UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

BRUNO CHABOLI GAMBARATO

**Estabelecimento e Validação de Modelos de Oxidação de
Ligninas**

Lorena
2010

BRUNO CHABOLI GAMBARATO

**Estabelecimento e Validação de Modelos de Oxidação de
Ligninas**

**Dissertação apresentada à Escola de Engenharia
de Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências do
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Industrial na Área de Concentração: Conversão
de Biomassa.**

Orientador: Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves

**Lorena
2010**

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

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
Assessoria de Documentação e Informação
Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP

Gambarato, Bruno Chaboli.

Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas / Bruno Chaboli Gambarato; orientador Adilson Roberto Gonçalves. —Lorena, 2010.
100p.: il..

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Lignina 2. Modelagem matemática 3. Oxidação química 4. Oxidação enzimática 5. Cinética 6. Biomassa vegetal I.Título. II. Gonçalves, Adilson Roberto, Orient.

CDU -574.6

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Lilian e Maurício, como retribuição aos
anos de dedicação, sacrifícios e
renúncias em prol da minha educação*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Félix Monteiro Pereira, pela grande ajuda na realização deste trabalho e pelo aprendizado desde os tempos de graduação

À Laís Ferretti, Karine Pereira e Simone Nakanishi, pelos dados utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha e ao Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira, pelos valorosos conselhos que me fizeram escolher a pesquisa nos tempos de graduação e iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Adilson Roberto Gonçalves, pela orientação deste trabalho, pela paciência e confiança em mim depositados.

Aos grandes amigos que fiz em Lorena, em especial Anderson, Antonio e Thiago (que também redigiu o Abstract), pelo apoio incondicional ao longo desses anos

Aos amigos do Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem Matemática e Simulação pelos bons momentos.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas
o homem compreende, pesquisa e consegue realizar,
reconheço claramente que o espírito humano é obra de
Deus, e a mais notável”*
Galileu

RESUMO

GAMBARATO, B.C. **Estabelecimento e validação de modelos de oxidação de ligninas**. 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

Neste trabalho, foram desenvolvidos modelos matemáticos fenomenológicos capazes de descrever a cinética de oxidação química e enzimática de ligninas de palha e bagaço de cana, obtidas por diferentes processos. A oxidação química foi realizada utilizando-se lignina de bagaço de cana obtida por explosão a vapor e por polpação Acetosolv. As reações se processaram em 4 temperaturas (50, 70, 90 e 115°C) e o fluxo de oxigênio foi mantido constante a 60 mL/min. O meio reacional foi composto por 0,5 g de lignina, 100 mL de ácido acético glacial, 1,6 mL de HBr (47% p/v), 0,05 g de acetato de manganês (II), 0,42 g de acetato de cobalto (II) e 10 mL de anidrido acético. A cinética da reação foi acompanhada por medida de absorbância a 280nm. O modelo foi proposto considerando a cinética de ordem n e incorporando a equação de Arrhenius, que relaciona a constante de velocidade com a energia de ativação e a temperatura do sistema. A integração dos modelos foi feita utilizando-se o método de Runge-Kutta de quarta ordem e o ajuste dos parâmetros foi realizado segundo o método de Levenberg-Marquardt. A validade estatística do ajuste dos modelos foi avaliada pelo método de análise de variância. Os valores de energia de ativação obtidos foram 9099 ± 947 J/mol para a lignina de explosão a vapor e 785 ± 55 J/mol para a lignina acetosolv. A constante cinética K apresentou valor $6,62 \pm 1,3$ para a lignina de explosão a vapor e $0,0184 \pm 0,0035$ para a lignina acetosolv. A ordem de reação encontrada foi $1,22 \pm 0,12$ para a lignina de explosão a vapor e $1,19 \pm 0,06$ para a lignina acetosolv. A oxidação enzimática foi realizada utilizando lignina de palha e bagaço de cana e 4 extratos enzimáticos: extrato de maçã, extrato de maçã reutilizado, extrato de batata e enzima comercial NOVOZYM 51003. As reações se processaram em solução tampão fosfato 50 mmol/L (pH 7,6) e 1,4-dioxano, 3:1(v/v), no volume total de 30 mL. Foram utilizados 300 mg de lignina, 15 mL de extrato enzimático, 0,1% de glicerol e 30 mL/min de O₂. A cinética da reação foi acompanhada pela medida de absorbância a 265, 280 e 320nm. O modelo foi proposto com base na cinética de Michaelis-Menten e foi capaz de reproduzir os dados experimentais. A consideração da cinética enzimática forneceu valores de correlação melhores que os obtidos em outros trabalhos, que não consideraram a cinética enzimática na modelagem. A formação dos grupos α -carbonílicos, monitorada a 280nm, foi, em geral, a reação que apresentou maior constante de velocidade. Foi observado que o binômio C-ks é importante para a cinética da reação e a reação enzimática que apresentou maior afinidade enzima-substrato foi a de formação de grupos carboxílicos, monitorada a 320nm, para a oxidação com extrato de maçã. A oxidação enzimática da lignina de bagaço apresentou comportamento cinético diferente da lignina de palha, evidenciando que há diferenças estruturais entre essas ligninas não elucidadas ainda.

Palavras-chave: Lignina. Modelagem matemática. Oxidação química. Oxidação enzimática. Cinética. Biomassa vegetal.

ABSTRACT

GAMBARATO, B. C. **Establishment and validation of mathematical models for lignin oxidation.** 2010. 100 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2010.

This work proposed phenomenological mathematical models capable of describing chemical and enzymatic oxidation kinetics of sugarcane straw and bagasse from different processes. Chemical oxidation was realized using sugarcane bagasse lignin obtained by steam explosion and acetosolv pulping. The reactions were carried out under 4 different temperatures (50, 70, 90 and 115 °C) and the oxygen flux was maintained constant at 60 mL/min. The reaction medium was formulated using 0.5 g lignin, 100 mL glacial acetic acid, 1.6 mL HBr (47% w/v), 0.05 g manganese acetate (II), 0.42 g cobalt acetate (II) and 10 mL acetic anhydride. The reaction kinetics was followed by absorbance measurements at 280 nm. It was proposed a model considering n-order kinetics and incorporating Arrhenius equation, which relates rate constant to activation energy and system temperature. Models integration was made using fourth-order Runge-Kutta method and parameters adjustment was realized according to Levenberg-Marquardt method. The statistical validity of model adjustments was assessed using analysis of variance method. For activation energy, the values obtained were $9099 \pm 947 \text{ J mol}^{-1}$ for steam explosion lignin and $785 \pm 55 \text{ J mol}^{-1}$ for acetosolv lignin. The kinetic constant K obtained was 6.62 ± 1.3 for steam explosion lignin and 0.0184 ± 0.0035 for acetosolv lignin. The reaction order found was 1.22 ± 0.12 for steam explosion lignin and 1.19 ± 0.06 for acetosolv lignin. Enzymatic oxidation was realized using sugarcane straw and bagasse and 4 enzyme extracts: apple extract, recovered apple extract, potato extract and commercial enzyme NOVOZYM 51003. The reactions were carried out in phosphate buffer solution 50 mmol L⁻¹ (pH 7.6) and 1,4-dioxane, 3:1 (v/v), in a 30 mL total volume. The medium composition was 300 mg lignin, 15 mL enzyme extract, 0.1% glycerol and 30 mL/min O₂. The reaction kinetics was followed by absorbance measurements at 265, 280 and 320 nm. The model proposed was based on Michaelis-Menten kinetics and it was able to reproduce the experimental data. The consideration of the enzyme kinetics in modeling provided better correlation values than those from other works, which do not consider enzyme kinetics. Formation of α -carbonyl groups, monitored at 280 nm, was generally the reaction that presented the higher rate constant. It was observed that the binom C-ks is important for reaction kinetics; the enzyme reaction that showed the greatest enzyme-substrate affinity was that one responsible for carboxyl groups formation, monitored at 320 nm, for recovered apple extract. Enzymatic oxidation of bagasse lignin presented a different kinetic behavior from straw lignin, providing evidences that there are differences between these two lignins that still remain unclear.

Keywords: Lignin, Mathematical modeling, Chemical oxidation, Enzymatic Oxidation, Kinetics, Vegetal biomass.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Cana-de-açúcar e seus Resíduos	15
2.2	Materiais Lignocelulósicos	16
2.2.1	Celulose	17
2.2.2	Hemiceluloses	18
2.2.3	Lignina	19
2.3	Separação dos Componentes de Materiais Lignocelulósicos	23
2.3.1	Pré-tratamento por explosão a vapor	24
2.3.2	Polpação	24
2.4	Oxidação de Ligninas.....	26
2.4.1	Oxidação química	26
2.4.2	Oxidação enzimática	28
2.5	Cinética de Oxidação	29
2.6	Modelos Cinéticos.....	30
2.6.1	Modelos fenomenológicos	31
2.6.2	Modelos entrada-saída	31
2.6.3	Modelagem da oxidação da lignina	32
2.6.4	Cinética enzimática	34
2.7	Métodos Numéricos.....	35
2.7.1	Método de Runge-Kutta de Quarta Ordem	36
2.7.2	Método de Levenberg-Marquardt	38
2.7.3	Validação de modelos por meio de análise de variância	40
3	OBJETIVOS.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Obtenção da Lignina.....	44
4.1.1	Explosão a vapor	44
4.1.2	Acetosolv	45
4.1.3	Soda - antraquinona	45
4.2	Obtenção dos Extratos Enzimáticos	45
4.2.1	Extrato de maçã	45
4.2.2	Recuperação do extrato de maçã.....	46
4.2.3	Extrato de batata	46
4.2.4	Enzima comercial NOVOZYM 51003	46
4.3	Oxidação Química	46
4.4	Oxidação Enzimática	47

4.5	Análise utilizando a região de UV-visível.....	47
5	MODELAGEM MATEMÁTICA	49
5.1	Oxidação Química	49
5.2	Oxidação Enzimática	50
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6.1	Oxidação Química em Meio Ácido de Lignina de Bagaço de Cana Obtida por Explosão a Vapor	52
6.2	Oxidação Química em Meio Ácido de Lignina de Bagaço de Cana Obtida por Polpação Acetosolv.....	57
6.3	Oxidação Enzimática de Ligninas de Palha de Cana Obtidas por Polpação Soda/Antraquinona.....	62
6.3.1	Oxidação com extrato de maçã (LPSOM)	63
6.3.2	Oxidação com extrato de maçã reutilizado (LPSOMR)	67
6.3.3	Oxidação com extrato de batata (LPSOB)	71
6.4	Oxidação Enzimática de Ligninas de Bagaço de Cana Obtidas por Polpação Soda/Antraquinona.....	80
6.4.1	Oxidação com extrato de maçã (LBSOM)	81
6.4.2	Oxidação com Extrato de Maçã Reutilizado (LBSOMR)	84
7	CONCLUSÕES	89
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar fornece matéria-prima para muitas indústrias como a do papel, açúcar, álcool e bebidas e possui aplicações em potencial em diversos outros setores da indústria.

Nesses processos, após sua moagem, o principal subproduto é o bagaço. Outro subproduto importante é a palha, que não pode mais ser queimada no campo, em virtude da Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar. O bagaço e a palha são materiais lignocelulósicos e são compostos de celulose, hemiceluloses e lignina.

Uma vez que o objetivo das indústrias de polpa é a obtenção da celulose, os demais constituintes são considerados como subprodutos que podem ser utilizados como fonte de energia ou para gerar produtos com maior valor agregado.

O termo biorrefinaria está relacionado à conversão da biomassa em uma gama de produtos, com pouco desperdício e mínimas emissões. É aplicado à indústria que transforma materiais brutos de fonte renovável (bagaço de cana, bambu, palha de cereais, madeira, licor negro kraft, etc.) em produtos de maior valor agregado (combustíveis sólidos e líquidos, materiais, produtos químicos, etc.). Fabricando produtos múltiplos, a biorrefinaria permite maximizar o valor derivado da matéria-prima (COLODETE, 2008).

A lignina representa 20 a 30% do material lignocelulósico e, na indústria de polpação, é utilizada como combustível, devido ao alto poder calorífico de cerca de 30 kJ/g (LORA, 2005). Além da aplicação como combustível na indústria, a lignina possui diversas aplicações mais racionais, promovidas por modificações químicas, gerando produtos com maior valor agregado, como a produção de compensados e surfactantes (CHUM et al., 1985), adesivos (BENAR et al., 1995), formulações de liberação controlada (SILVA et al., 1993; SOUZA et al., 1995; PEREIRA et al., 1995) e modificações químicas para uso como quelantes (COTRIM et al., 1995, GONÇALVES; OVIEDO, 2002).

As principais modificações químicas da lignina são a hidrólise, a hidrogenólise e a oxidação (GOHEEN, 1981). O foco deste trabalho é a oxidação da lignina.

Diversos estudos envolvendo oxidação química e enzimática de ligninas de bagaço e palha já foram desenvolvidos no Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem

Matemática e Simulação (Escola de Engenharia de Lorena – USP) e os resultados foram otimistas.

FERRETTI e GONÇALVES (2002) realizaram estudos cinéticos de oxidação em meio ácido com a lignina de bagaço obtida pelo método de explosão a vapor e por polpação acetosolv. A oxidação foi realizada utilizando-se oxigênio como agente oxidante e, como catalisadores, HBr, acetato de cobalto (II) e acetato de manganês (II). Foi realizada a modelagem cinética considerando o processo como de pseudo-primeira ordem. Para a lignina de bagaço obtida por explosão a vapor, as constantes de velocidade variaram de 0,13 a 0,29 h⁻¹ e a energia de ativação foi de 9328,2 J/mol. Para a lignina Acetosolv, as constantes de velocidade variaram de 0,12 a 0,39 h⁻¹ e os valores de energia de ativação obtidos variaram entre 631 J/mol a 951 J/mol.

NAKANISHI (2007) realizou a oxidação enzimática da lignina de palha obtida por polpação soda-antraquinona. Foi utilizado extrato de batata como fonte de enzimas, uma vez que este é rico em polifenoloxidades. As enzimas foram capazes de oxidar a lignina e a cinética de oxidação foi aproximada para um modelo de pseudo-primeira ordem. As constantes de velocidade variaram de 0,1125 a 0,5087 h⁻¹.

PEREIRA (2008) realizou estudos cinéticos de oxidação de ligninas de bagaço e palha obtidas por polpação soda-antraquinona utilizando extrato de maçã como fonte de enzimas e enzima comercial NOVOZYM 51003. Foi realizado, ainda, um estudo da reutilização do extrato enzimático de maçã. Os resultados mostraram que o extrato foi capaz de oxidar a lignina e que a reutilização do extrato de maçã foi eficiente. A modelagem foi realizada utilizando um modelo cinético de pseudo-primeira ordem, que foi capaz de reproduzir os dados experimentais.

No entanto, tais estudos não forneceram um modelo capaz de descrever o comportamento do processo sob diferentes condições. Nestes trabalhos, foi desenvolvido um modelo para cada condição de reação. Uma vez que o Grupo de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem e Simulação (Escola de Engenharia de Lorena – USP) dispõe de uma quantidade considerável de dados de oxidação de lignina sob diversas condições de oxidação química e enzimática, é possível a estruturação de um modelo que contemple todos esses dados. Assim, o principal objetivo deste trabalho é desenvolver a modelagem fenomenológica do processo de oxidação da lignina visando obter um modelo robusto, capaz de descrever o processo sob diversas condições.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar e seus Resíduos

A cana-de-açúcar se estabeleceu há cerca de 6.000 anos a.C. na Melanésia, Indonésia e Nova Guiné, espalhando-se para o Pacífico Sul, Índia, China e vizinhanças, entre 1.500 a.C. e 1.000 a.C. Posteriormente, disseminou-se para outras regiões do mundo, em especial regiões tropicais e subtropicais. Trata-se de uma planta semiperene com ciclo fotossintético do tipo C4, pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas, composta de espécies de gramas altas perenes, oriundas de regiões temperadas quentes a tropicais da Ásia, especialmente da Índia (OLIVEIRA, 2007).

No Brasil, a cana-de-açúcar é utilizada, principalmente, para obter açúcar e álcool. Estima-se que, na safra de 2008/2009, o Brasil produziu 572 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. O volume representou uma alta de 15,5% em relação à produção total de 2007/2008, que ficou em 495 milhões de toneladas. (UNICA, 2008). Segundo dados da safra 2008/2009, o Brasil produziu aproximadamente 130 milhões de toneladas de resíduos (palha e bagaço de cana).

Atualmente, o bagaço da cana é utilizado como fonte energética dentro da usina. A maioria das usinas é, hoje, auto-suficiente em geração de vapor e energia elétrica por meio da combustão do bagaço e algumas até possuem termoeletricas acopladas, gerando energia adicional para as concessionárias elétricas da região. O bagaço remanescente pode ser utilizado em diversos processos industriais, pela separação da fibra, que é utilizada na fabricação de papéis/móveis, e da medula, que pode ser utilizada na alimentação animal e na produção de furfural (BERTONCINI, 2008).

A palha da cana, deixada na superfície do solo, tem importância na melhoria da sua fertilidade, por meio do retorno dos nutrientes via processo de mineralização, controle de processos erosivos e maior retenção de água, além de propiciar aumento na microbiota do solo (BERTONCINI, 2008). O grande problema da palha de cana é a fuligem liberada no meio ambiente durante a queima da palha no campo, na época da colheita, e pousa no chão na forma de finos blocos escuros. Mais de 70 produtos químicos já foram identificados na fumaça resultante das queimadas, sendo que muitos desses produtos são tóxicos ou têm

ação cancerígena (MORIYA, 2007). Por este motivo, o decreto nº 47.700 sancionado pelo governo de São Paulo, regulamentou a Lei nº 11.241, de 19 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha de cana-de-açúcar sendo que até 2021 toda a área mecanizável terá 100% da queima eliminada e até 2031, toda a área não mecanizável terá 100% da queima eliminada (IMPrensa Oficial, 2003).

A palha da cana, ao invés de ser queimada no campo, pode ser utilizada, juntamente com o bagaço, para a geração de energia na usina. Além do uso nas caldeiras, o bagaço e a palha podem ser utilizados como fonte renovável para a fabricação de polpa celulósica. O bagaço e a palha são materiais lignocelulósicos, constituídos por celulose, polioses e lignina e possuem características químicas semelhantes à madeira em relação aos constituintes, que são identificados em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento (FERRETTI, 2006; FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2 Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos ou biomassas vegetais, como o bagaço e a palha, são constituídos por três principais componentes macromoleculares: celulose, hemiceluloses e lignina e apresentam uma estrutura lamelar, na qual se distribuem seus componentes.

A estrutura da parede celular de uma célula vegetal é subdividida em parede primária (P), parede secundária (S1 e S2) e parede terciária (T). As células encontram-se separadas pela lamela média (LM), que é uma camada fina, composta por elevada concentração de lignina. A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular e a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. Geralmente, a estrutura da parede celular é subdividida em lamela média, parede primária, parede secundária e parede terciária (Figura 1). A distribuição da celulose, das hemiceluloses e da lignina varia consideravelmente entre essas camadas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 1 - Modelo da estrutura da parede celular de traqueídes de madeira mole e de fibras libriformes de madeira dura.
LM = lamela média, P = parede primária, S1 = parede secundária 1, S2 = parede secundária 2, T = parede terciária
(adaptada de FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2.1 Celulose

A celulose é um polímero linear constituído de unidades de glicose ligadas por ligações éter do tipo $\beta(1-4)$, que são formadas por meio da liberação de uma molécula de água a partir das hidroxilas dos carbonos 1 e 4 de duas unidades de glicose. A unidade repetitiva do polímero é a celobiose, mostrada na figura 2

Figura 2 – Estrutura de um fragmento de celulose (FENGEL e WEGENER, 1989)

Devido à linearidade das cadeias, as moléculas adjacentes formam uma rede de agregados (microfibrilas) insolúveis em água, com comprimento e largura variados. As microfibrilas apresentam regiões cristalinas e amorfas (FENGEL; WEGENER, 1989). As ligações de hidrogênio inter e intramoleculares são responsáveis pela manutenção das

regiões cristalinas e tornam a celulose resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD; SADDLER, 1988; CONVERSE; WARE, 1994). FENGEL e WEGENER (1989) sugeriram que as fibrilas elementares estão separadas umas das outras por uma camada de polioses, formando uma estrutura de, aproximadamente, 25nm envolvidas em uma matriz de lignina.

Figura 3 - Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina (ZHANG, 2008).

2.2.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, são depositadas na parede das células em um estágio anterior à lignina (FENGEL; WEGENER, 1989). As polioses, ao contrário da celulose, são amorfas e compostas por vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses), que formam polímeros de cadeia mais curta e, em alguns casos, ramificada (FENGEL; WEGENER, 1989). As hemiceluloses são classificadas basicamente de acordo com os carboidratos presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, mananas, glucanas, galactanas e pectinas. A representação esquemática de uma xilana típica de gramíneas está representada na Figura 4.

Figura 4 - Representação de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes. Xyl = D-xilopiranosose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4-O-metil)-D-glicopiranurônico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFA = ácido desidroferúlico (McDOUGALL et al., 1993).

2.2.3 Lignina

A palavra lignina vem do latim *lignum*, que significa madeira. Trata-se de um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, ocorrendo em vegetais e tecidos vasculares. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microorganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não são lignificados (FENGEL; WEGENER, 1984).

Em estudos realizados há aproximadamente 150 anos, foi possível verificar o interesse científico e econômico sobre a lignina, concluindo-se que a lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa, e faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais (SALIBA et al., 2000).

Apesar de todos os estudos realizados até hoje sobre lignina, muitos pontos, relativos principalmente à sua estrutura, permanecem em dúvida. Isto decorre da grande diversidade da estrutura das ligninas quando se passa de uma espécie vegetal para outra ou, até mesmo, dentro da mesma espécie, quando são analisadas partes diferentes do vegetal. Podem-se observar em eucaliptos cultivados na Europa ou no Brasil diferenças na

constituição de suas ligninas, devidas, principalmente, às diferentes condições de solo e de clima. A lignina é uma macromolécula de constituição difícil de ser estabelecida, por causa não somente da complexidade de sua formação, baseada em unidades fenilpropanóides interligadas por diferentes tipos de ligações, como também porque sofre modificações estruturais durante seu isolamento das paredes celulares (MORAIS 1987, 1992).

A lignina é formada por meio da polimerização radicalar dos alcoóis p-cumarílico, coniferílico e sinapílico (Figura 5), biossintetizados a partir do ácido xiquímico. A biossíntese se processa conforme ilustra a Figura 7. A figura 6 mostra estruturas de ressonância para o radical fenóxi formado a partir do álcool coniferílico pela abstração enzimática de um próton e um elétron. O acoplamento posterior se dá de forma aleatória, sem controle enzimático. Como o acoplamento pode se dar em diversos pontos da molécula, há a formação de vários tipos de ligações entre essas estruturas (FENGEL; WEGENER, 1989). Isto confere uma estrutura aleatória e bastante reticulada para a macromolécula de lignina, conforme pode ser visto na figura 8.

Figura 5 – Unidades de fenilpropano precursoras da lignina

Figura 6 – Estruturas de ressonância para o radical fenóxi formado a partir do álcool coniferílico

Figura 7 – Via metabólica de síntese dos precursores da lignina a partir da glicose. Adaptada de FENGEL; WEGENER (1989)

Figura 8 – Estrutura da lignina de abeto proposta por Adler (FENGEL e WEGENER, 1989)

A estrutura química da lignina é bastante complexa e ainda não conhecida completamente. A proporção entre os diversos precursores varia entre as diferentes espécies de plantas e a razão entre eles tem sido usada para fins taxonômicos (SILVA, 1995). As ligninas de madeiras duras apresentam, em sua composição, além de grupos guaiacil, proporções mais altas de grupos siringil, enquanto as ligninas de madeiras moles são mais ricas em grupos guaiacil. As ligninas de gramíneas, tais como de bagaço de cana e bambu, apresentam grupos p-cumaril, além de grupos siringil e guaiacil (FAIX, 1991, 1992; FENGEL; WEGENER, 1989).

As interações entre a lignina, a celulose e as polioses determinam a ultraestrutura da parede celular dos materiais lignocelulósicos (SILVA, 1995).

2.3 Separação dos Componentes de Materiais Lignocelulósicos

Independente do uso dessas frações é necessário um processamento preliminar para separá-las, em particular a lignina, que pode ser considerada a principal barreira física que torna as fibras desses materiais cimentadas entre si (SAAD, 2010). A separação dos principais componentes macromoleculares do bagaço poderia levar parte desse resíduo para a produção de compostos químicos, como açúcares, álcoois, ácidos orgânicos, furfural, fenóis e outros compostos aromáticos, de valor econômico maior que o da biomassa bruta, os quais poderiam ser obtidos através de processos químicos, bioquímicos, físicos ou combinações entre estes, como mostra a tabela 1 (CAPEK-MÉNARD et al., 1992).

Tabela 1 - Diversos métodos de pré-tratamento da biomassa vegetal para a separação dos componentes. Adaptado de Saddler et al., 1993.

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Combinados
Vapor	Ozonólise	Pré-tratamento por fungos	Explosão a vapor
Radiação	Hidrólise com ácido diluído (H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ , H ₃ PO ₄)	Pré-tratamento Bioorganossolv (tratado com <i>Ceriporiopsis subvermispota</i> seguido de etanólise)	Hidrotérmico
Moinho de bola	Hidrólise com ácido concentrado (H ₂ SO ₄)		SO ₂ e vapor
Moinho do tipo Martelo	Ácido Acético		NO ₂ e irradiação
Barra giratória	Hidrólise alcalina (NaOH, Ca(OH) ₂)		Alcalino e moinho de bolas
Umidificação	Amônia		Amônia e vapor (AFEX)
Água quente	SO ₂		Explosão com CO ₂
Pirólise	Deslignificação oxidativa		
Processo Organossolv			

2.3.1 Pré-tratamento por explosão a vapor

O processo de explosão a vapor foi primeiramente desenvolvido por MASON (1926) e posteriormente por BABCOCK (1932), duas patentes pioneiras na área. MASON (1926) descreveu na sua patente um equipamento conhecido atualmente como “pistola de Mason”. Este equipamento permite o contato de um vapor saturado com cavacos ou raspas de madeira em um curto intervalo de tempo seguido de uma rápida descompressão. BABCOCK (1932) demonstrou que esse equipamento também pode ser utilizado para a extração de açúcares fermentescíveis.

Atualmente, o processo de explosão a vapor tem sido considerado um processo tecnicamente e economicamente viável no pré-tratamento de biomassa para a produção de insumos químicos, combustíveis, alimentos e polímeros (BALLESTEROS et al., 2006). A explosão a vapor permite a recuperação de grande parte dos componentes dos materiais lignocelulósicos, minimizando a sua degradação (AVELLAR; GLASSER, 1998). Além do efeito de desestruturação das fibras, a técnica de explosão a vapor também provoca a ruptura das ligações químicas dos componentes da biomassa. Isto ocorre devido à temperatura elevada do meio, superando a energia de ativação das reações (SILVA, 1995). O pré-tratamento por explosão a vapor provou ser uma técnica efetiva para uma grande variedade de materiais lignocelulósicos, incluindo madeiras dura, mole e gramíneas (SAAD, 2010).

2.3.2 Polpação

A polpação é um dos processos de separação dos constituintes dos materiais lignocelulósicos, e tem por objetivo remover a lignina sem degradar a cadeia celulósica, que deve apresentar propriedades adequadas a sua posterior utilização.

Existem vários métodos utilizados para a remoção de lignina das biomassas vegetais, e dentre eles estão a polpação soda, polpação soda-antraquinona, polpação sulfito, polpação kraft e polpação organosolv (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Uma das características principais do processo kraft é a alta qualidade da celulose obtida. Essa qualidade é avaliada basicamente pelo teor de lignina residual (número kappa), grau de

degradação dos carboidratos e propriedades físico-mecânicas. Porém, essas características podem sofrer alterações de acordo com algumas variáveis do processo como carga alcalina, tempo e temperatura de deslignificação, entre outros (SILVA, 1994).

O odor é um dos principais problemas ambientais de fábricas de celulose. O processo kraft apresenta emissões aéreas poluentes que incluem tanto gases mal-cheirosos, como material particulado. Segundo SILVA (1994), o melhor método de eliminação dos compostos malcheirosos seria a completa remoção dos compostos de enxofre do processo kraft, o que o transformaria no processo soda.

O processo soda apresenta a desvantagem de baixos rendimentos e qualidade inferior da polpa celulósica em relação ao processo kraft. Essas desvantagens são atribuídas ao tempo de deslignificação excessivamente longo, às altas temperaturas e às altas concentrações de soda necessárias para a produção de polpas que possam ser branqueadas. Porém, esse processo seria uma solução de substituição ao kraft, caso conseguissem melhorias na taxa de deslignificação, no rendimento e na qualidade da polpa. A antraquinona, em adição ao processo soda e em condições otimizadas de deslignificação, tem se mostrado como uma realidade para tais finalidades (GOMIDE; OLIVEIRA, 1979).

Segundo GOMIDE e OLIVEIRA (1979), as reações da antraquinona durante o processo soda consistem basicamente na oxidação dos polissacarídeos da madeira e na hidrólise de ligações éteres da lignina. A antraquinona causa a oxidação do grupo redutor dos carboidratos, estabilizando-os em relação às reações de despolimerização terminal. Essa estabilização resulta em proteção destes contra reações de degradação e solubilização, consequentemente, causando um aumento no rendimento.

Um processo de polpação que tem sido muito estudado é a polpação organosolv, processo alternativo que utiliza solvente orgânico/água. Os processos de polpação organosolv têm recebido uma atenção significativa nos últimos 30 anos, sendo estudados como uma alternativa aos processos químicos convencionais de obtenção de polpa celulósica (SHATALOV; PEREIRA, 2005).

Na deslignificação organosolv, utilizam-se solventes classificados distintamente em solventes de baixo e alto ponto de ebulição. Com os solventes de alto ponto de ebulição, podem ser realizadas deslignificações a temperaturas iguais ou inferiores à de refluxo, sem a necessidade de pressão. Incluem-se nesta classe o ácido acético (polpação acetosolv), ácido fórmico e glicóis.

A dissolução da lignina nos processos organosolv é resultado da hidrólise de ligações do tipo éter, como as ligações α -O-4 e β -O-4 da macromolécula de lignina (SARKANEN, 1990). A deslignificação organosolv compreende ainda quebra de ligações éter entre os carboidratos e átomos de carbono α das cadeias laterais de lignina (McDONOUGH, 1993). As ligninas obtidas por esse processo têm a vantagem de serem isoladas do licor de polpação por procedimentos simples, como precipitação e filtração e serem obtidas livres de compostos de enxofre (BENAR, 1992).

2.4 Oxidação de Ligninas

Além da utilização na produção de energia, devido ao seu alto poder calorífico, a lignina possui diversas aplicações mais racionais, promovidas por modificações químicas, gerando produtos com maior valor agregado, como adesivos (BENAR et al., 1995), formulações de liberação controlada (SILVA et al., 1993; SOUZA et al., 1995) e modificações químicas para uso como quelantes (COTRIM et al., 1995, GONÇALVES; OVIEDO, 2002).

A oxidação da lignina pode ser tanto química como enzimática. Neste trabalho, foram estudadas oxidações químicas utilizando oxigênio como agente oxidante e catalisadores cobalto (II) e manganês (II) em meio ácido acético e oxidações enzimáticas utilizando polifenoloxidasas obtidas de extrato de maçã, batata e enzima comercial NOVOZYM 51003.

2.4.1 Oxidação química

A lignina pode ser oxidada por meio de reações em meio ácido ou meio alcalino (GONÇALVES et al., 2001). A oxidação de lignina em meio alcalino é muito bem explorada, podendo ser realizada de diversas formas:

- Oxidação com oxigênio como agente oxidante e sais de cobre (II) e cobalto (II) como catalisadores (VILLAR et al., 2001);

- Oxidação com nitrobenzeno e cobre como oxidantes (VILLAR et al., 1997);
- Oxidação com peróxido de hidrogênio alcalino (KADLA et al. 1999);
- Oxidação com ar atmosférico e paládio em gama-alumínio como catalisador (SALES et al., 2004).

Métodos de oxidação da lignina em meio ácido empregam principalmente o sistema Amoco, utilizado na auto-oxidação de alquilbenzenos para aldeídos e ácidos carboxílicos, catalisadas por metais como cobre e manganês (SHELDON et al., 1981). A reação se processa via transferência inicial de 1 elétron do substrato para o catalisador metálico e concomitante formação de um intermediário cátion radical, como mostrado genericamente no esquema da Figura 9.

Figura 9 – Mecanismo genérico da reação de oxidação de alquilbenzenos catalisada por metais

A facilidade de transferência de um elétron está diretamente relacionada ao potencial de ionização dos hidrocarbonetos aromáticos, sendo que substituintes doadores de elétrons tais como metoxil abaixam o potencial de oxidação de ligninas dissolvidas em ácido acético (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina oxidada é um composto orgânico que possui uma grande quantidade de grupos funcionais com alta densidade eletrônica, tais como ácidos carboxílicos e compostos carbonilados, grupos hidroxilados e anéis aromáticos, apresentando as propriedades necessárias para ser usada como agente quelante. Além desses grupos, aminas e tióis são também muito importantes, pois, no conjunto, apresentam átomos coordenantes de íons metálicos como o oxigênio, nitrogênio e enxofre (GECKELER et. al., 1980; GECKELER et. al., 1988; GECKELER; VOLCHEK, 1996).

Agentes quelantes são substâncias que provocam a formação de compostos anelares através da coordenação de sítios presentes na molécula dessa substância com íons metálicos ou átomos de metal (Figura 10).

Figura 10 – Estrutura esquemática da complexação Lignina-Cobre (GONÇALVES et al., 2005)

Nos últimos anos, estes agentes quelantes têm sido extensamente estudados visando aplicações tecnológicas, devido a seu comportamento como sequestrante de íons metálicos presentes em solução aquosa. (LEVINE, 1986; GECKELER; VOLCHEK, 1996).

Através de técnicas como precipitação e floculação, é possível a utilização desses sequestrantes na descontaminação de certos efluentes contendo metais pesados, como Hg^{+2} , Pb^{+2} , Cd^{+2} e Cu^{+2} . Além disso, podem ser utilizados na recuperação e reaproveitamento de íons metálicos mais nobres.

2.4.2 Oxidação enzimática

As enzimas utilizadas neste trabalho são polifenoloxidasas – enzimas da família das oxidoredutases que possuem íons cobre em seu sítio catalítico. Essas enzimas não precisam de qualquer outro componente celular para trabalhar, facilitando seu uso (TORRES et al., 2003). Esse grupo de enzimas pode ser dividido em duas subclasses: as tirosinases e as lacases. Ambas necessitam de oxigênio bimolecular para sua ativação (GUERRA, 1998).

As tirosinases são produzidas por diversos tipos de organismos, tais como fungos, bactérias e plantas superiores, encontrando-se ligada à membrana externa das células ou solúvel dentro do complexo celular.

Essas enzimas têm duas atividades, denominadas cresolase e catecolase. A primeira catalisa a reação de inserção de um oxigênio na posição orto em relação à hidroxila

existente no fenol e a segunda catalisa a reação de oxidação de o-difenóis à respectiva quinona (Figura 11).

Figura 11 – Oxidação de fenóis por tirosinases (SOTO-OVIEDO, 1998).

As lacases são produzidas por fungos e podem catalisar a oxidação de compostos fenólicos para sua correspondente forma de radical livre, que é altamente reativo, possibilitando assim a entrada de moléculas de oxigênio (Figura 12).

Figura 12 – Oxidação de fenóis por lacases (GUERRA, 1998).

Verificou-se que as enzimas polifenoloxidasas perdem pouca atividade enzimática em uma mistura de dioxano e tampão fosfato (75% da atividade é mantida) como foi estudado por D'ACUNZO (2004).

Neste trabalho serão utilizadas polifenoloxidasas extraídas de batata e maçã e uma polifenoloxidase comercial, NOVOZYM 51003, obtida a partir de extratos de fungo.

2.5 Cinética de Oxidação

A cinética química está no âmago da produção de quase todos os produtos químicos industriais. Estudar a velocidade das reações, bem como os fatores limitantes, permite entender a natureza da reação e buscar condições ótimas para que a reação se processe (FOGLER, 2002). A seleção de um sistema de reação que opere da forma mais segura e eficiente pode ser a chave para o sucesso ou o fracasso econômico de uma instalação química (LEVENSPIEL, 2000).

As conclusões obtidas a partir do estudo da cinética da reação permitem que sejam escolhidas as operações unitárias do processo, os parâmetros de funcionamento dos equipamentos envolvidos e a determinação das variáveis de processo, de modo que se obtenha maior rendimento do produto desejado e mínimas perdas (CREMASCO 2008).

A cinética de oxidação da lignina com oxigênio molecular pode ser estudada pelo monitoramento da extensão da reação, utilizando-se técnicas espectroscópicas de análise, como FTIR (FAIX et al., 1992) ou UV-visível. Devido à sua natureza aromática, a lignina absorve fortemente na região do ultravioleta, sendo os espectros de diferentes preparações geralmente bastante semelhantes. Cada comprimento de onda está associado a uma estrutura típica na macromolécula de lignina e pode ter seu valor de absorbância aumentado pela inserção de determinados tipos de grupos funcionais. O aumento na absorbância em 265nm corresponde, provavelmente, à inserção de grupos propenol ($-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{OH}$) na estrutura da lignina; em 280nm, típica das unidades p-propilfenílicas, corresponde à inserção de grupos α -carbonílicos ($-\text{COCH}_2\text{CH}_3$) e, em 320nm, corresponde à inserção de grupos carboxílicos ($-\text{CH}=\text{CHCOOH}$) na estrutura da lignina (GOLDSCHMIDT, 1971).

2.6 Modelos Cinéticos

A modelagem matemática é uma ferramenta bastante útil na execução de estudos cinéticos. Por meio de balanços de massa e equações matemáticas empíricas, é possível determinar os parâmetros cinéticos da reação, bem como, equações que descrevam o comportamento da reação ao longo do tempo (FOGLER, 2002).

O objetivo principal da modelagem matemática e simulação, como ferramenta do desenvolvimento tecnológico de processos químicos, é prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, possibilitando a determinação das condições operacionais economicamente ótimas do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de algoritmos de controle, no qual o modelo matemático formulado passa a ser parte integrante do mesmo (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Na modelagem cinética de processos químicos, podem ser utilizados, principalmente, dois tipos de modelos:

- Modelos Fenomenológicos
- Modelos Entrada-Saída

2.6.1 Modelos fenomenológicos

Modelos fenomenológicos são baseados na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas para explicar o comportamento das variáveis do processo e os fenômenos observados experimentalmente (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Um modelo fenomenológico é constituído por um conjunto de relações matemáticas entre as variáveis de interesse do sistema em estudo. É desejável que os modelos sejam, na medida do possível, fundamentais, ou seja, baseados nas equações de conservação de massa, energia e quantidade de movimento e em princípios físico-químicos, uma vez que isto confere maior confiança em interpolações e extrapolações, quando comparados com modelos puramente empíricos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Entretanto, mesmo em modelos fundamentais, é freqüente que o cálculo de um ou mais parâmetros seja baseado em equações empíricas.

2.6.2 Modelos entrada-saída

Modelos entrada-saída estabelecem relações empíricas para correlacionar o efeito das variações nas variáveis de entrada nos valores das variáveis de saída ou medidas do processo. O principal exemplo de modelos entrada-saída, muito estudado para representar sistemas complexos, são as redes neurais (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). As redes neurais artificiais têm uma estrutura análoga ao funcionamento do cérebro humano, sendo que a síntese das informações é feita por uma ponderação dos diversos sinais, através de ajustes de coeficientes e uma posterior transformação não linear, comumente do tipo sigmóide (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Por exigirem um esforço matemático-computacional bastante grande, o seu uso fica limitado a estudos em que são medidas

diversas variáveis de entrada e o comportamento de todas essas variáveis é importante para o processo.

2.6.3 Modelagem da oxidação da lignina

Em razão da complexidade do processo real, somada às limitações matemáticas, os modelos são baseados, geralmente, na idealidade e, em geral, fornecem uma representação fiel das propriedades do processo. A formulação de um modelo matemático deve possuir um comprometimento entre grau de complexidade razoável e solução (esforço computacional) economicamente desejável. Por sua vez, a simulação do processo corresponde à sua análise através da utilização do modelo proposto (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Por este motivo, neste trabalho, optou-se pela utilização de modelos fenomenológicos na descrição das oxidações, uma vez que, nos trabalhos utilizados para a modelagem, foi avaliada apenas a absorbância da amostra ao invés de diferentes variáveis do processo.

A modelagem fenomenológica é baseada no balanço de massa e energia descrito pela equação de continuidade molar, que é descrita da seguinte maneira

$$\frac{dC_A}{dt} + \vec{\nabla} \cdot \vec{N}_A = R_A''' \quad \text{Equação (1)}$$

Nesta equação, o primeiro termo representa a variação da concentração da substância analisada ao longo do tempo de reação, o segundo termo representa o fluxo absoluto molar, geralmente associado à difusão e o terceiro termo, R_A''' representa o termo reacional molar de produção ou consumo da espécie analisada (CREMASCO, 2008).

Quando a difusão não é um fator determinante na velocidade da reação, o termo $\vec{\nabla} \cdot \vec{N}_A$ é considerado nulo (CREMASCO, 2008; FOGLER, 2002) e a equação de continuidade fica:

$$\frac{dC_A}{dt} = R_A''' \quad \text{Equação (2)}$$

A equação (2) é a equação fundamental da modelagem cinética e será utilizada, neste trabalho, para avaliação da cinética de oxidação química da lignina sob diferentes condições, com as devidas modificações e considerações que serão apresentadas no capítulo 4.

FERRETTI e GONÇALVES (2002) realizaram a modelagem da oxidação em meio ácido com a lignina de bagaço obtida por explosão a vapor e por polpação acetosolv. O estudo foi realizando considerando que o termo R_A''' da equação (2) apresenta cinética de pseudoprimeira ordem ($R_A''' = kC_A$) e os modelos cinéticos propostos forneceram boas correlações com os dados experimentais. Com a oxidação da lignina de bagaço de explosão a vapor, as constantes de velocidade variaram de 0,13 a 0,29 h⁻¹ e a energia de ativação foi de 9328,2 J/mol. Para a lignina Acetosolv, as constantes de velocidade variaram de 0,12 a 0,39 h⁻¹ e os valores de energia de ativação obtidos variaram entre 631 J/mol a 951 J/mol.

GONÇALVES e SCHUCHARDT (1999) realizaram estudos cinéticos de 4 ligninas obtidas de polpação acetosolv em ácido acético para obter vanilina, ácido vanílico e lignina oxidada, utilizando um fluxo de oxigênio e HBr, acetato de cobalto (II) e acetato de manganês (II) como catalisadores. Foram obtidos baixos valores de rendimento para vanilina e ácido vanílico, evidenciando que a lignina acetosolv é reticulada. No entanto, ocorreu um acréscimo nos grupos carbonila e hidroxila em comparação com a lignina original, fato evidenciado por meio de espectroscopia de infravermelho, indicando a oxidação da lignina estudada.

FERRETTI (2006) realizou a oxidação da lignina de palha de cana de açúcar obtida do licor de polpação etanol/água utilizando o sistema Co/Mn/Br em ácido acético com fluxo de oxigênio. As ligninas que foram obtidas dos licores de polpação que possuíam maiores valores de número kappa apresentaram as menores energias de ativação. Observou-se também que a temperatura teve maior influência que o tempo nas reações de oxidação.

2.6.4 Cinética enzimática

A velocidade de uma reação enzimática é influenciada por diversos fatores, tais como pH, temperatura, pressão, concentração de substrato, concentração de produto, presença de inibidores, concentração de enzimas, entre outros (SEGEL, 1979). Considerando que, normalmente, os reatores enzimáticos, operam em condições controladas de temperatura, pressão e pH, a modelagem cinética desenvolvida nesse trabalho leva em consideração o substrato, o produto formado e as constantes cinéticas envolvidas.

Uma vez que, nos trabalhos utilizados para a modelagem, só foi avaliada a absorbância da amostra, o modelo escolhido para a avaliação da cinética enzimática foi o de Michaelis-Menten.

O esquema mais simples empregado para explicar o mecanismo de uma reação enzimática é aquele no qual um substrato (S), por meio de uma etapa intermediária, forma um complexo enzima-substrato (ES), o qual é, posteriormente, transformado em produto (P), de acordo com o seguinte esquema (SEGEL, 1919):

onde k_1 , k_{-1} e k_p são as constantes cinéticas das reações indicadas pelas respectivas setas.

Considerando a hipótese de equilíbrio rápido (SEGEL, 1979), segundo a qual E, S e ES alcançam o equilíbrio em uma velocidade muito maior do que ES se transforma em E+P (etapa controladora da reação), a velocidade de reação (v) pode ser calculada pela seguinte equação:

$$v = k_p[ES] \quad \text{Equação (3)}$$

onde ES é a concentração do complexo enzima-substrato.

A concentração total de enzimas E_T é dada por:

$$E_T = E_l + ES \quad \text{Equação (4)}$$

onde E_l é a concentração de enzimas na forma livre.

Dividindo a Equação 1 por E_T , obtém-se:

$$\frac{v}{[E_T]} = \frac{k_p[ES]}{[E_l] + [ES]} \quad \text{Equação (5)}$$

Considerando K como sendo a constante de dissociação do complexo ES:

$$K = \frac{[E_l][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{Equação (6)}$$

A velocidade máxima de reação ($v_{\max}$) será observada quando toda a enzima estiver presente sobre a forma ES. Assim, nestas condições tem-se:

$$ES = E_T \quad \text{Equação (7)}$$

$$v_{\max} = k_p[ES] = k_p[E_T] \quad \text{Equação (8)}$$

Considerando as Equações (6) e (8) e, desenvolvendo a Equação 3, obtém-se a Equação (9), que é a equação de Michaelis-Menten (SEGEL, 1979).

$$v = \frac{v_{\max}[S]}{K + [S]} \quad \text{Equação (9)}$$

2.7 Métodos Numéricos

Os modelos cinéticos apresentam-se, geralmente, sob a forma de equações diferenciais ordinárias (EDO) ou parciais (EDP). Para o seu desenvolvimento, é necessário que seja efetuada a integração dessas equações. A técnica de integração analítica só é aplicável para casos em que o modelo matemático é bastante simples (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Na maioria das vezes, faz-se necessária a aplicação de técnicas de integração numérica, que requerem a utilização de um ou mais métodos matemáticos. Dentre os métodos de integração numérica, o método de Runge-Kutta de quarta ordem é o mais utilizado, pois este método é duas ordens de grandeza mais preciso que o método de Euler (BOYCE; DIPRIMA, 2006).

O ajuste dos parâmetros do modelo recai, na maioria das vezes, em problema de regressão não-linear, envolvendo o uso de métodos numéricos de minimização da função

objetivo através de procedimentos iterativos (YANG et al., 1987). No caso do ajuste de parâmetros, a função objetivo a ser minimizada reflete o resíduo calculado entre os valores experimentais e os valores simulados das variáveis de estado. Dentre os métodos de determinação de parâmetros, o método de Levenberg-Marquardt é bastante empregado no ajuste de parâmetros pela sua alta eficiência computacional (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

2.7.1 Método de Runge-Kutta de Quarta Ordem

O método de Runge-Kutta é um método iterativo utilizado para resolver problemas de valor inicial do tipo:

$$y' = f(t, y) \quad \text{Equação (10)}$$

$$y(t_0) = y_0 \quad \text{Equação (11)}$$

A fórmula de Runge-Kutta envolve uma média ponderada de valores de $f(t, y)$ em pontos diferentes no intervalo $t_n \leq t \leq t_{n+1}$ e é dada por:

$$y_{n+1} = y_n + h \left(\frac{k_{n1} + 2k_{n2} + 2k_{n3} + k_{n4}}{6} \right) \quad \text{Equação (12)}$$

Onde h é o passo de integração e

$$k_{n1} = f(t_n, y_n) \quad \text{Equação (13)}$$

$$k_{n2} = f\left(t_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}hk_{n1}\right) \quad \text{Equação (14)}$$

$$k_{n3} = f\left(t_n + \frac{1}{2}h, y_n + \frac{1}{2}hk_{n2}\right) \quad \text{Equação (15)}$$

$$k_{n4} = f(t_n + h, y_n + hk_{n3}) \quad \text{Equação (16)}$$

A soma $(k_{n1} + 2k_{n2} + 2k_{n3} + k_{n4})/6$ também pode ser interpretada como um coeficiente angular médio. k_{n1} é o coeficiente angular no extremo esquerdo do intervalo, k_{n2} é o coeficiente angular no ponto médio usando-se a fórmula de Euler para ir de t_n até $t_n + \frac{1}{2}h$, k_{n3} é a segunda aproximação do coeficiente angular no ponto médio e k_{n4} é o coeficiente angular em $t_n + h$ usando a fórmula de Euler e o coeficiente angular k_{n3} para ir de t_n até $t_n + h$.

A utilização da equação (12) faz com que o erro de truncamento local é proporcional a h^5 , o que torna o método de Runge-Kutta 2 ordens de grandeza mais preciso que o método de Euler aprimorado e 3 ordens de grandeza mais preciso que o método de Euler (BOYCE; DIPRIMA, 2006). É um método que não exige grandes esforços computacionais e é suficientemente preciso para tratar muitos problemas de maneira eficiente (BOYCE; DIPRIMA, 2006).

Geralmente, a integração numérica pelo método de Runge-Kutta se processa de acordo com o algoritmo mostrado na figura X. Implementações específicas desse método estão amplamente disponíveis em pacotes comerciais de programas para computadores (BOYCE e DIPRIMA, 2006)

Figura 13 – Algoritmo utilizado para integração numérica pelo método de Runge Kutta

2.7.2 Método de Levenberg-Marquardt

O método de Levenberg-Marquardt ou algoritmo de Levenberg-Marquardt (LEVENBERG, 1944; MARQUARDT, 1963) é utilizado para resolução de problemas de mínimos quadrados. Problemas de mínimos quadrados têm como objetivo encontrar o melhor ajuste para um conjunto de dados de tal modo que a soma dos quadrados das

distâncias (tomadas na vertical) entre o modelo (curva ajustada) e cada um dos pontos dados seja a menor possível. Essas diferenças entre a curva ajustada e cada um dos dados são denominadas resíduos (MADSEN et al., 2004).

Dado um conjunto de m dados empíricos (x_i, y_i) , o método de Levenberg-Marquardt otimiza os parâmetros β de uma função $f(x, \beta)$, de modo que a soma dos quadrados dos resíduos, dada pela equação (17), seja mínima.

$$S(\beta) = \sum_{i=1}^m [y_i - f(x_i, \beta)]^2 \quad \text{Equação (17)}$$

No início, o usuário deve fornecer uma estimativa inicial par o vetor de parâmetros β . Em alguns casos, quando a estimativa inicial está muito distante do valor real do parâmetro, o método diverge.

A cada passo de iteração, o vetor de parâmetros β é substituído por outra estimativa, $\beta + \delta$. O parâmetro δ é chamado de direção do passo e é determinado segundo a linearização da função $f(x_i, \beta + \delta)$ aproximada pela equação (18):

$$f(x_i, \beta + \delta) \approx f(x_i, \beta) + J_i \delta \quad \text{Equação (18)}$$

Onde J_i representa a inclinação de f em relação a β e é dada pela equação (19)

$$J_i = \frac{\partial f(x_i, \beta)}{\partial \beta} \quad \text{Equação (19)}$$

No ponto em que a soma dos quadrados dos desvios, $S(\beta)$, atinge seu valor mínimo, o gradiente de S em relação a δ se torna nulo (NOCEDAL et al., 2006) e a estimativa de $S(\beta + \delta)$ pode ser dada pela aproximação dada pela Equação (20). A Equação (20) representa a substituição da equação (18) na equação (17):

$$S(\beta + \delta) \approx \sum_{i=1}^m [y_i - f(x_i, \beta) - J_i \delta]^2 \quad \text{Equação (20)}$$

Uma vez que se tem um vetor de parâmetros β , a equação (20) pode ser escrita na forma vetorial e fica

$$S(\beta + \delta) \approx ||y - f(\beta) - J\delta||^2 \quad \text{Equação (21)}$$

Como o objetivo é minimizar a Equação (21), toma-se a derivada em relação a δ igualada a zero e, após exaustivos passos matemáticos, obtém-se:

$$(J^T J)\delta \approx J^T [y - f(\beta)] \quad \text{Equação (22)}$$

Onde J é a matriz Jacobiana, isto é, a matriz que contém as derivadas parciais de primeira ordem de cada componente da função vetorial f.

Não é garantido que exista a inversa dessa matriz, necessária para o cálculo de δ (MADSEN et al., 2004). Para contornar essa situação, o método de Levenberg-Marquardt propõe somar uma parcela μI à matriz Jacobiana, onde μ é um escalar denominado parâmetro de *damping* e I é a matriz identidade. Com essa modificação, a direção do passo pode ser calculada da seguinte maneira:

$$(J^T J + \mu I)\delta \approx -J^T [y - f(\beta)] \quad \text{Equação (23)}$$

O parâmetro μ exerce influência tanto na direção quanto no tamanho do passo, permitindo assim que o método não necessite de uma busca linear para descobrir o tamanho ótimo do passo a ser dado em cada iteração (MADSEN et al., 2004).

2.7.3 Validação de modelos por meio de análise de variância

A validade do modelo e a significância estatística da curva ajustada podem ser testadas por meio da Análise de Variância, cujos elementos estão reunidos na tabela 2. As expressões mostradas nessa tabela se aplicam ao ajuste, por mínimos quadrados, de um modelo geral com p parâmetros (PIMENTEL; BARROS NETO, 1995). Cada resposta individual é identificada com dois índices: i, que indica o nível da variável independente e j, que distingue as repetições feitas em cada nível.

Tabela 2 – Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados. n_i = número de repetições no nível i , m = número de níveis distintos da variável x , n = número total de medidas, p = número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j=1$ até $j=n_i$. Os outros somatórios vão de $i=1$ até $i=m$. y_m é a média de todos os valores de y , y_{im} é a média das determinações repetidas no nível i (PIMENTE; BARROS NETO, 1995).

Fonte	Soma Quadrática	G.L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	$p-1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	$n-p$	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	$m-p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum [y_{ij} - y_{im}]^2$	$n-m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$
Total	$SQ_T = \sum \sum [y_{ij} - y_m]^2$	$n-1$	

O ponto de partida da análise de variância é a decomposição da soma quadrática dos desvios de todas as observações em relação à média, SQ_t , em duas parcelas, SQ_{reg} e SQ_r :

$$SQ_T = SQ_{reg} + SQ_r \quad \text{Equação (24)}$$

O termo SQ_r nada mais é que a soma quadrática dos resíduos deixado pelo modelo. O termo SQ_{reg} é calculado a partir dos valores estimados pelo modelo e representa a parcela da variação das observações em torno da média global que o modelo consegue reproduzir.

É possível perceber que uma boa maneira de avaliar a qualidade do modelo seria comparar a soma quadrática explicada pelo modelo com a soma quadrática residual. Quanto maior fosse o valor de SQ_{reg} em relação ao valor de SQ_r , melhor seria o modelo (PIMENTEL; BARROS NETO, 1995). É um fato da matemática, porém, que quanto maior o número de termos de um modelo, maior a variação que ele consegue explicar. Se apenas isso fosse importante, o melhor seria automaticamente o que tivesse a equação mais longa. Acontece que há um outro aspecto a ser considerado: cada termo acrescentado tira do modelo um grau de liberdade, e o número de graus de liberdade sempre precisa ser levado em conta nos argumentos estatísticos. Em cada caso é preciso avaliar se o grau de liberdade retirado por um termo adicional é compensado pelo aumento na quantidade de

variação que passou a ser explicada pelo modelo. A maneira de fazer isto é comparar não as somas quadráticas, mas as médias quadráticas que são obtidas dividindo-se essas somas por seus graus de liberdade, cujas somas são dadas na última coluna da tabela 2. Quanto maior o valor da razão MQ_{reg}/MQ_r , melhor será o modelo (PIMENTEL; BARROS NETO, 1995).

A razão MQ_{reg}/MQ_r é chamada de estatística F ou fator estatístico F. Há valores tabelados para distribuições de F sob diversos níveis de confiança e graus de liberdade. Uma vez que o F calculado seja maior que o valor tabelado para os mesmos graus de liberdade, a qualidade do ajuste é estatisticamente satisfatória (SILVEY, 1980).

O coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla, R^2 , é a razão entre a soma quadrática explicada pelo modelo e a soma quadrática total:

$$R^2 = \frac{SQ_{reg}}{SQ_T} \quad \text{Equação (25)}$$

O somatório SQ_T representa a variação total dos sinais analíticos em torno de sua própria média. O termo SQ_{reg} é a parcela dessa variação que o modelo consegue descrever. A razão entre eles, R^2 , é comumente chamada de variação percentual explicada pelo modelo e varia de 0 a 1. Quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y (PIMENTEL; BARROS NETO, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é propor modelos matemáticos fenomenológicos capazes de descrever a cinética de oxidação química e enzimática de ligninas de palha de bagaço de cana, obtidas por diferentes processos, determinar os parâmetros cinéticos importantes para o processo de oxidação e realizar a validação destes modelos.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um modelo cinético de ordem n para descrever a oxidação química da lignina de bagaço de cana sob 4 temperaturas;
- Desenvolver um modelo baseado na cinética enzimática para descrever a oxidação enzimática da lignina de palha e bagaço de cana, utilizando 4 extratos enzimáticos distintos;
- Determinar os parâmetros cinéticos desses modelos e compará-los com os obtidos em outros trabalhos;
- Realizar a validação estatística do ajuste dos modelos propostos e compará-la com outros trabalhos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Lignina

Neste trabalho, foram utilizados os dados obtidos nos experimentos realizados por

- FERRETTI e GONÇALVES (2002) - oxidação química de lignina de bagaço de cana obtida por explosão a vapor e por polpação acetosolv;
- PEREIRA (2008) - oxidação enzimática de lignina de palha e bagaço utilizando extrato de maçã e enzima comercial;
- NAKANISHI (2006) - oxidação enzimática de lignina de palha utilizando extrato de batata. Os procedimentos experimentais estão descritos a seguir.

4.1.1 Explosão a vapor

O bagaço de cana foi pré-tratado por explosão a vapor conforme metodologia descrita por SILVA (1995). A lignina contida no licor foi separada do resíduo celulósico por filtração a vácuo em funil de Büchner, usando-se papel de filtro previamente tarado. Para remover a lignina impregnada, o resíduo celulósico retido no funil foi lavado com porções de água destilada, intercaladas pela aplicação de vácuo. Os filtrados foram misturados e acidificados com HCl 20% até pH 2. Após a decantação, a lignina precipitada foi filtrada num funil de Büchner com papel de filtro tarado e lavada com água destilada até que não fossem mais detectados íons cloreto no teste com AgNO_3 . O filtrado foi desprezado e a lignina seca em estufa à 60°C até apresentar massa constante.

4.1.2 Acetosolv

Para a obtenção da lignina Acetosolv realizou-se a polpação do bagaço de cana com ácido acético por 2 h sob refluxo, segundo metodologia descrita por BENAR (1992). A lignina foi, em seguida, precipitada com água destilada.

4.1.3 Soda - antraquinona

Ao bagaço e à palha de cana, foi adicionada uma solução de NaOH 20,64 % (m/v) (16 % de Na₂O ativo) obedecendo à seguinte relação licor:bagaço/palha 6:1 (v/m) e 0,15% (m/v) de antraquinona em relação ao volume total do licor, de acordo com LUZ (2004).

A polpação foi realizada em um reator de aço inoxidável MILLIPORE CORPORATION com capacidade de 10 L a 170°C por 2 h. O tempo de aquecimento até a temperatura de 170° C previamente determinado foi de 1,5 h, resultando em um tempo total de processo de 3,5 h.

Após a polpação, a mistura foi lavada exaustivamente com água até pH neutro e o filtrado (licor residual) deste procedimento contém uma grande concentração de lignina.

Ajustou-se o pH do licor residual com HCl até a obtenção de um pH próximo a 2,0. Filtrou-se esse licor e o precipitado obtido, a lignina, foi seco ao ar por 12 h e em estufa a 60°C por 24 h, técnica otimizada por LUZ (1998).

4.2 Obtenção dos Extratos Enzimáticos

4.2.1 Extrato de maçã

O extrato de maçã foi obtido por meio da trituração de maçãs do tipo Fuji (*Malus domestica*) cruas em solução tampão fosfato (KH₂PO₄ 0,1 mol.L⁻¹, NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e pH

7,6). A mistura foi filtrada e centrifugada no intuito de remover o amido e o extrato foi armazenado em geladeira.

4.2.2 Recuperação do extrato de maçã

Ao final da oxidação, a lignina foi reprecipitada com HCl 0,5 N até atingir pH 2,0 e o pH do filtrado foi ajustado para neutro com tampão fosfato (pH 7,6) para regeneração das enzimas.

4.2.3 Extrato de batata

O extrato de batata foi obtido pela trituração de batatas cruas em solução tampão fosfato (KH_2PO_4 $0,1 \text{ molL}^{-1}$, NaOH $0,1 \text{ molL}^{-1}$ e pH 7,6). A mistura foi filtrada e centrifugada no intuito de remoção de amido e o extrato guardado em geladeira.

4.2.4 Enzima comercial NOVOZYM 51003

Foi realizada uma diluição 1:400 com água destilada da enzima comercial NOVOZYM 51003.

4.3 Oxidação Química

Em um balão de fundo redondo de três bocas, foram adicionados 0,5 g de lignina, pesados em uma balança analítica com precisão de $\pm 0,1 \text{ mg}$ e adicionaram-se cerca de 100 mL de ácido acético glacial, 1,6 mL de HBr (47% p/v), 0,05 g de acetato de manganês (II), 0,42 g de acetato de cobalto (II) e 10 mL de anidrido acético. Um condensador de bolas foi acoplado à boca central do balão, em outra se colocou a entrada de oxigênio e a última

ficou livre para a retirada de amostras, conforme figura 5. O fluxo de oxigênio foi ajustado para $60 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, a temperatura foi variada de 50° , 70°C , 90°C e 115°C e todos os experimentos foram realizados em triplicata. As reações foram mantidas por cerca de 2,5 h em banho de silicone. A cada 30 min de reação uma amostra de 5 mL foi retirada.

Figura 14 - Oxidação em sistema aberto de bancada

4.4 Oxidação Enzimática

As oxidações enzimáticas foram feitas em solução tampão fosfato 50 mmol L^{-1} (pH 7,6) e 1,4-dioxano, 3:1(v/v), no volume total de 30 mL. Foram utilizados 300 mg de lignina, pesados em balança analítica com precisão de 0,1 mg, 15 mL de extrato enzimático, 0,1% de glicerol e 30 mL/min de O_2 . Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente por 5 h (CALABRIA; GONÇALVES, 2004).

4.5 Análise utilizando a região de UV-visível

Uma alíquota de 1 mL da amostra foi diluída em 10 mL de ácido acético e, desta diluição, foi retirada uma nova alíquota de 1 mL que foi diluída em 10 mL de água

destilada. Essas soluções foram analisadas em um espectrofotômetro de UV-visível CINTRA 20.

As oxidações químicas foram analisadas a 280 nm, a fim de se acompanhar a cinética da reação por meio dos valores de absorbância obtidos. As amostras foram colocadas em cubetas de quartzo e medidas contra um branco de uma solução de ácido acético na concentração de 1:100. Já as amostras das oxidações enzimáticas foram analisadas a 265, 280 e 320nm.

5 MODELAGEM MATEMÁTICA

5.1 Oxidação Química

No processo de oxidação branda da lignina, considera-se que não há abertura do anel aromático e, portanto, a reação pode ser descrita como:

Em que L representa a lignina e L_O representa a lignina oxidada.

Considerando-se a cinética de ordem n, a concentração da lignina oxidada (C_{LO}) varia ao longo do tempo (t) segundo a seguinte equação:

$$\frac{dC_{LO}}{dt} = kC_{LO}^n \quad \text{Equação (26)}$$

O monitoramento da reação é realizado por meio do acompanhamento da absorbância da amostra a 280 nm ao longo do tempo. Dessa forma, se faz necessária a conversão de concentração de lignina oxidada (C_{LO}) em absorbância da amostra (A).

A Lei de Beer-Lambert estabelece uma relação entre concentração da amostra e absorbância segundo a seguinte equação:

$$A = \alpha l C \quad \text{Equação (27)}$$

$$C = \frac{A}{\alpha l} \quad \text{Equação (28)}$$

Em que α representa a absortividade molar da substância analisada, l o caminho percorrido pela luz na amostra e C a concentração da substância.

Considerando-se α e l constantes, a diferenciação da equação (27) em relação à concentração fica:

$$\frac{dA}{dC} = \alpha l \quad \text{Equação (29)}$$

$$dC = \frac{1}{\alpha l} dA \quad \text{Equação (30)}$$

Substituindo as equações (30) e (28) em (26), temos:

$$\frac{1}{\alpha l} \frac{dA}{dt} = k \left(\frac{A}{\alpha l} \right)^n \quad \text{Equação (31)}$$

$$\frac{dA}{dt} = k(\alpha l)^{1-n} A^n \quad \text{Equação (32)}$$

Em que A representa a absorbância da amostra a 280nm e k a constante cinética.

A constante cinética k varia com a temperatura do sistema. A equação de Arrhenius permite calcular a variação da constante cinética k com a temperatura.

$$k = k_0 e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{Equação (33)}$$

Onde k é a constante de velocidade da reação, k_0 é a constante pré-exponencial, E_a a energia de ativação da reação, R é a constante dos gases e T é a temperatura do sistema.

Substituindo a equação (33) em (32), temos:

$$\frac{dA}{dt} = k_0(\alpha l)^{1-n} e^{\frac{-E_a}{RT}} A^n \quad \text{Equação (34)}$$

Chamando $K = k_0(\alpha l)^{1-n}$, temos:

$$\frac{dA}{dt} = K e^{\frac{-E_a}{RT}} A^n \quad \text{Equação (35)}$$

A equação (35) avalia a cinética da reação de oxidação da lignina relacionando a absorbância da amostra ao longo do tempo sob diversas condições de temperatura.

5.2 Oxidação Enzimática

Para a oxidação enzimática, será considerada a cinética enzimática de Michaelis-Menten. No modelo desenvolvido por Michaelis-Menten, V_0 representa a velocidade da reação, $V_{\max}$ a velocidade máxima de reação, $[S]$ a concentração de substrato e k_M a constante associada à afinidade enzima-substrato.

$$V_0 = \frac{V_{\max}[S]}{k_M + [S]} \quad \text{Equação (36)}$$

Em termos diferenciais, temos

$$-\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{k_M + [S]} \quad \text{Equação (37)}$$

Como $\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt}$, a equação (37), escrita em função do produto formado, fica:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[P]}{k_M + [P]} \quad \text{Equação (38)}$$

Uma vez que não foi avaliado o consumo de oxigênio ao longo da reação, para fins cinéticos, considera-se que a reação ocorre da seguinte maneira:

Dessa forma, a cinética da reação se processa de acordo com a tabela 1, onde S representa o substrato e P representa a inserção dos grupamentos oxidados na molécula da lignina.

Tabela 3 – Comportamento cinético de S e P ao longo da reação enzimática

	S	P
Início	S ₀	0
Reação	S	P
Fim	(S ₀ -S)	P

A inserção dos grupamentos oxidados (P) é avaliada pelo aumento da absorbância da amostra nos comprimentos de onda estudados. Uma vez que, no início da reação, a lignina possui um valor de absorbância diferente de zero, a diferença entre a absorbância no tempo t (A) e a absorbância inicial (A₀) representa a inserção dos grupamentos oxidados (A_p), ou seja, a oxidação da lignina.

$$A_p = A - A_0 \quad \text{Equação (39)}$$

Dessa forma, a cinética representada pela equação (13), escrita em função da absorbância, fica:

$$\frac{d[A]}{dt} = \frac{C[A - A_0]}{k_S + [A - A_0]} \quad \text{Equação (40)}$$

Os parâmetros cinéticos da equação (40) não são mais os parâmetros de Michaelis-Menten, pois, na equação (40) avalia-se a evolução da absorbância e não da concentração do produto e, dessa forma, os parâmetros do modelo assumem dimensões diferentes das de Michaelis-Menten. No entanto, a constante C ainda é associada à velocidade da reação e a constante k_S à afinidade enzima-substrato.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Oxidação Química em Meio Ácido de Lignina de Bagaço de Cana Obtida por Explosão a Vapor

O método Levenberg-Marquardt exige que sejam fornecidas estimativas iniciais para os valores dos parâmetros do modelo (K , E_a e n). Foram utilizados, como estimativas iniciais, os valores obtidos por FERRETTI e GONÇALVES (2002): $k=4,7802 \text{ h}^{-1}$, $E_a=9328,2 \text{ J/mol}$. Para o parâmetro n (ordem de reação), foi adotado $n=1$ como estimativa inicial. As figuras 15 a 18 mostram as curvas obtidas a partir do modelo ajustado relacionadas com os pontos experimentais nas temperaturas estudadas

Figura 15 – Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina de explosão a vapor a 50°C

Figura 16 - Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina de explosão a vapor a 70°C

Figura 17 – Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina de explosão a vapor a 90°C

Figura 18 - Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina de explosão a vapor a 115°C

A figura 19 representa os resíduos deixados pelo modelo em função da variável dependente, nesse caso, a absorbância da amostra. Pela análise dos resíduos, pode-se perceber que estes apresentam distribuição aleatória e tal fato comprova que a estrutura sistemática dos dados foi explicada pelo modelo.

Figura 19 - Gráfico dos resíduos em função da absorbância

As figuras 15 a 19 mostram que o modelo foi capaz de reproduzir os dados experimentais obtidos. A validação do modelo foi realizada utilizando-se o método de análise de variância e os resultados obtidos encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	1,13250	2	0,566250
Resíduo	0,00926	21	0,000441
Total	1,14176		

Embora o experimento tenha sido realizado em triplicata, neste trabalho foi utilizada a média das 3 análises, pois os dados estavam sob a forma de gráficos da média da absorbância em relação ao tempo. Por esse motivo, na análise de variância, não se pôde avaliar Falta de Ajuste e Erro Puro.

O coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla, R^2 , foi calculado dividindo-se a Soma Quadrática do Modelo pela Soma Quadrática total e o valor encontrado foi $R^2=0.9919$, valor maior que os valores determinados por FERRETTI e GONÇALVES (2002) (entre 0,7836 e 0,9469). A melhora na correlação pode ser explicada pela consideração da cinética de ordem n, que forneceu um valor de $n=1,22 \pm 0,12$ ao invés da cinética de primeira ordem. Outro fator que contribuiu para a melhora na correlação foi a introdução da Equação de Arrhenius na modelagem, que relaciona a variação da constante de velocidade da reação em função da energia de ativação e da temperatura do sistema.

O fator F foi calculado dividindo-se a Média Quadrática do Modelo pela Média Quadrática dos Resíduos. O resultado obtido foi $F_{\text{calc}} = 1284$. Para que a avaliação estatística da qualidade do ajuste seja satisfatória, o valor do F calculado deve ser maior que o valor tabelado para os mesmos graus de liberdade. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 2 graus de liberdade no numerador e 21 no denominador é $F_{2,21} = 5,780$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 222 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros do modelo (k, Ea e n) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt, implementado no programa Scilab 4.0. Este programa utiliza a função *lsqrsolve*, que encontra o melhor ajuste para um conjunto de dados de tal modo que a soma dos quadrados das distâncias (tomadas na vertical) entre o modelo (curva ajustada)

e cada um dos pontos seja a menor possível. Os valores encontrados para os parâmetros encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação da lignina de explosão a vapor

	Parâmetro	Desvio
Ea	9099,6	947
n	1,22	0,12
K	6,62	1,3

O valor da energia de ativação ($E_a = 9099,6$ J/mol) encontrado é bastante parecido com o determinado por FERRETTI e GONÇALVES (2002) (9328,2 J/mol), que consideraram a reação como sendo de primeira ordem.

Em experimentos de oxidação de lignina em meio ácido sem o uso de sistema catalítico, GONÇALVES et al. (2001) encontraram um valor de energia de ativação de 15639 J/mol, valor maior que o encontrado neste trabalho, fato que indica que o sistema catalítico é eficiente e reduz a energia de ativação em 40%.

Os valores elevados para o desvio dos parâmetros são explicados, principalmente, pelo fato do sistema não ser homogêneo, e, portanto, é muito difícil retirar alíquotas iguais.

Com relação à constante K, neste trabalho, ela representa $k_0(\alpha l)^{1-n}$ ao invés da constante de velocidade padrão. Este parâmetro representa uma adaptação da constante pré exponencial da Equação de Arrhenius. O termo $(\alpha l)^{1-n}$ funciona como um parâmetro de correção de ordem. No entanto, não é possível comparar o valor da constante K deste trabalho com a constante de velocidade de outros trabalhos, pois, em outros trabalhos, a cinética foi considerada de ordem 1 e, nesse trabalho, como a ordem não é a mesma, a constante de velocidade tem outra magnitude.

6.2 Oxidação Química em Meio Ácido de Lignina de Bagaço de Cana Obtida por Polpação Acetosolv

De modo análogo ao que foi feito com a oxidação química da lignina obtida por explosão a vapor, os valores dos parâmetros cinéticos obtidos por FERRETTI e GONÇALVES (2002) foram utilizados como estimativas iniciais para determinação dos parâmetros: $k=0,405 \text{ h}^{-1}$, $E_a=807,22 \text{ J/mol}$. Para o parâmetro n (ordem de reação), foi adotado $n=1$ como estimativa inicial. As figuras 20 a 23 mostram as curvas obtidas a partir do modelo ajustado relacionadas com os pontos experimentais nas temperaturas estudadas.

Figura 20 - Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina acetosolv a 50°C

Figura 21 – Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina acetosolv a 70°C

Figura 22 - Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina acetosolv a 90°C

Figura 23 - Variação da absorbância ao longo do tempo para a oxidação da lignina acetosolv a 115°C

A figura 24 representa os resíduos deixados pelo modelo em função da absorbância. Pela análise dos resíduos, é possível perceber que estes apresentam distribuição aleatória e tal fato comprova que a estrutura sistemática dos dados foi explicada pelo modelo.

Figura 24 - Gráfico dos resíduos em função da absorbância

Pela análise das figuras 20 a 24, é possível perceber que o modelo foi capaz de reproduzir os dados experimentais obtidos. A validação do modelo foi realizada utilizando-se o método de análise de variância e os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	0,71279	2	0,35640
Resíduo	0,00251	21	0,00013
Total	0,71530		

O coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla, R^2 calculado foi $R^2 = 0,9965$. Comparando esse valor com os valores obtidos por FERRETTI e GONÇALVES (2002) (entre 0,8384 e 0,9893) para a mesma oxidação, percebe-se uma melhora na correlação. Essa melhora é explicada, como no caso da lignina de explosão a vapor, pela consideração da cinética de ordem n , que forneceu um valor de $n = 1,19 \pm 0,06$ ao invés da cinética de primeira ordem. A introdução da Equação de Arrhenius na modelagem, que relaciona a variação da constante de velocidade da reação em função da

energia de ativação e da temperatura do sistema, também foi outro fator que contribuiu para a melhora na correlação.

O fator F calculado foi $F_{\text{calc}} = 2699$. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 2 graus de liberdade no numerador e 21 no denominador é $F_{2,21} = 5,780$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 467 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros do modelo (k, Ea e n) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros encontram-se na tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação da lignina acetosolv

	Parâmetro	Desvio
Ea	785,8	55
n	1,19	0,06
K	0,0184	0,0035

No trabalho de FERRETTI E GONÇALVES (2002), considerando a cinética de oxidação de primeira ordem, foram calculados 3 valores de energia de ativação: 631,14, 807,22 e 951,59 J/mol, valores semelhantes ao encontrado neste trabalho ($E_a = 785,8$ J/mol) é semelhante aos encontrados por FERRETTI e GONÇALVES (2002).

Com relação à constante K, como já dito anteriormente, neste trabalho, ela representa $k_0(\alpha l)^{1-n}$ ao invés da constante de velocidade padrão. Este parâmetro representa uma adaptação da constante pré exponencial da Equação de Arrhenius e o termo $(\alpha l)^{1-n}$ funciona como um fator de correção de ordem e, por esse motivo, não pode ser comparado com outros trabalhos.

Comparando o valor de energia de ativação calculado para a lignina obtida por explosão a vapor com o da lignina acetosolv, percebe-se que a energia de ativação da para a lignina acetosolv é 12 vezes menor que para a lignina de explosão a vapor. Isto deve ocorrer porque a lignina obtida pelo processo Acetosolv deve ser mais solúvel em ácido acético que a lignina obtida por explosão a vapor, tornando a solubilidade um fator importante para a cinética.

6.3 Oxidação Enzimática de Ligninas de Palha de Cana Obtidas por Polpação Soda/Antraquinona

A cinética oxidação enzimática foi monitorada utilizando-se os valores de absorbância das amostras a 265, 280 e 320nm.

Foram realizadas oxidações utilizando 4 extratos enzimáticos distintos: extrato de maçã, extrato de maçã reutilizado, extrato de batata e lacase comercial NOVOZYM 51003. Para descrever as diversas oxidações, serão adotadas algumas siglas:

- LPSOM – Lignina de Palha obtida por polpação Soda-antraquinona Oxidada com extrato de Maçã;
- LPSOMR - Lignina de Palha obtida por polpação Soda-antraquinona Oxidada com extrato de Maçã Reutilizado;
- LPSOB – Lignina de Palha obtida por polpação Soda-antraquinona Oxidada com extrato de Batata;
- LPSOC – Lignina de Palha obtida por polpação Soda-antraquinona Oxidada com enzima Comercial.

O modelo foi alimentado com os dados dos 3 comprimentos de onda e foram determinados parâmetros cinéticos distintos para cada comprimento de onda, com o objetivo de estudar a cinética da inserção dos diferentes grupos funcionais.

6.3.1 Oxidação com extrato de maçã (LPSOM)

As curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais encontram-se nas figuras 25 a 28.

Figura 25 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã

Figura 26 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã

Figura 27 - Variação da absorbância a 320nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã

Figura 28 – Perfil de absorbância da oxidação enzimática com extrato de maçã da lignina de palha NaOH/AQ ao longo do tempo nos 3 comprimentos de onda estudados

A figura 29 representa os resíduos deixados pelo modelo em função da absorbância. Verifica-se que os pontos são aleatórios, evidenciando que a estrutura sistemática dos dados foi explicada pelo modelo.

Figura 29 – Gráfico dos resíduos em função da absorbância

Utilizou-se o método de análise de variância para avaliar a validação do modelo e os resultados obtidos encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	0,15013	5	0,030035
Resíduo	0,000414	24	0,0000172
Total	0,150544		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,99725$, valor superior aos encontrados por PEREIRA (2008) (entre 0,86 e 0,991), fato que indica que a consideração cinética enzimática na modelagem é mais eficaz que a consideração de cinética de primeira ordem na reprodução do dados experimentais.

O fator F calculado foi $F_{\text{calc}} = 1740$. O valor tabelado para 99% de confiança, 5 graus de liberdade no numerador e 24 no denominador é $F_{5,24} = 3,895$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 446 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros cinéticos do modelo (C_{265} , C_{280} , C_{320} , ks_{265} , ks_{280} , ks_{320}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação para LPSOM

	Parâmetro	Desvio
C₂₆₅	0,098	0,006
C₂₈₀	0,063	0,002
C₃₂₀	0,055	0,002
ks₂₆₅	0,102	0,01
ks₂₈₀	0,020	0,002
ks₃₂₀	0,017	0,002

Os parâmetros C_{265} , C_{280} e C_{320} estão associados à velocidade da reação. Uma vez que a absorbância é uma grandeza adimensional, os parâmetros C_{265} , C_{280} e C_{320} possuem dimensão inversa de tempo (h^{-1}).

$$\frac{dA}{dt} = \frac{C(A - A_0)}{k_s + (A - A_0)}$$

Dessa forma, o parâmetro C atua no modelo como uma constante de velocidade da reação em cada comprimento de onda. Pela análise da tabela 9, nota-se que, a constante C para 265nm possui um valor maior que as demais. No entanto, a Figura 28 mostra que a diferença entre as velocidades nos 3 comprimentos de onda é bem pequena, uma vez que o parâmetro k_s também tem influência na velocidade da reação. Sendo assim, o binômio $C-k_s$ passa a ser importante para cinética do processo.

O parâmetro k_s , apesar de adimensional, está associado à afinidade da enzima pelo seu substrato. A afinidade cresce à medida que k_s diminui e, portanto, quanto menor for o valor de k_s , maior é a afinidade. Portanto, para uma velocidade de reação elevada, é necessário que C apresente um valor elevado e k_s um valor pequeno. É preciso ressaltar que, numericamente, não se pode pensar em avaliar a cinética da reação pela razão C/k_s , uma vez que o efeito de k_s é influenciado pela magnitude do termo $(A-A_0)$.

Os valores de k_s serão discutidos, neste trabalho, ao longo da apresentação dos resultados para as demais oxidações enzimáticas, uma vez que, por se tratar de um parâmetro adimensional, só é possível compará-lo com estudos cinéticos que envolvam as mesmas considerações na modelagem. Para que o parâmetro k_s pudesse ser comparado com outros trabalhos, a modelagem deveria ser realizada em torno da concentração e não da absorbância. No entanto, a construção de uma curva de calibração para a formação de grupamentos oxidados na lignina não é tão trivial, pois depende da caracterização química da lignina sob diferentes condições de oxidação e ainda há o fator solubilidade, que é de grande influência na cinética e que dificultaria a interpretação dos dados obtidos com a curva de calibração.

6.3.2 Oxidação com extrato de maçã reutilizado (LPSOMR)

As curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais para a oxidação com extrato de maçã reutilizado (LPSOMR) encontram-se nas figuras 30 a 33.

Figura 30 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã reutilizado

Figura 31 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã reutilizado

Figura 32 - Variação da absorbância a 320nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de maçã reutilizado

Figura 33 - Perfil de absorbância da oxidação enzimática com extrato de maçã reutilizado da lignina de palha NaOH/AQ ao longo do tempo nos 3 comprimentos de onda estudados

Os resíduos deixados pelo modelo em função da variável dependente apresentaram distribuição aleatória, como pode ser evidenciado na figura 34.

Figura 34 – Gráfico dos resíduos em função da absorbância

A tabela 10 apresenta os fatores, calculados pelo método de análise de variância, que foram utilizados para a validação do modelo.

Tabela 10 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	0,59810	5	0,11962
Resíduo	0,00557	19	0,000293
Total	0,60367		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,9908$, valor superior aos encontrados por PEREIRA (2008) (entre 0,906 e 0,930).

O fator F foi calculado foi $F_{\text{calc}} = 408$. Para que a avaliação estatística da qualidade do ajuste seja satisfatória, o valor do F calculado deve ser maior que o valor tabelado para os mesmos graus de liberdade. O valor tabelado para 99% de confiança para 5 graus de liberdade no numerador e 19 no denominador é $F_{5,19} = 4,171$ (BARROS NETO, 2007). Assim, F_{calc} é 97 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros cinéticos do modelo (C_{265} , C_{280} , C_{320} , ks_{265} , ks_{280} , ks_{320}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação para LPSOMR

	Parâmetro	Desvio
	C_{265}	0,158
	C_{280}	0,227
	C_{320}	0,302
	ks_{265}	0,075
	ks_{280}	0,144
	ks_{320}	0,031

A análise das figuras 30 a 34 e das tabelas 10 e 11 mostra que o modelo foi capaz de reproduzir os dados experimentais e que a reutilização das enzimas é eficiente. Nota-se na tabela 11 que foram obtidos valores de C muito maiores para os ensaios com enzima reutilizada em relação ao extrato original. É possível notar na Figura 33 que a evolução da absorbância a 320nm apresenta uma velocidade maior que nos demais comprimentos de onda, ou seja, a inserção de grupos carboxílicos ocorre com maior velocidade que a formação dos demais. Uma hipótese é que materiais presentes no extrato de maçã que podem inibir a ação enzimática seriam adsorvidos ou interagiriam com a lignina. Essas impurezas presentes podem ter sido removidas no processo de recuperação e reutilização e, dessa forma, ocorreu uma alteração no perfil de ação da enzima.

6.3.3 Oxidação com extrato de batata (LPSOB)

As figuras 35 a 38 mostram as curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais para a oxidação com extrato de batata.

Para esta oxidação, foram utilizados somente os pontos obtidos até o tempo de 2,5 h, pois, após este tempo, os dados apresentaram a formação de um patamar e, após 4 h, a absorbância diminuiu consideravelmente. Este comportamento foi apresentado pelas oxidações com extrato de batata e com a enzima comercial da lignina de palha e para as

oxidações enzimáticas da lignina de bagaço. A explicação para este comportamento é que, por se tratar de uma lignina de polpação alcalina, ocorreu a saturação da oxidação mais rapidamente.

Segundo GOMIDE e OLIVEIRA (1979), a adição de antraquinona no processo de polpação soda resulta em uma intensificação da taxa de deslignificação e remoção desta, pois a lignina sofre hidrólise das ligações β -éter, ocasionando a formação de fragmentos de lignina de menor massa molecular.

Já ligninas obtidas por polpação ácida têm uma reticulação maior, ou seja, maior entrecruzamento de cadeias pela facilidade de formação de carbocátions devido à solvólise (FENGEL; WEGENER, 1989).

Este comportamento não foi evidenciado nas oxidações anteriores porque a carga enzimática foi menor e não houve tempo suficiente para esse comportamento surgir.

Figura 35 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de batata

LPSOB 280nm

Figura 36 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de batata

LPSOB 320nm

Figura 37 - Variação da absorbância a 320nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com extrato de batata

Figura 38 - Perfil de absorbância da oxidação enzimática com extrato de batata da lignina de palha NaOH/AQ ao longo do tempo nos 3 comprimentos de onda estudados

A figura 39 mostra os resíduos aleatórios deixados pelo modelo em função da absorbância da amostra.

Figura 39 – Gráfico dos resíduos pela absorbância

A validação do modelo foi realizada utilizando-se o método de análise de variância e os resultados obtidos encontram-se na tabela 12. Nota-se que a análise de variância nesse caso apresentou menos graus de liberdade para os resíduos que as anteriores, uma vez que a quantidade de pontos experimentais é menor. Ainda assim, a avaliação estatística da modelagem não foi prejudicada.

Tabela 12 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	1,083755	5	0,216751
Resíduo	0,004523	9	0,000503
Total	1,088278		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,997$. No trabalho de NAKANISHI (2006), foram encontrados valores semelhantes de coeficiente de correlação (0,981 a 0,998).

O fator F foi calculado dividindo-se a Média Quadrática do Modelo pela Média Quadrática dos Resíduos. O resultado obtido foi $F_{\text{calc}} = 790$. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 5 graus de liberdade no numerador e 9 no denominador é $F_{5,9} = 6,057$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 130 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros cinéticos do modelo (C_{265} , C_{280} , C_{320} , ks_{265} , ks_{280} , ks_{320}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 13

Tabela 13 – Parâmetros cinéticos para o modelo de oxidação LPSOB

	Parâmetro	Desvio
C₂₆₅	0,439	0,042
C₂₈₀	1,354	0,120
C₃₂₀	0,173	0,006
ks₂₆₅	0,239	0,038
ks₂₈₀	0,803	0,052
ks₃₂₀	0,023	0,001

É possível notar, pelos valores da tabela 13, que a 280nm, o valor da constante C é bem maior que nos demais comprimentos de onda. Esse fato está evidente na curva exibida

na figura 38, indicando que a formação de carbonilas ocorre em velocidade maior. O parâmetro k_s é menor para 320nm, indicando que, a reação monitorada a 320nm (formação de carboxilas) é a que apresenta a maior afinidade enzima-substrato. No entanto, essa reação se processa lentamente, pois o valor de C_{320} é o menor.

6.3.4 Oxidação com enzima comercial NOVOZYM 51003 (LPSOC)

As curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais para a oxidação com a lacase NOVOZYM 51003 encontram-se nas figuras 40 a 43

Figura 40 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com enzima NOVOZYM 51003

Figura 41 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com enzima NOVOZYM 51003

Figura 42 - Variação da absorbância a 320nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de palha NaOH/AQ com enzima NOVOZYM 51003

Figura 43 - Perfil de absorbância da oxidação enzimática com a NOVOZYM 51003 da lignina de palha NaOH/AQ ao longo do tempo nos 3 comprimentos de onda estudados

Os resíduos deixados pelo modelo em função da variável dependente apresentaram distribuição aleatória, como pode ser evidenciado na figura 44

Figura 44 – Gráficos dos resíduos pela absorbância

A tabela 14 apresenta os fatores, calculados pelo método de análise de variância, que foram utilizados para a validação do modelo.

Tabela 14 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	1,011780	5	0,202356
Resíduo	0,001995	12	0,000166
Total	1,013775		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,998$, valor superior aos encontrados por PEREIRA (2008) (entre 0,94 e 0,97).

O fator F foi calculado e o resultado obtido foi $F_{\text{calc}} = 1217$. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 5 graus de liberdade no numerador e 12 no denominador é $F_{5,12} = 5,064$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 240 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros do modelo (C_{265} , C_{280} , C_{320} , ks_{265} , ks_{280} , ks_{320}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 15.

Tabela 15 – Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação LPSOC

	Parâmetro	Desvio
C₂₆₅	1,236	0,14
C₂₈₀	1,467	0,11
C₃₂₀	1,372	0,12
ks₂₆₅	1,196	0,12
ks₂₈₀	0,827	0,091
ks₃₂₀	1,253	0,13

Os valores obtidos para as constantes C são bem próximos entre si, indicando que as reações monitoradas nos 3 comprimentos de onda se processam sob velocidades semelhantes. Entretanto, a formação de carbonilas (reação monitorada a 280nm) é a que apresenta maior afinidade enzima-substrato, uma vez que o valor de ks_{280} é o menor dos 3 obtidos. Nesse caso, o binômio C-ks se torna importante para a cinética e, como mostra a figura 43, a reação monitorada a 280nm se processa sob uma velocidade maior.

Analisando-se todas as oxidações enzimáticas da lignina de palha, é possível concluir que todas as enzimas foram capazes de oxidar o substrato e que o modelo foi capaz de reproduzir os dados experimentais. Os valores de F e R^2 encontrados na análise estatística confirmam que a consideração da cinética enzimática reproduz melhor os resultados experimentais que a consideração cinética de pseudoprimeira ordem, adotada nos trabalhos de PEREIRA (2008) e NAKANISHI (2006).

A formação dos grupos α -carbonílicos, monitorada a 280nm, foi, em geral, a que apresentou maior constante de velocidade. A oxidação com extrato de maçã não apresentou diferenças cinéticas significativas entre os 3 comprimentos de onda monitorados, enquanto que a oxidação com o extrato de maçã reutilizado apresentou, devido à recuperação e reutilização, um perfil de ação da enzima diferente e a reação monitorada a 320nm apresentou maior velocidade.

Pela análise dos dados, fica comprovado que o binômio C-ks é importante para a cinética da reação, uma vez que valores elevados de C representam altas velocidades máximas de reação e valores pequenos de ks representam alta afinidade entre enzima e substrato. A reação que apresentou maior afinidade enzima-substrato foi a monitorada a 320nm para a oxidação com extrato de maçã. Apesar de apresentar maior afinidade, esta reação não se processou à alta velocidade, pois as impurezas do extrato, de alguma maneira, interferiram na reação.

6.4 Oxidação Enzimática de Ligninas de Bagaço de Cana Obtidas por Polpação Soda/Antraquinona

A cinética de oxidação enzimática da lignina de bagaço foi monitorada utilizando-se os valores de absorbância das amostras a 265, 280 e 320nm. Foram realizadas oxidações utilizando 2 extratos enzimáticos distintos: extrato de maçã (LBSOM) e extrato de maçã reutilizado (LBSOMR). O modelo foi alimentado com os dados de absorbância nos comprimentos de onda de 265nm e 280nm. Não houve variação significativa na

absorbância a 320nm, evidenciando que há diferenças estruturais entre as ligninas de bagaço e palha não elucidadas ainda.

6.4.1 Oxidação com extrato de maçã (LBSOM)

As figuras 45 a 47 mostram as curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais para a oxidação com extrato de maçã

Figura 45 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de bagaço NaOH/AQ com extrato de maçã

Figura 46 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de bagaço NaOH/AQ com extrato de maçã

Figura 47 - Perfil de absorbância da oxidação com extrato de maçã da lignina de bagaço NaOH/AQ ao longo do tempo nos 2 comprimentos de onda estudados

Os resíduos deixados pelo modelo apresentaram comportamento aleatório, como pode ser evidenciado na figura 48

Figura 48 – Gráfico dos resíduos pela absorvância

A validação do modelo foi realizada utilizando-se o método de análise de variância e os resultados obtidos encontram-se na tabela 16.

Tabela 16 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	1,018416	3	0,339472
Resíduo	0,004153	8	0,000519
Total	1,022569		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,997$. Os valores encontrados por PEREIRA (2008) foram 0,996 e 0,984.

O fator F foi calculado e o resultado obtido foi $F_{\text{calc}} = 653$. Para que a avaliação estatística da qualidade do ajuste seja satisfatória, o valor do F calculado deve ser maior que o valor tabelado para os mesmos graus de liberdade. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 3 graus de liberdade no numerador e 8 no denominador é $F_{3,8} = 7,591$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 86 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros cinéticos do modelo (C_{265} , C_{280} , ks_{265} , ks_{280}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 17

Tabela 17 – Parâmetros cinéticos do modelo de oxidação LBSOM

	Parâmetro	Desvio
	C_{265}	1,921
	C_{280}	2,330
	ks_{265}	0,12
	ks_{280}	0,10

Ao contrário do que aconteceu com a lignina de palha, a oxidação com extrato de maçã da lignina de bagaço apresentou maior constante de velocidade a 280nm e também menor afinidade enzima-substrato na reação monitorada neste comprimento de onda. No entanto, como mostra a figura 38, as reações monitoradas nos 2 comprimentos de onda apresentaram velocidades muito parecidas. Isso porque, a 265nm, embora a velocidade máxima da reação seja menor ($C_{265}=1,921$), a afinidade enzima-substrato é maior, uma vez que o ks_{265} apresenta um valor menor que o ks_{280} . Tal fato confirma a importância do binômio C-ks para a cinética da reação. A diferença nos resultados entre a lignina de palha e de bagaço corrobora com o fato dessas ligninas apresentarem diferenças estruturais entre si.

6.4.2 Oxidação com Extrato de Maçã Reutilizado (LBSOMR)

As figuras 49 a 51 mostram as curvas obtidas pelo modelo relacionadas com os pontos experimentais para a oxidação com extrato de maçã reutilizado

Figura 49 - Variação da absorbância a 265nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de bagaço NaOH/AQ com extrato de maçã reutilizado

Figura 50 - Variação da absorbância a 280nm ao longo do tempo para a oxidação da lignina de bagaço NaOH/AQ com extrato de maçã reutilizado

Figura 51 - Perfil de absorbância da oxidação com extrato de maçã reutilizado da lignina de bagaço NaOH/AQ ao longo do tempo nos 2 comprimentos de onda estudados

Os resíduos deixados pelo modelo apresentaram comportamento aleatório, como pode ser evidenciado na figura 52

Figura 52 – Gráfico dos resíduos pela absorbância

A validação do modelo foi realizada utilizando-se o método de análise de variância e os resultados obtidos encontram-se na tabela 18.

Tabela 18 – Análise da variância para o ajuste do modelo

FONTE	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática
Modelo	1,179091	3	0,393030
Resíduo	0,005927	8	0,000741
Total	1,185018		

O coeficiente de correlação encontrado foi $R^2=0,995$. PEREIRA (2008) obteve, considerando cinética de primeira ordem, 0,90 e 0,91 como correlação.

O fator F calculado foi $F_{\text{calc}} = 530$. Para que a avaliação estatística da qualidade do ajuste seja satisfatória, o valor do F calculado deve ser maior que o valor tabelado para os mesmos graus de liberdade. Para 99% de confiança, o valor tabelado de F para 3 graus de liberdade no numerador e 8 no denominador é $F_{3,8} = 7,591$ (BARROS NETO, 2007). Portanto, F_{calc} é 69 vezes maior que o valor tabelado e o ajuste do modelo é estatisticamente satisfatório.

Os parâmetros cinéticos do modelo (C_{265} , C_{280} , ks_{265} , ks_{280}) foram determinados utilizando-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt e os valores obtidos para os parâmetros e seus respectivos desvios encontram-se na tabela 19

Tabela 19 – Parâmetros cinéticos para o modelo de oxidação LBSOMR

	Parâmetro	Desvio
C_{265}	1,676	0,11
C_{280}	0,541	0,06
ks_{265}	1,165	0,12
ks_{280}	0,299	0,19

Como aconteceu com a lignina de palha, a recuperação e reutilização do extrato de maçã removeu impurezas que, de certa forma, interferiam na reação e alterou o perfil de ação da enzima. É possível notar, na tabela 19, que, a 265nm, a reação apresenta uma constante de velocidade maior e a afinidade enzima-substrato é menor. A figura 51 mostra que a evolução da absorbância ocorre com velocidade maior a 265nm, indicando que, para a lignina de bagaço oxidada com extrato de maçã reutilizado, a formação de grupos

propenol ($-\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{OH}$) ocorre com maior velocidade que a formação de grupos α -carbonílicos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho e, comparando-se estes resultados com os obtidos por FERRETTI e GONÇALVES (2002), NAKANISHI (2006) e PEREIRA (2008), é possível concluir que:

- O modelo de oxidação química foi capaz de reproduzir os dados experimentais, como comprovado pela validação do modelo realizada pela análise de variância. O método de Runge-Kutta de quarta ordem e o método de Levenberg-Marquardt foram eficientes na integração numérica do modelo e determinação dos parâmetros, respectivamente.
- A introdução da equação de Arrhenius no modelo permitiu que a determinação da Energia de Ativação fosse realizada diretamente, refletindo numa melhora na correlação do modelo com os dados experimentais. A consideração da cinética de ordem n contribuiu para o melhor ajuste do modelo aos dados experimentais, aumentando sua validade estatística;
- Os valores de energia de ativação encontrados foram: 9099 ± 947 J/mol para a lignina de explosão a vapor e 785 ± 55 J/mol para a lignina acetosolv. Essa grande diferença é explicada pela maior solubilidade da lignina acetosolv em ácido acético, mostrando que a solubilidade é um fator importante para a cinética da reação;
- Os valores da constante cinética K encontrados neste trabalho foram: $6,62 \pm 1,3$ para a lignina de explosão a vapor e $0,0184 \pm 0,0035$ para a lignina acetosolv. Não foi possível comparar esses valores com os valores da literatura devido a consideração da cinética de ordem n na modelagem. Entretanto, esses valores podem ser comparados entre si e a redução na constante K para a lignina acetosolv indica, como mostrado em outros trabalhos, que esta lignina é mais reticulada;
- A consideração da cinética de ordem n forneceu os seguintes valores de n : $1,22 \pm 0,12$ para a lignina de explosão a vapor e $1,19 \pm 0,06$ para a lignina acetosolv. Esses valores, apesar de bem próximos de 1, contribuíram para a melhora no ajuste e validação do modelo, fato evidenciado pela melhora nos valores de R^2 comparados

com os obtidos por FERRETTI e GONÇALVES (2002), que consideraram a reação como sendo de pseudo-primeira ordem;

- O modelo de oxidação enzimática foi capaz de reproduzir os dados experimentais, como comprovado pela validação do modelo realizada pela análise de variância. A consideração da cinética enzimática forneceu valores de correlação melhores que os obtidos nos demais trabalhos, que não consideraram a cinética enzimática na modelagem;
- A formação dos grupos α -carbonílicos, monitorada a 280nm, foi, em geral, a que apresentou maior constante de velocidade. A oxidação com extrato de maçã não apresentou diferenças cinéticas significativas entre os 3 comprimentos de onda monitorados, enquanto que a oxidação com o extrato de maçã reutilizado apresentou, devido à recuperação e reutilização, um perfil de ação da enzima diferente e a reação monitorada a 320nm apresentou maior velocidade;
- O binômio C-ks é importante para a cinética da reação, uma vez que valores elevados de C representam altas velocidades máximas de reação e valores pequenos de ks representam alta afinidade entre enzima e substrato. A reação que apresentou maior afinidade enzima-substrato foi a monitorada a 320nm para a oxidação com extrato de maçã;
- A oxidação da lignina de bagaço apresentou comportamento cinético diferente da lignina de palha, evidenciando que há diferenças estruturais entre essas ligninas não elucidadas ainda.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar os sistemas reacionais variando a concentração de oxigênio molecular na forma de O_2 dissolvido, para uma avaliação mais precisa do modelo;
- Sistemas de oxidação com substâncias modelo de lignina podem ser testados para avaliar o comprometimento da natureza macromolecular com o modelo matemático proposto;
- Testar outras ligninas e outros sistemas de oxidação para ampliar a validade do modelo;
- Quando forem feitos novos experimentos, atentar para que a tomada de amostras sejam compatíveis com as medidas quantitativas necessárias para alimentar os cálculos posteriores.

REFERÊNCIAS

AVELLAR, B. K.; GLASSER, W. G. Steam-assisted biomass fractionation. I. Process considerations and economic evaluation. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 205-218, 1998.

BABCOCK, L.W. Method of producing fermentable sugars and alcohol from wood. Patente **USA nº 1.825.464**, 26 de abril, 1932.

BALLESTEROS, I.; NEGRO, M. J.; OLIVA, J. M.; CABAÑAS, A., MANZANARES, P.; BALLESTEROS M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129-132, p. 496-508, 2006.

BARROS NETO, B. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R. E. 3. Ed. Campinas. Editora da Unicamp, 2007. 480p.

BENAR, P. Polpação **Acetosolv de Bagaço de Cana e Madeira de Eucalipto**, 1992. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química – UNICAMP, 1992

BENAR, P.; SCHUCHARDT, U. E NIMZ, H. Phenol-Formaldehyde Resins containing Acetosolv and Formacell Lignins from Eucalyptus grandis, In: FOURTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS.1995, **Resumos**, Recife, Brasil, p.2.

BERTONCINI, E. I. In: Workshop: ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar, 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em 17 de agosto de 2008.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U. A; Aquarone, E.; Borzani, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 123-178. v. 2

BOYCE, W. E. **Equações Diferenciais elementares e problemas de valores de contorno**. 8. Ed. Rio de Janeiro. LTC, 2006. 434p.

CALABRIA, G. M. M.; GONÇALVES, A. R.. Oxidação enzimática da lignina utilizando a enzima polifenoloxidase extraída de batata; In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. 6, 2004 **Anais**. Rio de Janeiro-RJ, p. 222.

CAPEK-MÉNARD, E.; JOLLEZ, P.; CHONET, E.; WAYMAN, M.; DOAN, K. Pretreatment of waste paper for increased ethanol yields. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 985-988, 1992.

CHUM, H. L.; PARKER S. K.; FEINBERG, D.A.; WRIGHT, J.D.; RICE, P.A.; SINCLAIR, S.A. E GLASSER, W. G. **The Economic Contribution of Lignins to Ethanol Production from Biomass**, Golden – CO, Solar Energy Research Institute, 1985, p. 1-90.

COLODETTE, Jorge Luiz . Biorrefinaria ou Biomania?. **Revista Opiniões**, p. 38-39, 2008.

CONVERSE, A. O.; WARE, W. **On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis**. In: IEA/BIOFOR - WORKSHOP ON APPLICATIONS OF BIOTECHNOLOGY IN BIOENERGY SYSTEMS, 1994.Ottawa. Canadá.

COTRIM, A. R.; FERRAZ, A. E SILVA, F. T. Chelating Agents through Oxidation of Sugar Cane Bagasse Lignin, In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON WOOD AND PULP CHEMISTRY. Helsinki.8, 1995. **Proceedings** p. 313-318.

CREMASCO, M. A. **Fundamentos de Transferência de Massa**. 2. ed. Editora da Universidade Estadual de Campinas, 2002. v. 1.

D' ACUNZO, F. ; BARRECA, A.M.; GALLI, C. Determination of the activity of laccase, and mediated oxidation of lignin model compound, in aqueous-organic mixed solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 31, issues 1-3, p. 25-30, 2004.

FAIX, O. Classification of lignins from different botanical origins by FT-IR spectroscopy. **Holzforschung**, v. 45, p. 21-27, 1991

FAIX, O.; GRUNWALD, C.; BEINHOFF, O. Determination of phenolic hydroxyl group content of milled wood lignin (MWLs) from different botanical origins using selective aminolysis, FTIR, ¹HNMR and UV spectroscopy. **Holzforschung**, v. 46, p. 425-432, 1992.

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

FERRETTI, L. P. **Polpação etanol/água da palha de cana em sistema pressurizado e oxidação da lignina obtida**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Biotecnologia – FAENQUIL, 2006.

FERRETTI, L. P. GONÇALVES, A. R. Estudo cinético da oxidação de lignina em meio ácido, In: SIICUSP, 10., 2002, São Carlos.

FOGLER, H. S.; **Elementos de engenharia das reações químicas**. 3. Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2002.

GECKELER, K.; BAYER, E.; SHKINEV, V.M.; SPIVAKOV, B.Y.. New method for anion exchange using soluble polymers. **Naturwissenschaften**, v.75, n.4, p. 198-199, 1988.

GECKELER, K.; LANGE, G.; EBERHARDT, H.; BAYER, E.. Preparation and application of water-soluble polymer metal complexes. **Pure and Applied Chemistry**, v. 52, p. 1883-1905, 1980.

GECKELER, K.; VOLCHEK, K.. Removal of hazardous substances from water using ultrafiltration in conjunction with soluble polymers. **Environment Science and Technology**, v. 30, p. 725-734, 1996.

GOHEEN, D. W. **Chemicals from Lignins, Organic Chemicals from Biomass**, I.S. Goldstein (ed.), CRC Press, Boca Raton: 1981, p. 143-161.

GOLDSCHMIDT, O. **Ultraviolet Spectra, Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions**, K.V. Sarkanen e C.H. Ludwig (eds.), New York. Wiley-Interscience, 1971, p. 241-266.

GOMIDE, J. L.; OLIVEIRA, R. C. Eficiência da antraquinona na polpação alcalina de eucalipto. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 2, p. 208-220, 1979.

GONÇALVES, A.R. **Oxidação de ligninas e Modelos de Lignina com Oxigênio Molecular em Meio Ácido**. 1995. Tese (Doutorado) - Instituto de Química – UNICAMP, 1995.

GONÇALVES, A. R. e OVIEDO, M. A. S. Production of chelating agents through the enzymatic oxidation of Acetosolv sugarcane bagasse lignin, **Applied Biochemistry and Biotechnology**. p. 361-365, 2002.

GONÇALVES, A. R. e SCHUCHARDT, U. Oxidation of Organosolv Lignins in Acetic Acid: Influence of Oxygen Pressure. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p.127-133, 1999.

GONÇALVES, A.R.; MANTOVANINI, C.R. e FERRETTI, L.P. “Reação de Oxidação da Lignina em meio Básico e em meio Ácido”, ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5, 2001. São José dos Campos-SP. **Proceedings**, p.265

GONCALVES A. R; BENAR P; COSTA S. M; RUZENE D. S; MORIYA R. Y; LUZ S. M; FERRETTI L.P. Integrated processes for use of pulps and lignins obtained from sugarcane bagasse and straw: a review of recent efforts in Brazil. **Applied biochemistry and biotechnology** v. 121 -124, p. 821-6, 2005.

GUERRA, A. A.. **Polimerização de lignina solúvel por Polifenoloxidasas e Peroxidase de Rabanete/H₂O₂**. 1998. Dissertação (Mestrado), Faenquil - Departamento de Biotecnologia, 1998.

IMPrensa OFICIAL, 2003. **Decreto no 47.700, de 11 de março de 2003**. Disponível em <http://www.imprensaoficial.com.br>. Acesso em 25 de janeiro de 2009.

KADLA, J. F.; CHANG, H. M.; JAMEEL, H. The reactions of lignins with high temperature hydrogen peroxide – Part 2. The oxidation of kraft lignin. **Holzforschung** v. n. 3, p. 277-284, 1999.

LEVENBERG, K. "A Method for the Solution of Certain Non-Linear Problems in Least Squares". **The Quarterly of Applied Mathematics** v. 2, p. 164–168, 1944.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das Reações Químicas**. 3. Ed. Edgard Blucher.. 2000. 564p ISBN: 852120275x.

LEVINE, N.M.. Removal of heavy metals from water. In: Schwoyer, W.L. K, **Polyelectrolytes for water and wastewater treatment**. 2. ed. New York: CRC Press, 1986. p. 47-59.

LORA, G. A. A. **Oxidação em meio ácido de ligninas obtidas por diferentes processos**, Processo IC FAPESP: 03/08241-5 (Relatório Final), 2005.

LUZ, S.M. **Lignina kraft de eucalipto: caracterização, oxidação e uso na remoção de metais pesados**. Lorena: FAENQUIL/ Departamento de biotecnologia,1998. (Projeto de iniciação científica – FAPESP 98/00968-3)

LUZ, S.M. **Celulose de bagaço de palha de cana-de-açúcar: Modificação química e aplicação em compósitos como reforço do polipropileno**. 2004. Tese (Doutorado). FAENQUIL - Departamento de Biotecnologia, 2004.

MADSEN, K.; NIELSEN, H.B; TINGLEFF, O. Methods for non-linear least squares problems [online]. 2nd Ed. Technical University of Denmark, April 2004,. Disponível em: <<http://www2.imm.dtu.dk>> Acesso em 21/03/2009

MARQUARDT, D.(1963). An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **SIAM Journal on Applied Mathematics**. v. 11. p. 431–441. DOI: 10.1137/0111030

MASON, W. H. Process and apparatus for disintegration of wood and the like. **US Patent 1.578.609**, 1926.

McDONOUGH, T.J., The chemistry of organosolv delignification. **Tappi J.** v. 76, n. 8, p. 186-193. 1993

McDOUGALL, G. J.; MORRISON, I. M.; STEWART, F.; WEYERS, J. D. B. R.; HILLMAN, J. R. Plant fibres: botany, chemistry and processing for industrial use. **J. Sci. Food Agric.**, v. 62, p. 1-20, 1993.

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico de Ligninas de Eucalyptus grandis.** Belo Horizonte, 1987. 175p. Dissertação (Mestrado em Química) - UFMG/ICEx, 1987.

MORAIS, S.A.L. **Contribuição ao estudo químico e espectroscópico da lignina de madeira moída do Eucalyptus grandis: Isolamento, quantificação e análise estrutural.** Belo Horizonte, 1992. 260p. Tese (Doutorado em Química) - UFMG/ICEx, 1992.

MORIYA, R.Y. **Uso de xilanases e lacases de microorganismos no branqueamento de polpas organosolv de palha de cana-de-açúcar e estudo dos derivados celulósicos obtidos.** Tese (Doutorado) USP – Escola de Engenharia de Lorena, 2007.

NAKANISHI, S. C.. **Avaliação da oxidação enzimática das ligninas de palha e bagaço de cana e da interação enzima-lignina.** Lorena: Escola de Engenharia Química de Lorena/ Departamento de Biotecnologia, 2006. (Projeto de iniciação científica – FAPESP 06/00124-8)

NOCEDAL, J.; WRIGHT, S. J. **Numerical Optimization**, 2nd Edition. New York: Springer. 2006. ISBN: 0-387-30303-0

OLIVEIRA, F. M. V. **Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol.** 2007. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2007.

PEREIRA, K. **Oxidação com lacase comercial e tirosinase extraída de maçãs usando ligninas de bagaço e palha de cana como substratos e avaliação da eficiência da reutilização das enzimas.** Lorena: Escola de Engenharia de Lorena - Departamento de Biotecnologia, 2008. (Projeto de iniciação científica - FAPESP 2007/0004-5)

PEREIRA, C. A.; SOUZA, M.C.O.; FERRAZ, A.; SILVA, F. T.; COTRIM, A. R., ROCHA, G. J. M. E BRUNS, R. E. A Mathematical Model for Estimating Release Rates of Diuron from Diuron/Sugar Cane Bagasse Formulations obtained under Different Conditions, In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS. 4. 1995. **Resumos.** Recife, p. 96.

PIMENTEL, M. F; BARROS-NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova.** v. 19, n. 3, p. 268-277. 1995

SAAD, M. B. W. **Avaliação Técnica e Econômica Preliminar da Produção de Etanol via Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2010. Dissertação (Mestrado), USP – Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

SADDLER, J. N., RAMOS, L. P., BREUIL, C. Steam pretreatment of lignocellulosic residues. **Biotech. Agric. Ser.**, v. 9, p. 73-91, 1993.

SALES, F. G.; ABREU, C. A. M.; PEREIRA, J. A. F. R. Catalytic Wet-Air Oxidation of Lignin in a Three-Phase Reactor with Aromatic Aldehyde Production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n.2, p. 211-218, 2004.

SALIBA, E.O.S., RODRIGUEZ, N.M., PILÓ-VELOSO, D., **Estudos de caracterização química das ligninas dos resíduos agrícolas de milho e de soja**. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 37, 2000.

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

SARKANEN, K. V. Chemistry of solvent pulping. **TAPPI pulping conference**. v. 73, n. 10, p. 215-219, 1990.

SEGEL, I. H. **Bioquímica: Teoria e Problemas**. Rio de Janeiro: Livros Tecnicos e Cientificos, 1979. 527 p.

SHATALOV, A. A., PEREIRA, H. Arundo donax L. reed: new perspectives for pulping and bleaching. Part 4. Peroxide bleaching of organosolv pulps. **Bioresource Technology**. v. 96, n. 8, p. 865-872, 2005.

SHELDON, R. A. E KOCHI, J. K. **Metal-Catalyzed Oxidation of Organic Compounds**, Academic Press, New York, p. 121-133, 315-328, 1981.

SILVA, F.T.; **Obtenção de insumos químicos a partir do aproveitamento integral do bagaço de cana**. 1995. Tese (Doutorado) - Instituto de Química – UNICAMP, 1995

SILVA, F. T.; PEREIRA, C. A.; COTRIM, A. R.; FERRAZ, A. E WILKINS, R. M. Studies of processing parameters on the release rates of diuron in controlled release formulations, BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 3, 1993. **Proceedings**, p. 265-268.

SILVA, R. D., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. For pulp improvement. **Journal of. Fermentation and. Bioengineering**, v. 77, p. 109-111, 1994.

SILVEY, S. D.; **Optimal design - an introduction to the theory for parameter estimation**. Chapman and Hall; London: 1980.

SOTO OVIEDO, M.A.. **Obtenção de Quelantes através da Oxidação Enzimática de Lignina de Bagaço de Cana**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Faenquil - Departamento de Biotecnologia, 1998.

SOUZA, J. A.; FERRAZ, A.; MEI, L. I.; SILVA, F. T.; COTRIM, A. E ROCHA, G. J. M. Influences of the Structural Lignin Characteristics on the Release Rate of the Herbicide 2,4D in Controlled Release System. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNIN AND OTHER WOOD COMPONENTS, 4, 1995. **Resumos**. Recife, p. 95.

TORRES, E. BUSTOS-JAIMES, I.; LE BORGNE, S.. Potencial use of oxidative enzyme for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis by Environmental**. v. 46, n.1, p.1-15, 2003.

UNICA, 2008. Moagem de cana 2008/09 supera safra anterior já na primeira quinzena de novembro. Disponível em: <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em 24 de outubro de 2009

VILLAR, J. C.; CAPEROS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Oxidation of hardwood Kraft-lignin to phenolic derivatives. Nitrobenzene and copper oxide as oxidants, **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 17, n.3, p. 259-285, 1997.

VILLAR, J.C.; CAPEROS, A.; GARCIA-OCHOA, F. Oxidation of hardwood Kraft-lignin to phenolic derivatives with oxygen as oxidant. **Wood Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 245-255, 2001.

WOOD, T.M.; SADDLER, J.N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods Enzymol.**, v.160, p.3-11, 1988

YANG, S. T. e OKOS, M.R.,. Kinetic study and mathematical modeling of methanogenesis of acetate using pure culture of methanogens. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p.661-667, 1987.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.367–375, 2008