
NOGUEIRA (2016)	7,38±0,03	3,79±0,04	22,90±0,01	3,39±0,38	9,9±0,24	-
BOHÒRQUEZ (2017)	-	-	21,0±7,4	9,8±7,4	3,6±0,1	27,2±1,4

*Os valores referentes ao bagaço de laranja úmido.

Nota-se que na tabela 7, para a amostra do bagaço de laranja industrializado in natura, encontrou-se 18,8% de celulose e 10,7% de hemicelulose no resíduo previamente seco. Ao comparar a quantidade de celulose, observa-que que Nogueira (2016) e BOHÒRQUEZ (2017) e encontraram valores torno de 22,90% 21,00 % respectivamente, valores de concentração próxima a amostra do presente trabalho. Já, a quantidade de hemicelulose, foi superior ao encontrado por Nogueira (2016) 7,64% e semelhante ao trabalho de BOHÒRQUEZ (2017) 9,8%. A quantidade de lignina encontrado foi de 3,14% obtido do bagaço industrializado in natura, quantidade similar ao trabalho de BOHÒRQUEZ (2017) 3,6% e inferior ao trabalho de Nogueira (2016) (9,95%). E o teor de pectina foi 15,1% deste trabalho foi inferior ao trabalho de BOHÒRQUEZ (2017). Deve-se ressaltar que estas diferenças podem ser explicadas por se tratar de produtos vegetais, onde a composição química pode variar de acordo com as condições de crescimento, maturidade do fruto, variedade e clima (KALE; ADSULE, 1995).

Prosseguindo a análise dos resultados obtidos na tabela 2 e 2, para a amostra de bagaço pré-tratado deste trabalho, observa-se que o teor de umidade obtido após o pré-tratamento hidrotérmico foi semelhante.

Observa-se ainda que obteve um leve aumento no teor de celulose (4%) em relação ao in natura, já o concentração de hemicelulose reduziu 30%, e a concentração de um de lignina diminuiu 57,6%, evidenciando que teve uma leve remoção das frações lignocelulosica na etapa de pré-tratamento, sendo necessário de outras análise para verificar da estrutura do material.

A fim de comparar os resultados do bagaço de laranja após o pré-tratamento desse trabalho com a da literatura, foram comparados com outros trabalhos publicados

referentes a outro tipo de biomassa após o mesmo pré-tratamento em diferentes condições, tabela 3. Para entender se este tipo de pré-tratamento é eficaz para remover as frações lignocelulosica presente em diferentes bagaços.

Tabela 3 - Comparação da caracterização do bagaço de laranja e de outros resíduos descritos na literatura.

		Pré-tratada	**Hidrotérmico**		
Referências	Resíduo	Cinzas(%)	Celulose(%)	Hemicelulose(%)	Lignina(%)
Este trabalho	Bagaço de laranja	1,10	19,52	7,41	1,33
SANTOS *et al.*, 2014	Palha de cana	-	(50,01-55,99)	(2,05-17,06)	(24,54-40,20)
SANTOS-ROCHA *et al.*,2017	Palha de milho	(0,5-0,7)	(40,5-54,0)	(22,1-20,9)	(21,0-30,9)
KRISTENSEN *et al.*, 2008	Palha de trigo	5,6	59,0	-	25,5

Observa-se que nos estudos de pré- tratamento de palhas de trigos feitos por Kristensen *et al*,(2008), as palhas de trigo são submetidas a temperatura de 195 ° C no reator por injeção de vapor durante 6 minutos em média, mostrou que foi eficaz, obteve efeito desfibrador, removendo parcialmente a hemicelulose e re-localizando a lignina, para aumentar a digestibilidade enzimática para converter em açúcares fermentáveis, porém não ocorreu ruptura da estrutura esquelética da parede celular e modificação da cristalinidade da celulose, concluindo que mesmo sem perturbar a parede celular este tipo de pré-tratamento pode ser eficaz.

SANTOS-ROCHA *et al.*, (2017), avaliou pré-tratamento hidrotérmico a partir da palha de milho, observa-se que o rendimento mássico associado à etapa de pré-tratamento hidrotérmico de ambas as biomassas diminuiu com o aumento da temperatura, e notou-que a amostra de palha apresentou 70,7% de remoção de hemicelulose a 170°C/15 min e 89,7% a 195°C/10 min. A menor perda de celulose ocorreu na condição mais branda de temperatura (170°C). E conclui que a variável temperatura apresentou maior influência sobre a degradação da biomassa submetida ao pré-tratamento hidrotérmico que a variável tempo de reação, para as condições empregadas nesse estudo.

Santos *et al.*, 2014, estudou a palha de cana-de-açúcar antes e após o pré-tratamento hidrotérmico. Nota-se que a composição química da palha in natura foi de celulose (44,26%) e lignina(19,01%) hemicelulose (31,51%), após palha ser submetida

ao pré-tratamento hidrotérmico observa-se que a concentração de celulose (45,30%) e lignina(16,70%) aumentou e de hemicelulose (17,06 a 2,07%) reduziu. Portanto, os resultados deste trabalho mostraram que em temperaturas de 150 a 230 °C o pré-tratamento hidrotérmico solubiliza grande parte da fração hemicelulósica sem afetar a celulose e a lignina semelhantes. Já em condições mais severas de temperaturas (260 a 270 °C), a celulose e a lignina podem ser solubilizadas em até 20% e 60%, respectivamente. Notando-se que a variável temperatura tem maior efeito sobre os constituintes da palha de cana em relação ao tempo.

Portanto, pode-se observar que os resultados obtidos na caracterização do bagaço de laranja pré-tratado hidrotérmico deste trabalho foi similar comparada com a literatura referente a outros resíduos lignocelulosicos, dessa forma, para melhores conclusões desta etapa seria necessário fazer outras análises para investigações estruturais da biomassa a fim de alcançar melhores resultados, pois ainda existem poucos estudos sobre este tipo de pré-tratamento e verificação da estrutura da parede celular. E, além disso, observa-se que a temperatura usada no trabalho foi menor do que utilizada por outros autores, isso pode ter influenciado nos resultados; e o tipo de material usado também apresenta composição química diferente o que pode influenciar na quebra da estrutura da parede celular.

Após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de laranja, foi realizada a hidrólise enzimática. Na tabela 4, descreve os resultados da concentração de açúcares redutores totais obtidos após a hidrólise enzimática nas diferentes condições de ensaio por meio do planejamento estatístico estudado.

Tabela 4 - Resultados obtidos para a hidrólise enzimática com os valores codificados e decodificados para os fatores analisados.

Experimentos	Conc. de celulases (FPU/mL) (X_1)	Conc. de pectinases (U/mL) (X_2)	Tempo (Horas) (X_3)	Conc. De açúcares redutores totais (g/L)
1	7,8 (-1)	3,6 (-1)	14,5 (-1)	15,41
2	7,8 (-1)	3,6 (-1)	33,5 (1)	21,04
3	7,8 (-1)	8,4 (1)	14,5 (-1)	19,17
4	7,8 (-1)	8,4 (1)	33,5 (1)	19,61
5	13,2 (1)	3,6 (-1)	14,5 (-1)	16,59
6	13,2 (1)	3,6 (-1)	33,5 (1)	20,10
7	13,2 (1)	8,8 (1)	14,5 (-1)	20,56
8	13,2 (1)	8,8 (1)	33,5 (1)	20,93
9	6 (-1,6818)	6 (0)	24 (0)	17,03
10	15 (1,6818)	6 (0)	24 (0)	19,09
11	10,5 (0)	2 (-1,6818)	24 (0)	16,03
12	10,5 (0)	10 (1,6818)	24 (0)	18,28

13	10,5 (0)	6(0)	8 (-1,6818)	14,08
14	10,5 (0)	6 (0)	40 (1,6818)	20,19
15	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)	19,83
16	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)	19,61
17	10,5 (0)	6 (0)	24 (0)	21,30

É possível observar que os pontos centrais mostra uma boa qualidade de reprodutibilidade do processo. Os valores de concentração de açúcares redutores totais variam entre 14,08 e 21,30 g/L. A maior concentração de açúcares redutores totais foi encontrada no ensaio 2, no qual o hidrolisado apresentou 21,04 g/L de açúcares redutores totais. Neste ensaio os fatores analisados concentração das enzimas pectinas e celulase, estavam em níveis inferiores experimentais e com maior tempo de hidrólise. E nos ensaios 6,8 e 14 apresentaram em média, aproximadamente 20,5 g/L de açúcares liberados. Entretanto, nesses pontos os fatores analisados estavam em diferentes concentrações de pectinase e celulase e maior tempo de hidrólise. Portanto, verifica-se que o nos ensaios com maior tempo de hidrólise ocorreu uma maior liberação de açúcares redutores totais. Pode-se observar que a concentração de pectinase influenciou na liberação de açúcares, ao comparar os ensaios 1 e 3 que com níveis iguais de concentração de celulose e tempo e níveis diferentes de pectinase houve uma maior liberação de açúcares, portanto a enzima pectinase interferiu-se nos resultados obtidos.

Usando o software de estatística, foram feitas as análises estatísticas dos resultados. Foram estimados os efeitos das variáveis analisadas assim como a interação entre elas. A significância de cada efeito analisado concentração de celulase, concentração de pectinase e tempo de hidrólise, foram testadas pelos efeitos padronizados das variáveis (valores de t) e a probabilidade da significância do teste (valor de p), apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Coeficiente de regressão do DCCR da hidrólise.

Variáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Valor de p
Celulase (L)	0,2089	0,3438	0,562599
Celulase (Q)	-0,4836	0,3784	0,241994
Pectinase (L)	0,2970	0,3438	0,416250
Pectinase (Q)	-0,6332	0,3784	0,138130
Tempo (L)	1,8065	0,3438	0,001180
Tempo (Q)	-0,8154	0,3784	0,068096
Celulase x Pectinase	-0,3359	0,4492	0,478911
Celulase x Tempo	0,2807	0,4492	0,551839
Pectinase x Tempo	-0,6948	0,4492	0,165800

(L)=fator linear e (Q)= fator quadrático.

Pelo nível de significância de 5% (valor de p<0,05), observa-se que o tempo (termo linear – L) apresentou efeito significativo para a liberação de açúcares redutores totais.

A partir dos resultados obtidos foi possível realizar a construção do modelo da superfície resposta, conforme a Equação (2).

$$Y = 20.1651 + 0.2089X_1 - 0.4836X_1^2 + 0.2970X_2 - 0.6332X_2^2 + 1.8065X_3 - 0.8154X_1^2 - 0.3359X_1X_2 + 0.2807X_1X_3 - 0.6948X_2X_3 \quad (2)$$

Em que: X_1= Valor codificado da Celulose; X_2= valor codificado da Pectinase; X_3=valor codificado do tempo de hidrólise.

O coeficiente de determinação (R^2) do modelo da regressão foi de 84,47 %, e todos o parâmetros foram ajustados ao modelo. Visando avaliar adequadamente aos resultados experimentais foi feito o estudo sobre a significância do modelo pelo teste de análise da variância (Anova), apresentado na tabela 6, com intervalo de confiança de 95%. O modelo apresentado pela Equação 2 resultou valor de F calculado pela distrbuição de Fisher 1.15 vezes maior que o valor tabelado, dessa forma, o modelo é estatisticamente siginificativo para o experimento realizado.

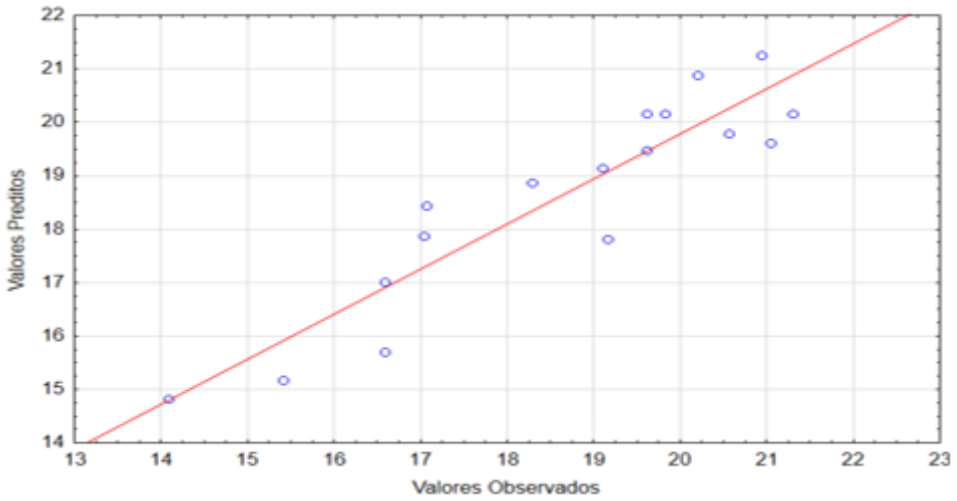
Tabela 6 - Anova.

Fatores	GL	SQ	QM	F calculado	F tabelado
Regressão linear	9	61.4688	6.8298	4.2316*	3.68
Resíduo	7	11.2984	1.6140		
Falta de Ajuste	5	9.6034	1.9207	2.2664ns	19.30
Erro Puro	2	1.6949	0.8474		
Total	16	72.7672			

GL=Grau de liberdade; SQ=Soma Quadrática; QM=Quadrado médio.

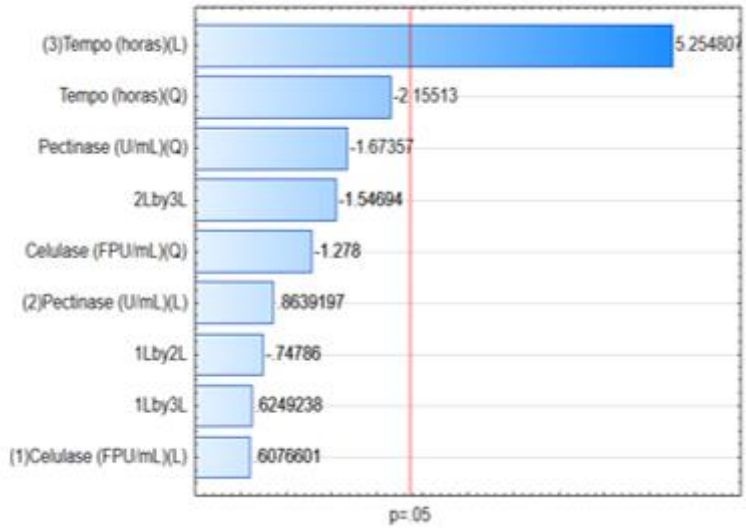
Na Figura 4, representa os valores preditos versus valores experimentais, os pontos se distribuem de forma aleatória e próximo à linha continua mostrando que os valores experimentais se aproximam dos preditos, além disso, não apresentam qualquer tendência quanto à distribuição, o que indica que o bom ajuste do modelo representativo do experimento.

Figura 4- Valores preditos versus observados



Para determinar a magnitude e a importância dos fatores construiu-se o gráfico de Pareto, apresentado na figura 5. Pode-se observar que estatisticamente o tempo foi o que se apresentou como o significativo (5,2548%). E os demais fatores não foram significativos para o modelo a um nível de significância p=0,05

Figura 5- Gráfico de pareto



A partir dos resultados obtidos foram construídas as superfícies de resposta e as curvas de níveis correspondentes a cada par de variáveis independentes em função da variável resposta concentração de açúcares redutores totais (ART). Ao avaliar o tempo e concentração de celulases a partir das Figuras 6 e 7, observou- se que para uma mesma concentração de celulases, e os maiores tempo de hidrólise, proporcionou uma maior

liberação de açúcares redutores totais. Nogueira (2016) analisou a hidrólise enzimática do bagaço da laranja por meio de um planejamento experimental, com concentrações de celulase variando de 3,0 a 7,02 FPU/mL e tempo de 40 e 24 horas em shaker a 45°C, encontrou os melhores valores de açúcares redutores totais com maior concentração de celulase, 7,02 FPU/mL, e o maior tempo de 40 horas. Este autor conclui-se que os açúcares redutores totais liberados pela hidrólise enzimática foram cerca de 3 vezes superiores aos da hidrólise ácida diluída, isso ocorreu nos experimentos com maiores concentrações de enzimas celulases.

Verificou-se que o os maiores tempo de hidrólise independente da concentração de celulase promoveu maiores valores de liberação de açúcares redutores totais. Vale ressaltar que o tempo, e um dos fatores limitante devido aos custos de produção industrial, dessa forma, o tempo deve ser otimização no processo enzimático para se obter maiores rendimento da hidrólise.

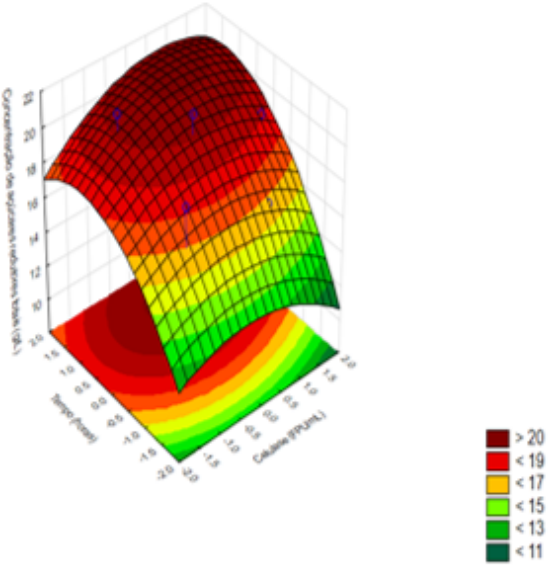


Figura 6- Superfície resposta para avaliar a hidrólise enzimática como função das variáveis concentração de celulase e tempo.

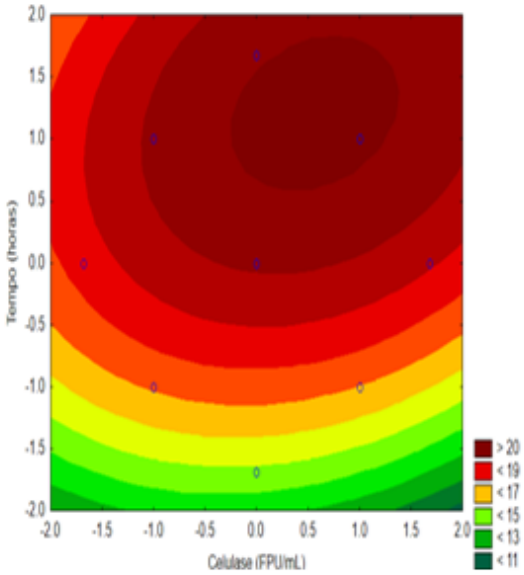


Figura 7- Curva do contorno para avaliar a hidrólise enzimática como função das variáveis tempo e concentração de celulose.

Nas Figuras 8 e 9, analisando a concentração de pectinase e o tempo, observou-se que para os maiores tempo de hidrólise, 33,5 e 24 horas e concentração de pectinase 8,4 e 6,0 U/ mL, obteve-se maior liberação de açúcares redutores totais. Awan (2013), realizou estudos sobre a enzima pectinase em diferentes cargas enzimáticas variando de 10 à 25 mg proteína/gCPWO seco e observou que a maior quantidade de carga

enzimática empregada com 25 mg proteína/gCPWO seco obteve-se maior rendimentos de glicose. Portanto, a presença da pectinase com maiores concentrações é importante para desencadear as reações de conversão de celulose em açúcares.

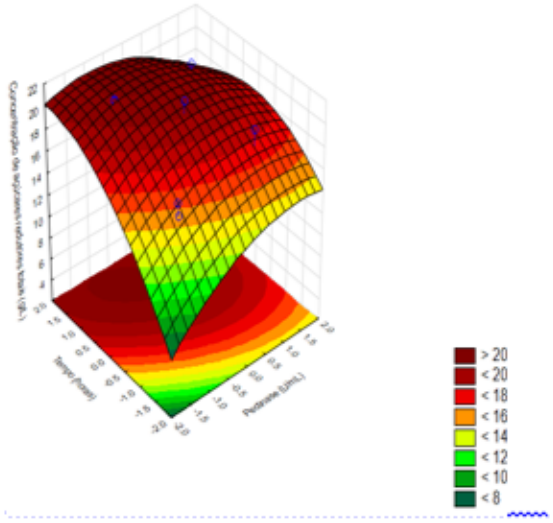


Figura8- Superfície resposta para avaliar a hidrólise enzimática com função das variáveis concentração de pectinase e tempo.

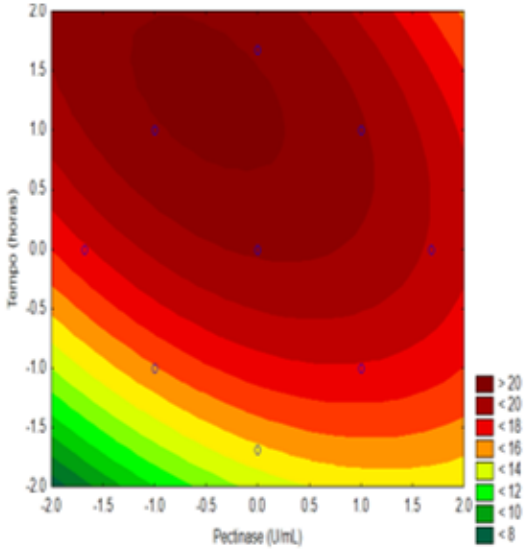


Figura 9- Curva do contorno para avaliar a hidrólise enzimática como função das variáveis tempo e concentração de pectinase.

Ao se comparar concentração de celulase e concentração de pectinase a partir das Figuras 10 e 11, observa-se que na maior liberação de açúcares redutores totais foi obtido no ponto central que corresponde a 10,5 FPU/ mL e 6 U/mL de celulase e pectinase respectivamente. Os resultados encontrados nesse trabalho são similares de Awan (2013), que ao realizar a hidrólise com combinações de enzimas celulases, pectinases e beta-glicosidase, produziram elevados rendimentos de açúcares, e tal que mostrou que para ocorrer hidrólise completa da biomassa, a enzima pectinase é importante para a quebra do polímero de pectina e liberação das cadeias longas do polímero de celulose. E as enzimas celulase e beta-glicosidase realizar a despolimerização da celulose, convertendo-os em monômeros de açúcares, no qual se teve maior quantidade de açúcares após 48 horas do processo enzimático de acordo, Awan (2013).

Wilkins *et al.* (2007), avaliou-se a hidrólise enzimática com enzimas pectinase e celulase na casca seca de toranja (resíduos cítricos), as concentrações de pectinase e celulase utilizada foram 0, 2, 5 e 10 mg de proteína/g de matéria seca da casca, e conclui-se que 5 mg de pectinase/g de matéria seca e 2 mg de celulase/g de matéria seca da cascas foram as menores cargas empregas que produziu mais glicose. E ainda relata que os

maiores rendimentos de glicose foram alcançados quando a enzima pectinase foi combinada com celulase, resultando mais açúcares fermentáveis para produção de etanol.

A combinação das enzimas pectinases e celulases são importantes para processo de hidrólise, mostrando eficiência na quebra da celulose, portanto, a combinação das enzimas tem efeito similar ao encontrado por outros autores.

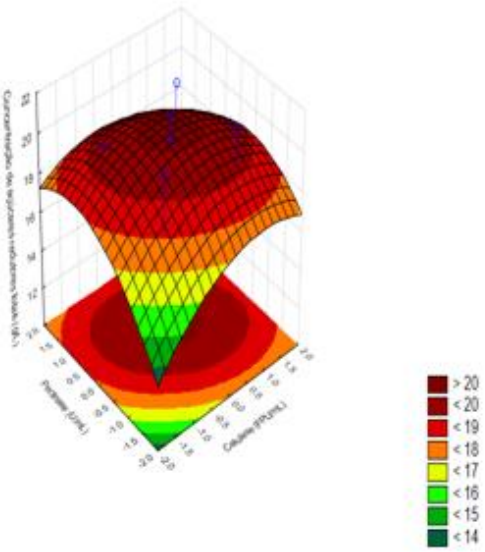


Figura 10- Superfície resposta para avaliar a hidrólise enzimática como função das variáveis concentração de pectinase e concentração de celulase.

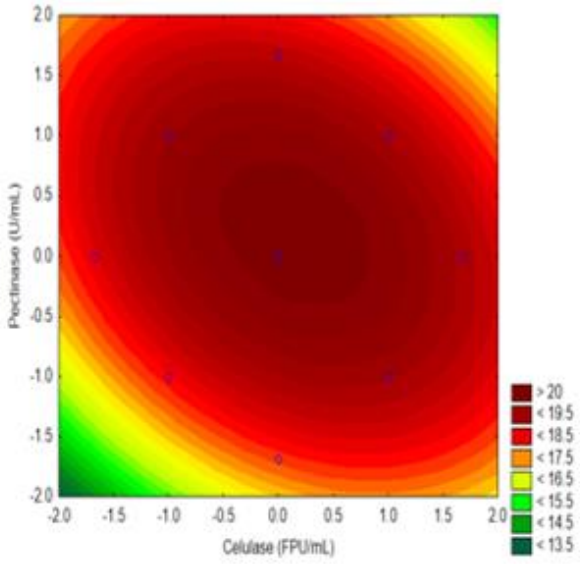


Figura 11- Curva do contorno para avaliar a hidrólise enzimática como função das variáveis concentração de pectinase e concentração de celulose.

A determinação da concentração máxima de açúcares redutores foi obtida pelo modelo da superfície de resposta, expressa pela equação 2. A concentração de açúcares redutores totais máxima foi de 21,6 g/L, nas condições de X_1 igual a 0,7399, X_2 igual a -0,6727 e X_3 igual 1,4127 a para os valores codificados do modelo estatístico. Os resultados descodificados, são 12,5 FPU/mL de celulase, 4,4 U/mL pectinase e 37,4 horas de hidrólise, conforme a tabela 7.

Tabela 7 - Valores otimizados codificados e decodificados.

Valor codificados		Valor decodificado	
X_1	0,7399	Conc. De Celulase (FPU/mL)	12,5
X_2	-0,6727	Conc. De Pectinase (U/mL)	4,4
X_3	1,4127	Tempo (horas)	37,4

A validação do modelo foi feita a partir das condições ótimas para a hidrólise enzimática pelo planejamento experimental e apresentou-se resultados adequados para a concentração de açúcares com o valor observado de 21,06 g/L, validando adequadamente o modelo proposto. Porém, foram realizados testes experimentais em menor tempo de hidrólise com intuito de minimizar os custos industriais, e proporcionou a liberação de açúcares semelhante ao obtida pelo modelo, dessa forma, optou-se em restringir o tempo para 32 horas do processo de hidrólise para em seguida, ocorrer o processo de fermentação alcoólica.

4 CONCLUSÃO

Com base no resultados desde trabalho, conclui-se que a hidrólise enzimática com as enzimas celulases e pectinase mostraram-se eficiente na liberação de açúcares, no qual a máxima de concentração de açúcares redutores totais foi obtida na condição de em 12,5 FPU/mL de celulase, 4,4 U/mL pectinase e 37,5 horas de hidrólise. É possível evidenciar pelos resultados a importância da otimização das condições da hidrólise, porém o tempo do processo foi reduzido com objetivo de minimizar os custos industriais.

REFERÊNCIAS

AWAN, A. T. **Orange Bagasse as Biomass for 2G-Ethanol Production.** 2013. 184 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

BALAT, M., BALAT, H., OZ, C., Progress in Bioethanol Processing, **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n.25, p. 551-573, 2008.

BERNFELD, P. Amylases, α and β. Methods in Enzymology, v. 1, p. 149-157, 1955.

BOHÒRQUEZ, M. A. M., **Caracterização de nanocelulose do bagaço de laranja e imobilização de enzimas hidrolíticas visando seu reaproveitamento durante a etapa da hidrólise de celulose.** 2017, 135p. Tese (doutorado em Ciências). Universidade estadual de campinas, Campinas, 2017.

BUSIC, A. et al. Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review. Food Technology & Biotechnology. V. 56, n. 3, p. 289-311, 2018.

CARDONA, C.A., QUINTERO, J.A., PAZ I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives, **Bioresource Technology,** v. 101, p. 4754–4766, 2010.

CARLOS, E. F. S. **Avaliação do potencial de uso de resíduos do processamento de frutas na produção de etanol 2G.** 2014. 102p. Dissertação (mestrado em engenharia química)- Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2014.

DILLON, A., Celulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto, Legis Summa, p. 243-270, 2004.

GROHMANN, K.; CAMERON, R.G.; BUSLIG, B. S. Fractionation and pretreatment of orange peel by dilute acid hydrolysis. **Bioresource Technology,** v. 54, p. 129-141, jul. 1995.

HOU, et al. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass with Ionic Liquids and Ionic Liquid-Based Solvent Systems. **Molecules**, v. 22,n. 490, p. 1-24, 2017.

KALE, P. N.; ADSULE, P. G. **Handbook of Fruit Science and Technology: Production, Composition, Storage, and Processing**. New York: Salunkhe, D. K.; Kadam, S. S., 1995.

KRISTENSEN *et al*. CEll-wall structural chances in wheat straw pretreated for bioethanl productin, **Biotechnology for biofuels,** p. 2-9, 2008.

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

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

MORAIS, A. P. S. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química.** 2010. 47f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual Paulistana Júlio Mesquita Filho, Botucatu-SP, 2010.

NOGUEIRA, D. P. **Estudo da obtenção de açúcares redutores totais a partir do bagaço de laranja (Citrus sinenses) por hidrólises ácida diluída e enzimática.** 2016. 74p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

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

SANTOS *et al.*, Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósic0, **Química nova**, v.37, n.1, p. 56-62, 2014.

SANTOS-ROCHA *et al.*, Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração. **Scientia Plena,** v.13, p. 1-13, 2017.

SUDHAKAR, D. V., MAINI, S. B. (2000). Isolation and characterization of mango peel pectins. *J Food Process Pres*, 24, p. 209-227.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **TAPPI T204 cm-07:** solvent extractives of wood and pulp. 2007.

Technical Association of the Pulp and Paper Industry. **TAPPI T222 om-11:** acid-insoluble lignin in wood and pulp. 2011.

USDA, 2020. United States Department of Agriculture Forein Agricultural Service, Brasil: Citrus Anual. Disponível em :< https://www.fas.usda.gov/data/brazil-citrus-annual-2>. Acessado em 07 de dez. 2020.

VASCONCELOS, N. M., PINTO, G.A.S., ARAGÃO, F.A.S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos, Fortaleza – CE. Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543 ; 88, 2013.

WILKINS, M. R.; WIDMER, W.; GROHMANN, K. Hydrolysis og grapefruit peel waste with celulase and pectinase enzimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1596-1601, 2007.