UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de Lorena - EEL

EDUARDO KREBS KLEINGESINDS

Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado com ácido diluído e surfactante para a obtenção de bioetanol

EDUARDO KREBS KLEINGESINDS

Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado com ácido diluído e surfactante para a obtenção de bioetanol

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 Microbiologia Aplicada.

Orientadora:

Profa. Dra. Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues

Edição reimpressa e corrigida

LORENA - SP

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Kleingesinds, Eduardo Krebs
Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de
milho pré-tratado com ácido diluído e surfactante
para a obtenção de bioetanol / Eduardo Krebs
Kleingesinds; orientadora Rita de Cássia Lacerda
Brambilla Rodrigues - ed. reimp., corr. - Lorena,
2017.
92 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2017 Orientadora: Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues

1. Sabugo de milho. 2. Hidrólise enzimática. 3. Surfactante. 4. Bioetanol. 5. Shf. I. Título. II. Rodrigues, Rita de Cássia Lacerda Brambilla, orient.

Escolha um trabalho de que gostes, e nunca terás que trabalhar nem um dia na tua vida. Confúcio

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial da EEL - USP;

À bolsa concedida pela Capes;

A Novozymes pela doação da enzima utilizada no desenvolvimento do projeto;

À Professora Rita pela exímia orientação, oportunidade do desenvolvimento do presente projeto, valiosos ensinamentos e por me tornar um profissional mais criterioso;

Aos Professores Durval e Rogério Hein pela orientação e auxílio com o MEV e o DRX;

Ao André da secretaria por sempre esclarecer minhas dúvidas;

Aos técnicos do DEBIQ por todo o fundamental apoio operacional;

Aos parceiros de laboratório Álvaro, Erick e Talita pela companhia;

A Lisa e a Gabriela por toda a atenção e valiosas sugestões;

A meus pais Aron e Renate pelo suporte e compreensão ao longo de mais esta jornada;

À minha irmã, que por mais irritante que seja, foi de alguma ajuda;

Às minhas Tias Paulina, Ana e Mine pelo suporte e zelo de sempre;

Às Professoras Larissa e Patrícia por terem me dado à honra de tê-las como amigas;

À amiga Fábia por todos os inúmeros cafés da tarde e por ter sido paciente comigo;

Aos amigos de Ribeirão Preto Maria Laura, Letícia, Andressa, Ju Higino, Titia Mércia e Titio Rodrigo, que mesmo longe torceram por mim;

Aos amigos Júlio, Matheus, Godofredo, Ivo, Brunão, Paulo e Rodolfo pelos valiosos ensinamentos e convivência:

Ao Geraldo pela amizade, ensinamentos e paciência;

À Ana Karine que foi a primeira a me receber em Lorena e me ajudou do começo ao fim. Obrigado por sua amizade,

Muito obrigado!

RESUMO

KLEINGESINDS, E.K. Avaliação da hidrólise enzimática do sabugo de milho prétratado com ácido diluído e surfactante para a obtenção de bioetanol. 2017. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2017.

A exploração indiscriminada dos combustíveis fósseis vem alertando para o colapso próximo do suprimento de energia. Fontes alternativas vêm sendo exploradas com o propósito de apresentarem-se como combustíveis com o mesmo potencial, além de estarem inseridas em um contexto de desenvolvimento sustentável. O Brasil, por consolidar sua posição com forte mercado agroindustrial e dispor de uma grande variedade de unidades agrícolas possui como subprodutos uma alta quantidade de resíduos, como o sabugo de milho. Assim, buscam-se viabilizar metodologias que tornem a exploração desta fonte economicamente vantajosa para a obtenção de etanol de segunda geração (2G). Novas metodologias vêm propondo o emprego de tensoativos como aditivos tanto no prétratamento quanto na hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos. Neste contexto, o presente trabalho objetivou estudar a hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por ácido diluído na presença de diferentes concentrações do tensoativo Tween 80 em associação com a dosagem do complexo enzimático Cellic CTec2 para a obtenção de um hidrolisado rico em glicose para obtenção de etanol pela levedura Scheffersomyces stipitis CBS 6054 através do processo SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation). Os ensaios foram conduzidos de acordo com planejamento experimental 2³ com face centrada e 3 repetições no ponto central. As variáveis estudadas foram: concentração de surfactante no pré-tratamento e na hidrólise enzimática e dosagem do complexo enzimático. Os resultados mostraram que o uso do surfactante no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído surtiu maior efeito na remoção de lignina e hemicelulose quando empregado na concentração de 10% (m/m). Nesta condição foi possível observar um aumento (21,1%) na perda de celulose em relação ao pré-tratamento sem a presença de surfactante. A maior diminuição na cristalinidade (81,23%) foi com o uso de 10% do tensoativo. A análise da superfície de resposta permitiu determinar as condições ótimas do processo SHF para obtenção de máximo rendimento em glicose (entre 80 e 90 %) que foi quando a concentração de surfactante no pré-tratamento aumentou de 0 a 10 % (m/m) mantendo-se constante em seu nível superior a concentração de surfactante na hidrolise enzimática (10 % m/m) com redução na dosagem de enzima (25,50 FPU/g_{material lignocelulósico seco}). Nestas condições experimentais obteve-se favorecimento no rendimento em glicose (80,54%) e concentração em glicose (61,98 g/L) no meio reacional concomitantemente com o favorecimento no rendimento em xilose (70,66%). Esta levedura fermentou concomitantemente os acúcares (glicose, xilose e celobiose) a etanol com elevados fator de conversão (0,37 g/g) e produtividade volumétrica (1,02 g_{etanol}/L.h). A velocidade especifica máxima de consumo destes açúcares foi favorecida na seguinte ordem: glicose, celobiose e xilose. Após esta fermentação foi obtido um material com uma superfície mais porosa e fragmentada. Este fato evidenciou que o complexo enzimático agiu eficientemente quebrando a celulose cristalina obtendo um material amorfo. Espera-se que este trabalho tenha contribuído para o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para a produção de etanol por via biotecnológica a partir da fração lignocelulósica do sabugo de milho, a fim de mitigar os impactos ambientais intrínsecos ao processo.

Palavras-chave: Sabugo de milho. Hidrólise enzimática. Surfactante. Bioetanol. SHF.

ABSTRACT

KLEINGESINDS, E.K. Evaluation of enzymatic hydrolysis of pretreated corn cob with dilute acid and surfactant in getting bio-ethanol. 2017. 92 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2017.

The indiscriminate exploitation of fossil fuels has been warning of the near collapse of the energy supply. Alternative sources have been explored with the purpose of presenting themselves as fuels with the same potential, besides being inserted in a context of sustainable development. Brazil, by consolidating its position with a strong agroindustrial market and having a wide variety of agricultural units, has as a by-product a high amount of waste, such as corn cob. Thus, we seek to make feasible methodologies that make the exploitation of this source economically advantageous to obtain second generation ethanol (2G). New methodologies have proposed the use of surfactants as additives in both pretreatment and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. In this context, the present work aimed to study the enzymatic hydrolysis of diluted-acid pretreated corn cob in the presence of different concentrations of the Tween 80 surfactant in combination with the dosage of the Cellic CTec2 enzymatic complex to obtain a glucose rich hydrolysate to produce ethanol by the yeast Scheffersomyces stipitis CBS 6054 in SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation) process. The experiments were conducted according to experimental design 2³ with centered face and 3 repetitions at the central point. The variables studied were: concentration of surfactant in the pretreatment and in the enzymatic hydrolysis and dosage of the enzymatic complex. The results showed that the use of surfactant in the pretreatment with diluted sulfuric acid had a greater effect on the removal of lignin and hemicellulose when used at the concentration of 10% (w/w). In this condition, the cellulose content was decreased by 21.1% as compared with the amount presents in the diluted-acid corn cob pretreatment without surfactant. The greatest decrease in crystallinity (81.23%) was with the use of 10% of the surfactant. The response surface analysis allowed to determine the optimum conditions of the SHF process to obtain maximum glucose yield (between 80 and 90%), when the pre-treatment surfactant concentration increased from 0 to 10% (w/w) with a reduction in the enzyme dosage (25,50 FPU/g dry lignocellulosic material) at a higher level than the surfactant concentration in the enzymatic hydrolysis. In these experimental conditions, glucose yield (80.54%) and glucose concentration (61.98 g/L) in the reaction medium were favored concomitantly with xylose yield (70.66%). This yeast concomitantly fermented the sugars (glucose, xylose and cellobiose) to ethanol with high conversion factor (0.37 g/g) and volumetric productivity (1.02 g_{ethanol}/L.h). The maximum specific velocity of consumption of these sugars was favored in the following order: glucose, cellobiose and xylose. After this fermentation was obtained a material with a more porous and fragmented surface. This fact evidenced that the enzymatic complex acted efficiently breaking down the crystalline cellulose obtaining an amorphous material. It is hoped that this work had contributed to the development of an alternative technology to produce ethanol by Biotechnological route from the corn cob lignocellulosic fraction in order to mitigate the environmental impacts intrinsic to the process.

Keywords: Corn cob. Enzymatic hydrolysis. Surfactant. Bio-ethanol. SHF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 –	Evolução de emissão de dióxido de carbono no período de 1980-2009	
	em diferentes países	19
Figura 3.2 –	Composição lignocelulósica de biomassas distintas	22
Figura 3.3 –	Estrutura da celobiose	23
Figura 3.4 –	Representação das ligações de hidrogênio na molécula de celulose	23
Figura 3.5 –	Unidades monossacarídicas constituintes das polioses	24
Figura 3.6 –	Estrutura química da arabino-4-O-metilglucoxilana de madeiras moles	25
Figura 3.7 –	Esquema estrutural das unidades precursoras da lignina	25
Figura 3.8 –	Representação de uma macromolécula de lignina	26
Figura 3.9 –	Principais regiões produtoras de milho no mundo	27
Figura 3.10 –	Plantio e colheita do milho em diferentes países	28
Figura 3.11 –	Sabugo de milho granulado	29
Figura 3.12 –	Partes do sabugo de milho: (a) palha fina; (b) palha grossa; (c) anel	
	lenhoso; (d) núcleo central do sabugo	29
Figura 3.13 –	Esquema dos diferentes pré-tratamentos empregados em biomassa	
	vegetal	30
Figura 3.14 –	Representação da hidrólise ácida de biomassa	31
Figura 3.15 –	Representação da catálise enzimática para geração de glicose a partir de celulose	
Figura 3.16 –	Representação da formação de uma emulsão por um surfactante não	
	iônico. Uma região hidrofílica (representado em azul) e outra	
	hidrofóbica (representado como cauda apolar)	34
Figura 3.17 –	Representação da estrutura química de Tween 80	35
Figura 3.18 –	Representação do pré-tratamento de material lignocelulósico e a ação	33
	de enzimas na desconstrução de celulignina a glicose e de	
	hemicelulose a xilose	37
Figura 4.1 –	Extração exaustiva em Soxhlet com etanol para a completa remoção	
	dos extrativos	47
Figura 5.1 –	Fotomicrografias de MEV para o sabugo in natura mostrando a	
	região do anel lenhoso (a-b) que envolve a medula, (c-d)	58

Figura 5.2 –	Fotomicrografias de MEV (magnificação de 1000 vezes) das	
	superfícies dos sabugos de milho in natura (a) e submetidos ao pré-	
	tratamento ácido com surfactante <i>Tween 80</i> : SM-0% (b); SM-5% (c)	59
	e SM-10% (d)	
Figura 5.3 –	Difratograma de raios X dos sabugos de milho in natura (SM-in	
	natura) e após pré-tratamento ácido em presença de surfactante nas	60
	concentrações (%,m/m) de: 0 (SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%)	
Figura 5.4 –	Interações dos fatores significativos na resposta rendimento em	
	glicose (Y ₁)	70
Figura 5.5 –	Superfície de resposta e curvas de contorno para o rendimento em	
	glicose (%) em função dos valores codificados para a concentração do	
	surfactante na hidrólise enzimática (X_2) e dosagem de enzima (X_3)	70
Figura 5.6 –	Concentração de açúcares em função do tempo da hidrólise enzimática do	
	sabugo de milho na condição otimizada	73
Figura 5.7 –	Concentração dos açúcares glicose, xilose, celobiose; produção de	
	etanol e crescimento celular por Scheffersomyces stipitis CBS 6054	
	em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob condições	
	otimizadas de hidrólise enzimática (SHF)	75
Figura 5.8 –	Velocidades específicas em função do tempo de cultivo de S. stipitis	
	CBS 6054 em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob	
	condições otimizadas de hidrólise enzimática de: consumos de glicose	
	$(\mu_{s\text{-glicose}}),$ xilose $(\mu_{s\text{-xilose}})$ e celobiose $(\mu_{s\text{-celobiose}});$ produção de etanol e	
	crescimento celular (µ _x)	77
Figura 5.9 –	Fotomicrografias de MEV (magnificação de 1000 vezes) da superfície	
	do sabugo de milho submetido ao pré-tratamento ácido com	
	surfactante Tween SM-10% (a) com subsequente hidrólise enzimática	
	(b)	79
Figura 5.10 –	Difratograma de raios X do sabugo de milho submetido ao pré-	
	tratamento ácido com surfactante Tween (SM-10%) e SM-10% após	
	hidrólise enzimática (SHF)	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 –	Diferentes tipos de lignina	26
Tabela 4.1 –	Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2 ³ completo	43
Tabela 4.2 –	Matriz estatística apresentando os níveis codificados e naturais de um	
	planejamento fatorial 2 ³ com face centrada e 3 repetições no ponto	
	central	44
Tabela 5.1 –	Composição química do sabugo de milho in natura (SM) e do sabugo	56
	de milho após pré-tratamento ácido com surfactante nas	
	concentrações (% m/m) de: 0 (SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%)	
Tabela 5.2 –	Cristalinidade dos sabugos de milho in natura e após pré-tratamento	
	ácido em presença de surfactante nas concentrações (%,m/m) de: 0	
	(SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%)	61
Tabela 5.3 –	Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir do	
	pré-tratamento ácido do sabugo de milho com surfactante nas	
	concentrações (%,m/m) de: 0 (HSM-0%), 5 (HSM-5%) e 10 (HSM-	
	10)	63
Tabela 5.4 –	Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2 ³	
	com face centrada (6 pontos) e 3 repetições no ponto central para os	
	três fatores $(X_1, X_2 e X_3)$ e resposta (Y_1)	65
Tabela 5.5 –	Coeficientes de regressão para a resposta rendimento em glicose, \mathbf{Y}_1	
	(%)	67
Tabela 5.6 –	Análise de variância (ANOVA) para a obtenção de um hidrolisado	
	rico em glicose utilizando o complexo CellicCTec2 seguindo um	
	planejamento fatorial 2 ³ com face centrada e 3 repetições no ponto	
	central	68
Tabela 5.7 –	Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para	
	validação dos modelos	72
Tabela 5.8 –	Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto	
	ótimo do processo de hidrolise enzimática do sabugo de milho pré-	
	tratado com ácido sulfúrico diluído em associação com surfactante	72
Tabela 5.9 –	Parâmetros fermentativos do cultivo de S. stipitis CBS 6054 para	
	produção de etanol em hidrolisado celulósico de sabugo de milho	
	obtido sob condições otimizadas de hidrólise enzimática	76

Sumário

1	INTRODUÇAO	15
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	Panorama energético	19
3.2	Materiais lignocelulósicos	21
3.2.1	Celulose	22
3.2.2	Hemicelulose	24
3.2.3	Lignina	25
3.2.4	Extrativos	27
3.3	Sabugo de milho	27
3.4	Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	29
3.4.1	Pré-tratamento ácido	30
3.5	Hidrólise enzimática	31
3.6	Tensoativos no pré-tratamento e na hidrólise enzimática	33
3.7	Produção de etanol celulósico por Scheffersomyces stipitis CBS 6054	35
3.8	Hidrólise e Fermentação Separada (SHF) e Hidrólise e Fermentação Simultânea (SSF)	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	Obtenção do sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e surfactante	41
4.1.1	Matéria-prima: obtenção e preparo do sabugo de milho	41
4.1.2	Pré-tratamento ácido do sabugo de milho na presença de surfactante	41
4.2	Hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado	42
4.2.1	Enzima	42
4.2.2	Hidrólise enzimática	42
4.3	Fermentação	45
4.3.1	Microrganismo e obtenção de inóculo para a realização da SHF	45
4.3.2	Meio de fermentação, condições de fermentação para a realização da SHF	45
4.4	Métodos analíticos	46
4.4.1	Determinação do teor de umidade do sabugo de milho	46
4.4.2	Análise composicional do sabugo de milho sem tratamento e após diferentes pré-	
trata	mentos	46
4.4.3	Dosagem da atividade enzimática do coquetel comercial	50
4.4.4	3	
4 4 5		
4.4.5		
4.4.6	Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	52

4.4.7 milho	Determinação do pH e condutividade elétrica do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de
4.5	Caracterização de celulignina
4.5.1	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV
4.5.2	Análise cristalográfica por Difratometria de Raios X
4.6 l	Determinação dos Parâmetros Fermentativos
4.6.1	Fator de Conversão de açúcares em etanol e de açúcares em células
4.6.2	Produtividade Volumétrica de etanol (Q _p)
4.6.3	Eficiência de Conversão (η)
4.6.4	Velocidades Instantâneas e Específicas
5 l	RESULTADOS E DISCUSSÃO56
5.1	Análise composicional do sabugo de milho
5.2	Caracterização de celulignina após pré-tratamento ácido
5.2.1	Análise morfológica do sabugo de milho por microscopia eletrônica de varredura57
5.2.2	Análise cristalográfica do sabugo de milho por difratometria de raios X60
sabug	Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho após pré-tratamento do go de milho com ácido sulfúrico diluído empregando como aditivo surfactante em diferentes entrações
5.4 1	Estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré tratado por ácido diluído na presença ferentes concentrações de surfactante: metodologia de análise de superfície de resposta 64
	Obtenção de bioetanol pelo processo de hidrólise e fermentação separada (SHF) em condições zadas para maior rendimento de glicose
morfo	Caracterização de celulignina após pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática: análise blógica por microscopia eletrônica de varredura e análise cristalográfica por difratometria de X
6 (CONCLUSÕES81
7 5	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS83
REFE	ERÊNCIAS

1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis como o petróleo, carvão mineral e gás natural contribuem em 80% para o suprimento energético mundial. Entretanto, a escassez iminente destas fontes não renováveis de energia ocasiona alterações no suprimento da cadeia produtiva e consequentes desdobramentos econômicos para as grandes potências mundiais.

A busca por novas matrizes energéticas renováveis está mobilizando setores acadêmicos, industriais e governamentais no desenvolvimento de processos biotecnológicos que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração (PEREIRA et al., 2010). A utilização de etanol é benéfica por diversas razões, entre as quais, por ser facilmente integrado no atual sistema de distribuição de combustível, e, por reduzir a produção de gases do efeito estufa, uma vez que se utiliza de biomassa vegetal como matéria-prima.

Os resíduos agrícolas são materiais lignocelulósicos, compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, e podem servir como fonte de biomassa renovável na produção de açúcares solúveis (hexoses e pentoses) que através de processos químicos, enzimáticos e fermentativos podem fornecer combustíveis líquidos e uma variedade de produtos químicos, fornecendo assim uma plataforma para biorrefinarias, em uma base sustentável. Como exemplo tem-se o sabugo de milho que rende aproximadamente 18 kg (70 % base úmida) após o processamento de 100 kg de espigas de milho e que atualmente é retornado à lavoura ou utilizado como ração animal. É um residuo em abundância, visto que na safra de 2014/2015, os produtores brasileiros colheram um volume recorde de 85,4 milhões de toneladas de milho que encerrou com estoques em níveis históricos de mais de 14 milhões de toneladas (AGUIAR, 2010; CONAB, 2015).

A produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica envolve três principais etapas: pré-tratamento; hidrólise enzimática (ou sacarificação); e fermentação de hexoses e pentoses.

Devido à presença de lignina, as paredes das células vegetais são altamente recalcitrantes tanto à degradação microbiana quanto à mecânica, e um dos principais desafios refere-se à conversão enzimática da celulose em açúcares fermentáveis (LEE et al., 2010). A fim de hidrolisar eficientemente a hemicelulose e a celulose em açúcares monoméricos fermentescíveis é necessário o pré-tratamento desta biomassa tornando esse material mais acessível às enzimas de sacarificação. Assim, o pré-tratamento é considerado um dos passos mais importantes na produção de etanol, uma vez que tem um grande impacto em todas as

demais etapas do processo de conversão. Pode se utilizar de métodos físicos (moagem, trituração); químicos (alcalino, ácido diluído), térmico (tratamento á vapor); e métodos biológicos (degradação por fungos) ou uma combinação destes métodos.

A hidrólise enzimática, por sua vez, é um dos passos mais dispendiosos na produção de bioetanol, principalmente devido ao preço de celulases e as elevadas doses necessárias. Ser capaz de reduzir a carga de enzima é, portanto, muito desejável. Neste sentido, tem-se o complexo enzimático Cellic CTec2 desenvolvido pela Novozymes A/S especialmente para a sacarificação de biomassa lignocelulósica que em comparação com outros complexos enzimáticos apresenta menor custo, pode ser utilizado em menor dosagem, e maior estabilidade frente aos inibidores sem a necessidade de seu enriquecimento com β-glucosidase como no caso da Celluclast 1.5 L FG considerada um complexo enzimático padrão na área de lignocelulósicos. Além disso, foi demonstrado que o uso de aditivos como surfactantes (agentes tensoativos) aumentam significativamente a eficiência da hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos, permitindo aumentar a velocidade de hidrólise e ou reduzir a dosagem de enzimas (ERIKSSON et al., 2002).

A hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em separado (SHF), ou simultaneamente, utilizando sacarificação simultânea á fermentação (SSF). Durante a última década, o SSF tornou-se o processo preferido, uma vez que a inibição do produto final das enzimas pode ser evitada através da realização de fermentação concomitantemente com a hidrólise enzimática. Em SSF também se observa a redução no custo de investimento da instalação, por requerer um número menor de tanques. No entanto, uma desvantagem do processo SSF é que a temperatura do processo deve ser em função das temperaturas ótimas de hidrólise enzimática e fermentação, enquanto que no processo SHF estas podem ser otimizadas independentemente.

No Brasil, em 2014, foram inauguradas duas indústrias de etanol celulósico, a Granbio, em Alagoas-AL, e a Raízen, em Piracicaba-SP que empregam os processos SSF e SHF, respectivamente. A GranBio, primeira empresa brasileira a produzir bioetanol de segunda geração (2G) em escala comercial, utiliza a tecnologia de uma empresa Italiana, a PROESA constituída pelas etapas de pré-tratamento por explosão à vapor; hidrólise enzimática e fermentação de pentoses e hexoses. Esta empresa afirma que este produto ainda não possui um preço competitivo à tecnologia de produção de etanol de primeira geração (1G) necessitando melhorias no processo para diminuição dos custos operacionais, e obtenção de um produto a um custo mais reduzido. Esta empresa declarou, em abril de 2016, suspensão temporária da produção deste biocombustível devido a problemas na etapa inicial de

produção. Esta foi a segunda paralisação sofrida pela usina que alega ser o pré-tratamento o seu maior problema, fase em que a biomassa é preparada para que as enzimas consigam aproveitar todos os açúcares.

Estudos envolvendo sabugo de milho são pioneiros nos EUA uma vez que a principal fonte de etanol no país é o milho, e, por conseguinte, o principal resíduo agroindustrial é o sabugo de milho. No Brasil, estudos envolvendo a hidrólise enzimática do sabugo de milho vêm sendo desenvolvidos na Universidade Federal de São Carlos, na Universidade Federal de Alagoas, e na Universidade de São Paulo, na Escola de Engenharia de Lorena.

Neste contexto, este trabalho teve como desafio hidrolisar de forma eficiente as paredes celulares do sabugo de milho em açúcares fermentáveis (também conhecido como sacarificação) através da abordagem de dois aspectos-chaves da produção de bioetanol celulósico: pré-tratamento e otimização do uso de enzimas.

A proposta envolveu a realização do pré-tratamento do sabugo de milho com ácido sulfúrico diluído empregando como aditivo surfactante em diferentes concentrações. Além disso, o estudo avaliou também a adição de surfactante em associação com a dosagem do complexo enzimático Cellic CTec2 (Novozymes A/S) durante a hidrólise enzimática do resíduo sólido obtido após esse pré-tratamento ácido. Assim, o hidrolisado rico em glicose resultante, foi utilizado para produção de bioetanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 pelo processo SHF. Espera-se com esse trabalho ter contribuído para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de etanol por via biotecnológica, a partir da fração lignocelulósica do sabugo de milho.

2 OBJETIVOS

Geral:

• Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de etanol por via biotecnológica, a partir da fração lignocelulósica do sabugo de milho.

Específicos:

- Realizar o pré-tratamento do sabugo de milho com ácido sulfúrico diluído empregando como aditivo surfactante em diferentes concentrações.
- Realizar a análise composicional, morfológica e cristalográfica do sabugo de milho após as diferentes condições de pré-tratamento.
- Estudar a hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por ácido diluído na
 presença de diferentes concentrações de surfactante em associação com a dosagem de
 enzima e adição de surfactante ao meio reacional na obtenção de um hidrolisado rico
 em glicose.
- Realizar na condição otimizada de hidrólise enzimática do sabugo de milho prétratado a fermentação em separado (SHF) para produção de etanol pela levedura Scheffersomyces stipitis CBS 6054.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Panorama energético

Uma preocupação recorrente no âmbito internacional refere-se à situação do suprimento energético mundial e seus desdobramentos. A principal questão desses debates diz respeito à dependência da energia fóssil decorrente de sua versátil aplicabilidade. Na tentativa da mitigação dos impactos ambientais decorrentes dos gases emitidos pela queima dos combustíveis fósseis, a utilização de alternativas de caráter renovável vem se destacando como, por exemplo, a energia proveniente de biomassa utilizada na produção de biodiesel e o etanol.

Com relação aos países que são os maiores emissores de CO₂, o Brasil aparece na 12^a posição com 425,17 milhões de toneladas de CO₂ emitidos em 2009 (Figura 3.1). Nas primeiras posições encontram-se a China (7706,83 milhões de toneladas), EUA (5424,23 milhões de toneladas), Índia (1591,13 milhões de toneladas), Rússia (1556,66 milhões de toneladas) e Japão (1097,96) (EIA, 2009) (Figura 3.1).

9000 Emissão de CO₂ (milhões de toneladas) 8000 7000 6000 Brasil Índia 5000 **▲** China 4000 × Rússia 3000 **X** EUA 2000 Japão 1000 0 1975 1980 1985 1990 1995 2010 2015 2000 2005 Tempo (ano)

Figura 3.1 – Evolução de emissão de dióxido de carbono no período de 1980-2009 em diferentes países.

FONTE: Adaptado de EIA (2009).

Em 2014 80,5% da energia consumida pelo setor de transporte brasileiro era proveniente de fonte não renovável (BRASIL, 2015). Dados do Ministério dos Transportes (BRASIL, 2015) apontam que fontes renováveis já têm uma representatividade de 43,5% do total da matriz energética do país sendo que deste valor, 18,1% é proveniente da cana de açúcar utilizada para a obtenção de etanol e eletricidade (bagaço de cana).

Em 6 de agosto de 1997 foi promulgada a lei nº 9478 que dispõe sobre a política energética nacional, institui o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) e Agência Nacional do Petróleo (ANP). Abaixo, estão descritos alguns incisos do artigo 1 que dispõe sobre os princípios e objetivos da política energética nacional diretamente relacionados a produção de biocombustíveis.

- XII incrementar, em bases econômicas, sociais e ambientais, a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional;
- XV promover a competitividade do país no mercado internacional de biocombustíveis;
- XVII fomentar a pesquisa e o desenvolvimento relacionado à energia renovável;
- XVIII mitigar as emissões de gases causadores de efeito estufa e de poluentes nos setores de energia e de transportes, inclusive com o uso de biocombustíveis.

Atualmente, o bioetanol a disposição do comércio é o chamado etanol de 1ª geração. No Brasil, a principal matéria prima para a produção de etanol de 1ª geração é a cana-de-açúcar por ser constituída por açúcares diretamente fermentecíveis. Nos Estados Unidos a principal fonte de etanol são matérias primas amiláceas, como o milho, cujo amido deve ser convertido em açúcares previamente, para então ser fermentado (MANOCHIO, 2014). De acordo com o Ministério de Minas e Energia, em 2014 a produção de etanol alcançou seu ápice: 28,6 bilhões de litros. As usinas produtoras de etanol no Brasil se concentram na região centro sul do país com maior número no estado de São Paulo. Atualmente existem 341 produtores de etanol no país, sendo 300 delas na região centro sul (87,9%), das quais 159 em São Paulo (46,7%) (BRASIL 2013; CONAB, 2015).

No Brasil já existe a produção de etanol proveniente do milho. A usina Usimat, localizada no Mato Grosso, é a pioneira como usina brasileira a se utilizar do milho como fonte de etanol no período de entressafra da cana-de-açúcar. Atualmente, outras duas usinas de cana-de-açúcar estão produzindo etanol de milho no período de entressafra: a Libra e a Porto seguro, localizadas nos municípios de São José do Rio Claro e Jaciara, respectivamente. Na safra de 2015/2016, as três usinas produziram 114 milhões de litros de etanol de milho. (NOVACANA, 2016).

Com relação à viabilidade energética e econômica, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o propósito de se avaliar o gasto energético envolvido em todas as etapas da cadeia de suprimento de etanol de forma a torná-lo competitivo no mercado. Em 2015 o perfil de consumo de combustíveis no Brasil revelou uma alta adesão ao etanol que representou um aumento de 39,2% no consumo. A gasolina, por sua vez, teve uma redução de 8,6% assim como o GNV -8,5%, e o Diesel -5% (SINDICOM, 2015).

O etanol, por produzir maior calor de vaporização e propiciar elevada octanagem é utilizado como combustível puro, ou pode ser misturado aos derivados do petróleo, como a gasolina (HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

A busca pela expansão da produção de novos combustíveis sustentáveis deve ser cautelosa de forma a não comprometer a segurança alimentar e garantir o suprimento de combustível. Neste cenário, surge o estudo do processo de obtenção do bioetanol de segunda geração (etanol 2G) que assimila esses dois pré-requisitos oferecendo um combustível de qualidade que utiliza como matérias primas resíduos florestais e agroindustriais excedentes. Através de rotas químicas e/ou bioquímicas, é possível obter etanol, agregando valor ao produto sem oferecer risco a nenhum outro setor da cadeia produtiva (PEREIRA et al., 2010; SOCCOL et al., 2009).

3.2 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos correspondem à biomassa vegetal, que é a fonte renovável de carbono mais abundante no planeta. Define-se biomassa como todo e qualquer tipo de matéria orgânica proveniente de fontes vegetais ou animais, ou de seus processamentos industriais. A reutilização e reciclagem destes subprodutos minimizam impactos ambientais relacionados ao seu acúmulo, além de serem potenciais matérias-primas para a geração de fontes energéticas alternativas ao uso de combustíveis fósseis (DAGNINO et al., 2012). Neste âmbito, a implantação de novas tecnologias viabiliza o reaproveitamento de resíduos agroindustriais como matérias-primas a serem utilizados na área de novos combustíveis. Dentre os resíduos de maior importância destacam-se: bagaço e palha de cana; sabugo e palha de milho; palhas de trigo e arroz (SANTOS et al., 2011).

No Brasil, pesquisas nas áreas de tecnologias de conversão de biomassa por rotas biotecnológicas estão sendo bem aderidas por grandes centros e universidades, por serem tecnologias limpas inseridas em um contexto de desenvolvimento sustentável. Além disso, por possuir um amplo espectro de fontes econômicas, pesquisas na área oferecem a

oportunidade para o desenvolvimento e instalação de biorrefinarias colocando o país em posição de prestígio e destaque, frente às grandes potências mundiais.

A composição química destes materiais é complexa encontrando-se majoritariamente os polissacarídeos celulose (35-50%) e hemicelulose (20-35 %), que estão entremeados pela macromolécula polifenólica, conhecida como lignina (10-25 %) (RABELO, 2007). As proporções e composição química de lignina e hemicelulose variam em madeiras duras e moles, com a celulose uniforme em todo tipo de madeira (FENGEL; WEGENER, 1989). Algumas fontes importantes de materiais lignocelulósicos e sua composição química estão apresentadas na Figura 3.2.

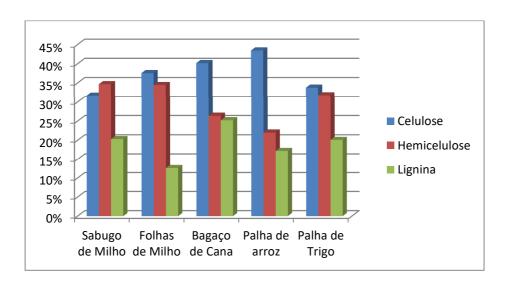


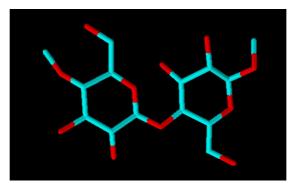
Figura 3.2 – Composição lignocelulósica de biomassas distintas.

FONTE: (CRUZ et al., 2000); (NEUREUTEIR et al., 2002); (MUSSATO, ROBERTO 2002); (CANDIDO et al., 2002).

3.2.1 Celulose

A celulose, polímero linear mais abundante na natureza, é constituída por unidades anidroglucopiranosídicas unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4). Seu tamanho é em função de seu grau de polimerização, que por sua vez representa o número de unidades glucopiranosídicas presentes em uma cadeia. Duas moléculas de glucose unem-se formando a unidade repetitiva da celulose, a celobiose (FENGEL, 1989). A Figura 3.3 apresenta a estrutura da celobiose.

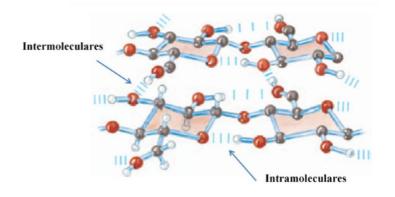
Figura 3.3 – Estrutura da celobiose.



FONTE: Arquivo pessoal.

Através dos grupos OH livres das moléculas de celulose, ocorrem ligações de hidrogênio que podem ser de dois tipos: intramoleculares e intermoleculares. Interações entre duas moléculas de glicose adjacentes na mesma molécula de celulose são denominadas como ligações intramoleculares e são responsáveis por conferir certo caráter de rigidez para cada cadeia. Há ainda ligações de hidrogênio entre grupos OH livres de diferentes cadeias de celulose. A essas ligações atribui-se o nome de ligações intermoleculares, responsável pela formação de estruturas supramoleculares (figura 3.4) (LEWIN, 1991). A Figura 3.4 apresenta as ligações de hidrogênio na molécula de celulose.

Figura 3.4 – Representação das ligações de hidrogênio na molécula de celulose.



FONTE: (SANTOS, 2010).

As estruturas primárias resultantes das ligações de hidrogênio são conhecidas como fibrilas elementares, que constituem a parede celular. Essas estruturas podem conter regiões cristalinas, devido à presença de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares, ou regiões amorfas (FENGEL, 1989). A energia do reticulo cristalino, decorrente das ligações de

hidrogênio, faz com que as moléculas da celulose ganhem uma energia de estabilização muito grande, tornando-a pouco reativa e extremamente sólida. Assim, para que haja a solubilização da celulose se faz necessária a degradação das estruturas fibrilares que se dá pelo inchamento das mesmas e inserção de grupos químicos resultando na quebra das ligações intermoleculares obtendo como produto o a glicose em solução (FENGEL, 1989).

3.2.2 Hemicelulose

Além da celulose, a madeira e outros tecidos vegetais são compostos por um grande número de polissacarídeos, as polioses, também conhecidas como hemicelulose (HON, 1996). São heteropolímeros, classificados de acordo com as unidades monossacarídicas (Figura 3.5) que as constituem, como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metilglucurônico e ácido galacturônico) (PITARELO, 2007).

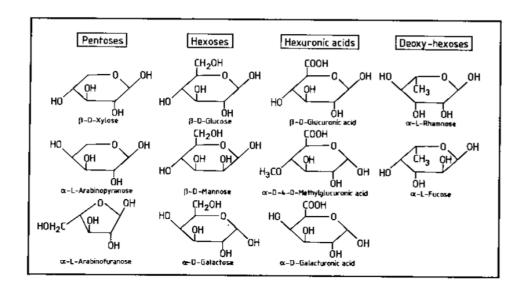


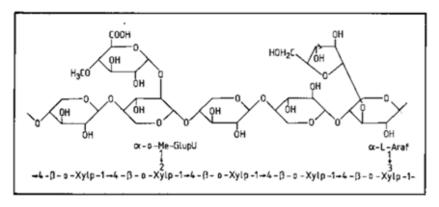
Figura 3.5 – Unidades monossacarídicas constituintes das polioses.

Fonte: (FENGEL, 1989).

A cadeia principal de uma poliose pode ser constituída por um açúcar (homopolímero - xilanas) ou por mais de um açúcar (heteropolímero - glucomananas) (Figura 3.6). As unidades de pentoses, hexoses e ácidos urônicos são unidos por ligações β -(1 \rightarrow 4) com pontos de ramificações (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3) e/ou (1 \rightarrow 6) (ALMEIDA, 2009). As polioses se apresentam em forma de bastonete, com cadeias laterais dobradas para trás na cadeia principal

por meio de ligações de hidrogênio (RAMOS, 2003), propiciando uma estabilidade ao conjunto, quando associada à celulose e lignina (LAUREANO-PEREZ et al., 2005).

Figura 3.6 – Estrutura química da arabino-4-O-metilglucoxilana de madeiras moles.



FONTE: (FENGEL, 1989).

3.2.3 Lignina

A lignina é um polímero aromático de natureza fenólica, constituída pelos álcoois p-cumarílico, coniferílico, sinapílico (Figura 3.7), em diferentes proporções que diferem de uma espécie vegetal para outra, ou mesmo na mesma espécie vegetal levando em consideração fatores tais como região geográfica, idade da planta, estação do ano (FERNANDES, 2005).

Figura 3.7 – Esquema estrutural das unidades precursoras da lignina.

Álcool p-cumarílico

Álcool coniferílico

Álcool sinapílico

FONTE: Arquivo pessoal.

O tipo de lignina é classificado de acordo com a unidade constituinte majoritária, conforme a Tabela 3.1.

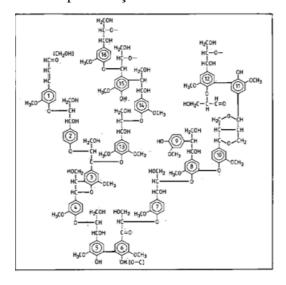
Tabela 3.1 – Diferentes tipos de lignina.

Fonte	% de Lignina	Composição
Madeiras moles Softwoods (gimnospermas ou coníferas)	27-33	Lignina guaiacila (G) – contém principlamente as unidades de guaiacila – cerca de 90% derivada do álcool coniferílico
Madeiras duras Hardwoods (angiospermas ou folhosas)	18-25	Lignina guaiacila-siringila (GS) – contém quantidades semelhantes de unidades de guaiacila e siringila
Gramíneas grasses	17-24	Lignina p-hidroxifenila-guaiacila (HGS) contém maior quantidade de unidades de p-hidroxifenila do que a encontrada em madeiras coníferas ou folhosas, mas em proporções menores do que as outras unidades.

FONTE: (SANTOS, 2011).

A lignina possui uma estrutura tridimensional (Figura 3.8), amorfa, e ramificada, e é constituinte da porção de não carboidratos da parede celular, responsável por conferir rigidez, força e flexibilidade a ela (FENGEL, 2003). Propicia recalcitrância à biomassa, dificultando o acesso a hemiceluloses por estarem quimicamente ligadas a ela (FENGEL, 1989).

Figura 3.8 – Representação de uma macromolécula de lignina.



FONTE: (FENGEL, 1989).

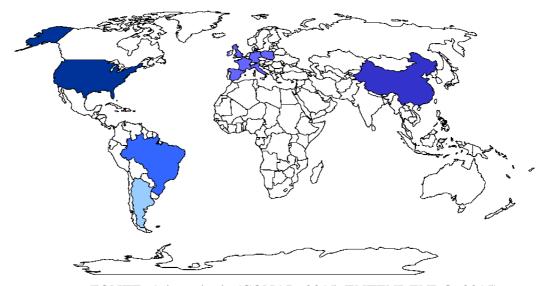
3.2.4 Extrativos

Os materiais lignocelulósicos são constituídos também por pequenas quantidades de compostos fenólicos, proteínas, cinzas inorgânicas, amido e ácidos graxos. Essas substâncias apresentam importância na proteção contra pragas e metabolismo da planta. No entanto, essas substâncias apresentam efeito inibitório aos processos de conversão de biomassa (FENGEL; WEGENER, 1989). Estes compostos são de grande valia na indústria de aromatizantes e algumas vezes em pesquisas relacionadas à fitoterapia (MARSTON; HOSTETTMANN, 2009).

3.3 Sabugo de milho

Atualmente, a perspectiva da agricultura brasileira coloca o país em posição favorável. A cultura do milho, por sua vez, se consolida como a segunda cultura de maior importância, ficando atrás apenas da cultura da soja. Dados da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab, setembro/15) mostram que a safra 2014/2015 produziu 84.672,4 mil toneladas, representando um acréscimo de 5,8% em relação à produção passada, que atingiu 80.051,7 mil toneladas. Com essa produção, o Brasil fica atrás apenas dos Estados Unidos e da China (Figura 3.9).

Figura 3.9 – Principais regiões produtoras de milho no mundo. Maiores produtores representados em azul mais escuro.



FONTE: Adaptado de (CONAB, 2015; ENTENDENDO, 2015).

A cultura do milho pode ser classificada como uma cultura sazonal, a qual possui alternância nos valores decorrentes de fatores climáticos, regionais, bem como da economia mundial daquele momento (ENTENDENDO..., 2015).

O Brasil possui duas safras de milho. A primeira, considerada de maior produtividade devido às condições climatológicas mais favoráveis localizando-se no Sul e Sudeste do país onde o plantio ocorre em agosto e a colheita em fevereiro do ano seguinte. A segunda safra é proveniente da região Centro-Oeste e do Paraná onde o plantio ocorre em janeiro e a colheita em julho (CONAB, 2015). Na Argentina, com clima semelhante ao Brasil, o plantio ocorre em setembro e a colheita em abril. Nos Estados Unidos, maior produtor, a única safra ocorre entre abril e outubro durante a primavera e verão bem como na China (Figura 3.10).

MILHO J F M A M J J A S O N D

BRASIL 1ª SAFRA

BRASIL 2ª SAFRA

ARGENTINA

EUA

CHINA

Figura 3.10 – Plantio e colheita do milho em diferentes países.

Fonte: (ENTENDENDO..., 2015).

Dentre os resíduos resultantes do processamento de milho, figura-se o sabugo: resíduo sólido de grande volume (RAMOS, 2000) que pode servir como fonte de biomassa renovável na produção de açúcares solúveis que através de processos químicos, enzimáticos e fermentativos pode fornecer combustíveis líquidos e uma variedade de produtos químicos, fornecendo assim uma plataforma para biorrefinarias, em uma base sustentável (PEREIRA Jr et al., 2010). Contêm aproximadamente 391 g de celulose, 421 g de hemicelulose, 91 g de lignina, 17 g de proteína e 12 g de cinzas por kg de matéria seca. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg (70% base úmida), são formados pelo sabugo (AGUIAR, 2010). A Figura 3.11 apresenta o resíduo sabugo de milho após seu corte em moinho de facas.

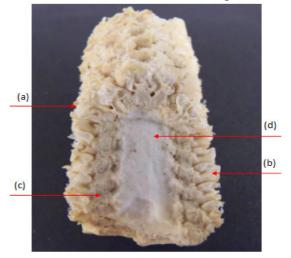
Figura 3.11 – Sabugo de milho granulado obtido após corte em moinho de facas.



FONTE: Arquivo pessoal.

Ziglio (et al. 2009) observou que estruturalmente, o sabugo de milho é constituído por 4 partes distintas (Figura 3.12): palha fina (a), parte externa do sabugo que corresponde a 4,1 % de todo seu peso; palha grossa (b), camada interna à palha fina e representa 33,7 % do peso do sabugo; anel lenhoso (c), localiza-se no interior do sabugo com 60,3 %, recobrindo a medula (d), núcleo central do sabugo, com 1,9 % do peso total.

Figura 3.12 – Partes do sabugo de milho: (a) palha fina; (b) palha grossa; (c) anel lenhoso; (d) núcleo central do sabugo.



FONTE: (RAMOS, 2013).

3.4 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é a etapa de grande impacto no processo de conversão dos carboidratos fermentescíveis em etanol por alterar a estrutura

nativa da biomassa. Por envolver um gasto intenso de energia, que afeta de forma significativa o custo do bioprocesso, é desejável um pré-tratamento o qual seja o menos dispendioso possível e que tenha uma interferência favorável no processo como um todo, além de ser ambientalmente correto (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016). O pré-tratamento pode-se utilizar de métodos físicos, químicos, físico-químicos, e biológicos (Figura 2.13). Na maioria das vezes é empregada uma combinação de pré-tratamentos que visa o menor custo possível, a maior produção de energia e ser ambientalmente correto.

Alguns destes pré-tratamentos (Figura 3.13) procuram aumentar a porosidade da biomassa enquanto outros visam à remoção de açúcares monoméricos, oligômeros, hemicelulose, lignina e produtos provenientes da degradação de lignina (XIAO, 2004; XIMENES, 2011).

Pré Tratamento Físico-**Físico** Químico Biológico Químico Explosão a **Enzimático** Ácido vapor Centrifugação **Diferentes Alcalino** Agua quente Extrusão fungos Iônico Plasma **Ultrassonifi-Microrganis**cação Oxidação Organossolv mo Úmida

Figura 3.13 – Esquema dos diferentes pré-tratamentos empregados em biomassa vegetal.

FONTE: Adaptado (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

3.4.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido é um método que pode ser realizado em uma única etapa em temperaturas apropriadas (RODRIGUES, 2005) e é útil na separação e solubilização da fração

hemicelulósica e com pouca ação sobre a lignina e a celulose. Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídios.

Durante o pré-tratamento ácido (Figura 3.14), os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, com predominância de xilose, glicose e arabinose (SUN; CHENG, 2002).

Nesse processo, são liberados não somente açúcares solúveis da fração hemicelulósica, como também produtos de degradação, as quais dependem do tipo e das condições do prétratamento hidrólitico, o que envolve condições de concentração do ácido, alta temperatura e pressão (RODRIGUES, 2005). Entre estes compostos inibidores, estão o furfural e o hidroximetilfurfural originados da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, o ácido acético liberado pela hidrólise de acetil-xilanas, bem como compostos aromáticos derivados da lignina (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000).

Figura 3.14 – Representação da hidrólise ácida de biomassa.

FONTE: Arquivo pessoal.

3.5 Hidrólise enzimática

Os tratamentos enzimáticos apresentam vantagens em relação aos tratamentos químicos e térmicos, visto que a premissa da hidrólise enzimática é propiciar uma liberação eficiente de açúcar com menor custo do que a hidrólise ácida, por se utilizar de condições mais brandas tais como pH 4,8, temperatura por volta de 50 °C, sendo, portanto, menos agressivas ao meio ambiente evitando danos aos reatores, e, por conseguinte, prolongando sua vida útil (COSTA et al. 2015).

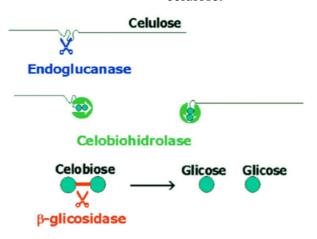
A desconstrução de resíduos lignocelúlósicos dá-se por meio da atuação sinérgica entre complexos de enzimas celulolíticas, da beta glicosidase, das xilanases e de enzimas acessórias que possuem papel facilitador para a degradação da celulose (BON, et al., 2008).

De acordo com Wilson et al. (2011) as celulases são divididas em três classes:

- 1) As endo-1,4- β -D-glucanases, ou endoglucanases, que atuam de forma randômica, rompendo ligações glicosídicas β -(1,4) das cadeias de celulose tendo maior afinidade por regiões amorfas;
- As exo-1,4-β-D-glucanases, ou celobiohidrolases, que atuam nas regiões terminais da molécula de celulose, ocasionando sua gradativa despolimerização por meio da remoção de unidades de celobiose terminais;
- 3) As 1,4- β -D-glucosidades, ou β -D-glucosidases (EC 3.2.1.21) que hidrolisam a celobiose à unidades monoméricas de D-glicose, reduzindo assim o seu efeito inibidor sobre as demais enzimas do complexo.

A hidrólise da celulose pelas celulases (Figura 3.15) ocorre em duas etapas. Na primeira, as celulases se adsorvem à superfície do substrato. Na segunda ocorre propriamente dita a hidrólise de celulose em açúcares fermentescíveis (BON et al., 2008).

Figura 3.15 – Representação da catálise enzimática para geração de glicose a partir de celulose.



FONTE: OGEDA & PETRI (2010).

Essas três classes de enzimas ocasionam distintas alterações na estrutura supramolecular da celulose. No entanto, por apresentarem propriedades complementares, descrevem um alto grau de sinergismo durante a hidrólise propiciando um rendimento melhor

do que a soma dos rendimentos das enzimas quando utilizadas separadamente (RAMOS, 2000). O rendimento da hidrólise enzimática depende de parâmetros como: tipo de prétratamento da biomassa, inibição da catálise enzimática pelos produtos finais, termo estabilidade das enzimas, relação massa carga, duração da hidrólise, pH do meio, temperatura e agitação (RABELO, 2007).

Alguns fatores têm impacto negativo substancial sobre a hidrólise enzimática da biomassa, como a lignina, grupos acetil e a cristalinidade da celulose demostrando que a melhoria no rendimento da hidrólise enzimática aumentou à medida que a concentração de celulose cristalina foi diminuída (ZHENG, 2008).

A lignina liberada durante o pré-tratamento reage em seguida, formando compostos com solubilidade limitada. Estes compostos permanecem aderidos sobre a superfície do substrato, e a lignina depositada adsorve irreversivelmente as enzimas (YANG, 2004). As pentoses e hexoses se decompõem em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente. Somados, reduzem o desempenho do complexo celulolítico, de tal modo que quantidades elevadas do biocatalisador são necessárias para conseguir taxas de hidrólise aceitáveis. De acordo com Eckard (et al. 2011) a atividade da enzima (Ctec2-15 FPU/g glucana) foi reduzida em 85 % na presença de aproximadamente 20,2 % de lignina após 24 horas de hidrólise de palha de milho. Estes autores mencionam que a redução da atividade enzimática seja decorrente de uma alteração na conformação da enzima ocasionada pela alta concentração de lignina presente na biomassa pré-tratada.

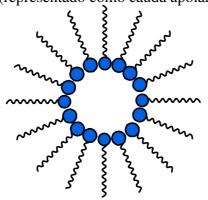
3.6 Tensoativos no pré-tratamento e na hidrólise enzimática

Para potencializar a ação das enzimas, estudos vêm aplicando tensoativos durante a hidrólise enzimática da biomassa (BALLSTROS et al., 1998; HUYAN et al., 2007; KIM et al., 2006; KUMAR et al., 2008). A seguir tem-se vários mecanimos propostos para descrever como os tensoativos aumentam a atividade das celulases e a hidrólise enzimática da biomassa:

1. Agentes tensoativos, por conterem uma parte hidrofóbica em suas estruturas, podem extrair produtos da degradação da lignina e hemicelulose (também hidrofóbicos) através da formação de emulsões (Figura 3.16). Assim, ocorre um aumento na taxa de remoção da lignina, e, consequentemente, aumenta-se a área superficial da biomassa a ser degradada pelo complexo celulolítico (SEO et al., 2011);

- 2. Os tensoativos diminuem a adsorção irreversível das enzimas em partes da biomassa como lignina e celulose cristalina, permitindo que a enzima continue livre em solução e tendo, portanto, uma atividade superior (ERRIKSSON et al., 2002);
- 3. A ativação de um determinado aminoácido na enzima ou modificação na conformação das alfa-hélices melhora devido a interação eletrostática entre as micelas do tensoativo e a enzima, tendo como resultado um aumento na atividade enzimática (ECKARD et al., 2013; LINDHOUD, 2009);
- Agentes tensoativos protegem a enzima da desativação térmica após o período de incubação prolongado e desnaturação por redução da tensão superficial (ECKARD et al., 2013).

Figura 3.16 – Representação da formação de uma emulsão por um surfactante não iônico. Uma região hidrofílica (representado em azul) e outra hidrofóbica (representado como cauda apolar).



FONTE: Arquivo pessoal.

Qing et al. (2010) avaliou o emprego de agentes tensoativos na etapa de prétratamento e observaram uma liberação significativa de lignina no hidrolisado hemicelulósico passível de ser capturada por emulsões do agente tensoativo, reduzindo assim a quantidade de lignina depositada sobre a biomassa. Estes autores demonstraram que a imersão da palha de milho em Tween 80, seguido por pré-tratamento com ácido diluído (140 ° C, 1 % de H₂SO₄) aumentou a remoção de lignina em 52 % e em 114 % quando pré-tratadas a 220 °C. Postulouse que este pode ter sido devido à remoção de lignina, que é de natureza hidrofóbica, por parte da cadeia hidrofóbica do tensoativo.

Testes conduzidos por Kurakake et al. (1994) demonstraram que a aplicação de 3,33 % (m/m) do agente tensoativo não iônico Tween 20 durante o pré-tratamento de bagaço

de cana de açúcar a 170-190 °C promoveu uma melhoria na hidrólise enzimática subsequente, e, diminuiu a quantidade de lignina residual depositada sobre o substrato.

Os beneficios encontrados com a adição de tensoativos no pre-tretamento e hidrólise enzimática também foram concomitantes com os observados em processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) para a produção de etanol celulósico. De acordo com Alkasrawi et al. (2003) a adição de Tween 20 (2,5 g/L) na produção de bioetanol reduziu em 50 % o uso de enzimas, aumentou em 8 % a produção de etanol e reduziu o tempo de fermentação. Ballstros et al. (1998) utilizando como aditivo Tween 80 (0,4 g/L) (Figura 3.17) observou um aumentou significativo no rendimento em etanol.

Figura 3.17 – Representação da estrutura química de Tween 80.

FONTE: Arquivo pessoal.

3.7 Produção de etanol celulósico por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054

A levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis* está entre os poucos organismos que utilizam ambos a xilose e glicose e exibem um sistema regulatório de transição entre o processo respiratório e fermentativo (JEFFRIES, 1983). Os mecanismos fundamentais pelos quais a fermentação é regulada diferem profundamente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* fermentadora de glicose e na levedura *S. stipitis* fermentadora de xilose (du PREEZ et al., 1989; JEFFRIES, 1983). Em *S. cerevisiae*, a disponibilidade de oxigênio é irrelevante para o metabolismo fermentativo. Glucose provoca indução de altos níveis das enzimas glicolíticas e reprimem a respiração, conduzindo a produção de etanol

(BENNETZEN et al., 1982). Na levedura Crabtree-negativa *S. stipitis*, limitação de oxigênio, ao invés da presença tanto de glicose ou xilose, induz fermentação (PASSOTH et al., 1996).

S. stipitis é capaz de produzir etanol a partir de xilose sob condições anaeróbicas por possuir uma única enzima xilose redutase com dupla especificidade de cofator (NADPH e NADH) (JEFFRIES, 1983). Na maioria das leveduras e fungos, xilose redutase utiliza somente NADPH. O metabolismo de xilose tem como passos iniciais após o transporte de xilose para o interior celular a indução da enzima xilose redutase (E.C.1.1.1.21) que catalisa a redução de xilose em xilitol na presença dos cofatores NAD(P)H e NADH como primeiro passo do metabolismo da xilose (Figura 3.16) (BARNETT, 1976; JEFFRIES, 1983).

Posteriormente, ocorre a participação da enzima xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.9) que emprega NAD⁺ ou NAD(P)⁺ como cofator, oxidando o xilitol a xilulose (SLININGER et al., 1987). A xilulose é convertida em piruvato, um intermediário que conecta a via das pentoses fosfato com a via glicolítica (TAYLOR et al., 1990; WEBB; LEE, 1990; ROSEIRO et al., 1991). Assim, um desbalanço pode surgir sob condições anaeróbicas se xilose redutase utiliza somente NADPH, xilose desidrogenase utiliza somente NAD, e se não existir um mecanismo para reduzir NADP com NADH. Assim como a xilose redutase em *S. stipitis*, pode aceitar tanto NADPH ou NADH, um desbalanço não pode bloquear o consumo de xilose sob condições anaeróbicas (BRUINENBERG et al., 1984).

S. stipitis requer pequenas quantidades de oxigênio para máxima conversão de xilose a etanol (BENNETZEN et al., 1982). Pouco etanol é formado sob condições estritamente anaeróbicas (JEFFRIES, 1983). A explicação para este efeito do oxigênio poderia residir em atividade mais elevada de sua xilose redutase pelo cofator NADPH.

A xilose desidrogenase tem especificidade pelo cofator NADH, assim acúmulo parcial de NADP e NADH provavelmente ainda possa ocorrer, apesar da atividade da xilose redutase ser dependente de NADH em *S. stipitis* (JEFFRIES, 1983). Atividades de duas enzimas chaves fermentativas, piruvato descarboxilase (PDC) e ADH, são induzidas quando *S. stipitis* se torna limitada ao oxigênio e a produção de etanol aumenta (PASSOTH et al., 1996). Entretanto pouco se sabe sobre este processo em *S. stipitis*, a níveis moleculares e fisiológicos. Uma melhor compreensão de regulação metabólica dos genes envolvidos no metabolismo fermentativo de xilose é essencial para futuros avanços neste campo (SHI et al., 2002).

A Figura 3.18 mostra uma representação do pré-tratamento de material lignocelulósico e a ação de enzimas na desconstrução de celulignina à glicose, e de hemicelulose à xilose com subsequente produção de etanol por leveduras.

Material Lignocelúlósico **Pré Tratamento** Celulignina Hemicelulose Hemicelulase Celulase **Xilose** NADPH + H **Xilose Redutase** Glicólise NADP Glicose **Xilitol Xilose Desidrogenase** Gliceraldeído-3fosfato Via das Pentoses Xilulose-5-Fosfato NADH + H⁺ **Piruvato** *Ribulose-5-Fosfato **Piruvato Desidrogenase** Acetil-CoA Álcool Desidrogenase Acetaldeído Álcool Desidrogenase **Etanol**

Figura 3.18 – Representação do pré-tratamento de material lignocelulósico e a ação de enzimas na desconstrução de celulignina a glicose e de hemicelulose a xilose.

FONTE: Adaptado de (HARISH et al., 2015).

Os compostos fenólicos provenientes da degradação da lignina são responsáveis pela diminuição das atividades das enzimas chave no processo de conversão de glicose a etanol, como a fosfofrutoquinase, fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase por alterarem o pH citosólico do microrganismo levando-o a lise celular. Assim, é desejável diminuir a formação destes compostos inibidores para que o processo seja economicamente viável. O desenvolvimento de técnicas para elevar os rendimentos de sacarificação com cargas inferiores de enzimas na hidrólise da biomassa é um aspecto chave para tornar a produção de etanol a partir de biomassa economicamente viável (LI et. al., 2015; KAZI et. al., 2010).

3.8 Hidrólise e Fermentação Separada (SHF) e Hidrólise e Fermentação Simultânea (SSF)

A hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas em diferentes modos de operação, tais como, separadamente (SHF, sigla em inglês *Separate Hydrolysis and Fermentation*), ou simultaneamente, utilizando a sacarificação e fermentação simultaneamente (SSF, sigla em inglês de *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) (LEE et al., 2009).

O processo SHF consiste primeiramente na etapa de hidrólise enzimática durante um tempo ótimo para a desconstrução do material lignocelulósico (BEHERA et al., 2014). Em seguida, o hidrolisado rico em glicose é destinado para a fermentação. A temperatura ótima para maior ação catalítica das enzimas é cerca de 50 °C enquanto que para a fermentação pode variar de 30 a 40 °C. Assim, quando realizadas separadas, ambas as etapas (hidrólise e fermentação) podem ser otimizadas em função de suas temperaturas ótimas independentemente uma da outra (LEE et al., 2010).

Em contrapartida, como mencionado na literatura, durante o pré-tratamento, conforme ocorre a despolimerização de hemiceluloses, ocorre também a degradação da lignina em suas unidades monoméricas que inclui compostos fenólicos e aromáticos (variam de acordo com a biomassa lignocelulósica utilizada) que se acumulam e são considerados tóxicos para o metabolismo da levedura ocasionando, por conseguinte, uma inibição na produção de etanol (ZHU et al., 2015; ZENG et al., 2014).

O Processo SSF, por sua vez, combina a hidrólise enzimática concomitantemente com a fermentação. Assim, produção de etanol concomitante com a hidrólise enzimática, reduz o acúmulo de produtos tóxicos ao metabolismo microbiano, e, por conseguinte, incrementa a velocidade de hidrólise e produção de etanol (COSTA et al., 2015). Em SSF também se observa a redução no custo de investimento da instalação, por requerer um número menor de tanques. No entanto, uma desvantagem deste processo é que a temperatura deve ser em função das temperaturas ótimas de hidrólise enzimática e fermentação (LEE et al., 2010). Além disso, a levedura utilizada no processo de SHF pode ser reciclada após a fermentação, o que não é possível em SSF.

A produção de etanol pelo processo SSF, pode ser otimizada quando o processo for conduzido por leveduras termotolerantes. Um exemplo de levedura termotolerante é a estirpe *Kluyveromyces marxianus*, que atua em uma faixa de temperatura próxima à temperatura ótima catalítica das celulases (38-45 °C) (PESSANI et al., 2011). Neste cenário, quando o

bioprocesso é conduzido em temperaturas mais elevadas o desempenho da sacarificação enzimática é otimizado e, como consequência, uma menor dosagem enzimática é requerida (BABIKER et al., 2010). Estes microorganismos devem ser tolerantes ao etanol produzido bem como aos inibidores gerados no pré-tratamento da biomassa (OHGREN et al., 2006).

Estudos recentes sinalizam que altas cargas de sólidos ocasionam vários problemas, incluindo uma agitação do substrato não homogênea, e, uma alta concentração de compostos tóxicos causando a inibição da levedura e do complexo enzimático (HOYER, 2013).

Dahnum et al. (2015) estudou o desempenho dos processos de SHF e SSF para a obtenção de bioetanol a partir de restos de cascas de frutas. Foram avaliados o sinergismo ótimo entre a adição de diferentes cargas enzimáticas do complexo comercial Cellic® CTec2 (10, 20, 30, 40 FPU/grama de biomassa) enquanto Cellic® HTec2 foi adicionado a 20% de Cellic® CTec2. Os experimentos foram conduzidos em frascos agitados em tampão citrato (pH 4,8). No processo de SSF, apesar da temperatura (32 °C) empregada no processo ter sido no sentido de favorecimento da levedura e não da atividade enzimática, observou-se elevado consumo de glicose nas primeiras 24 horas de processo.

Estes autores mencionam que a produção de etanol por demandar menor tempo em conformidade com a ação da enzima de romper a estrutura supramolecular da celulose, contribuiu para o favorecimento da conversão de glicose em etanol pela levedura *Saccharomyces cereviceae* zerando praticamente a concentração de glicose em apenas 24 h de fermentação. Os resultados sinalizaram que quando se utiliza maior carga enzimática (40 FPU), poderia se produzir 4,74 % de etanol em 72 horas de fermentação pelo processo SHF. Em contrapartida, pelo processo SSF pôde-se produzir 6,05 % de etanol em 24 horas. Assim, a partir deste estudo, o método SSF foi considerado o processo mais eficiente devido à rápida produção de etanol e a maior concentração de etanol produzido (DAHNUM et al., 2015).

A partir deste resultado, fica evidente que o processo SSF apresenta como vantagem a minimização de perdas de glicose em vista de que as etapas de hidrólise e fermentação ocorrem no mesmo reator, maximizando, portanto, a produção de etanol (KUMAGAI et al., 2014). Outras vantagens têm sido relatadas em estudos recentes. Em SSF ocorre o consumo de hexoses e pentoses e evita-se a inibição do produto final pela glicose e celobiose (ALRIKSSON et al., 2011; JONSSON et al 2014).

Assim, a produção de etanol durante a fermentação está atrelada à liberação de açúcar durante a hidrólise enzimática (GARCIA-APARICIO et al., 2011). Elevadas concentrações de substrato conduzem a altas concentrações de açúcares no hidrolisado, que favorecem a

fermentação. Entretanto, algumas intercorrências, como uma agitação não homogênea e a liberação de potenciais moléculas tóxicas, restringem a carga sólida máxima a ser utilizada (COSTA et al., 2015). Dessa forma, uma regulação criteriosa em todas as etapas do bioprocesso, propicia uma maximização da obtenção de etanol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos nos Laboratórios do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena- EEL-USP.

- 4.1 Obtenção do sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído e surfactante
 - 4.1.1 Matéria-prima: obtenção e preparo do sabugo de milho

O sabugo de milho, triturado, seco e ensacado (20 kg), proveniente da RASUL - Indústria e Comércio de Rações Ltda. – PR foi armazenado á temperatura ambiente até realização das hidrólises.

4.1.2 Pré-tratamento ácido do sabugo de milho na presença de surfactante

O pré-tratamento ácido do sabugo de milho foi realizado na planta piloto de hidrólise do Departamento de Biotecnologia (LOT) da EEL-USP, em reator de aço inox AISI 316 com capacidade volumétrica total de 50 litros, equipado com camisa para aquecimento indireto por resistência elétrica. Foi utilizada a condição de hidrólise para o sabugo de milho estabelecida por JOSÉ A.H.M (2013). Nesta condição otimizada de pré-tratamento ácido foram realizados ensaios contendo diferentes concentrações do surfactante Tween 80 (Polissorbato, pureza > 80 %).

As concentrações de surfactante (0, 5 e 10% (m/m) foram baseadas em um planejamento experimental 2³ com fase centrada e 3 repetições no ponto central (Tabela 4.1). Após os diferentes pré-tratamentos os resíduos sólidos, sabugos de milho pré -tratados, foram armazenados em freezer a - 20°C para posterior análise composicional e hidrólise enzimática. Enquanto que os líquidos remanescentes, hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho, foram armazenados a - 4°C para posterior caracterização química.

4.2 Hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado

4.2.1 Enzima

Os experimentos de hidrólise enzimática foram conduzidos com o complexo enzimático de Celulases Cellic CTec2 doado pela Novozymes A/S (Curitiba, PR). De acordo com o fabricante este complexo é uma combinação de celulases potentes, contendo alto nível de β -glicosidades. Esse complexo apresenta estabilidade operacional nas faixas de temperatura de 45 a 50 °C e pH de 5,0 a 5,5.

4.2.2 Hidrólise enzimática

Os diferentes sabugos de milho pré-tratados (**item 4.1**) foram descongelados e lavados abundantemente com água destilada até neutralização. Os experimentos de hidrólise enzimática destes materiais foram conduzidos em Erlenmeyers de 125 mL nas seguintes condições: tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 4,8, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório a 50°C e relação sólido:líquido 1:10 (m/v) com volume total de líquido de 50 mL.

A carga enzimática foi de acordo com planejamento experimental 2³ com fase centrada e 3 repetições no ponto central (Tabela 4.1 e Tabela 4.2) com valores entre 5 a 30 FPU/g_{material lignocelulósico seco} para o complexo enzimático Cellic CTec2. Para prevenir contaminação microbiana foi adicionado ao meio reacional azida de sódio (0,3% (m/v).

Foram retiradas amostras periódicas (1,2,3,5,8,24 e72h). O hidrolisado enzimático foi centrifugado a (2000 x g por 20 min) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para análise de açúcares (glicose, xilose e arabinose) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

A variável resposta do processo de hidrólise enzimática foi o rendimento de hidrólise da celulose (%). Deve-se salientar que quantidade de surfactante adicionada ao meio reacional foi avaliada também neste planejamento de experimentos nas quantidades de 0 % (m/m) a 10 % (m/m) (Tabela 4.1).

A conversão enzimática da celulose foi calculada pela equação 4.1:

$$\eta = \frac{m_{gli\cos e} \times f_h}{m_{inicial} \times y_i} \times 100$$
(4.1)

Em que:

 η = conversão enzimática da celulose;

m_{glicose}: massa de glicose presente no hidrolisado (g)

m_{inicial}: massa seca de material lignocelulósico, antes da etapa de hidrólise

y_i = teor de celulose no material lignocelulósico;

f_h: fator de hidrólise da celulose (correspondente a 0,9)

Tabela 4.1 – Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2³ completo.

Fatores		Níveis			
	-1	0	+1		
Surfactante no pré-tratamento – ST (% m/m)	0	5	10		
Surfactante no meio reacional – SM (% m/m)	0	5	10		
Dosagem de enzimas – E (FPU/g de material lignocelulósico seco)	5	17,5	30		

Os níveis dos fatores serão codificados de acordo com a equação 4.2 (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995)

$$X = \frac{V_R - \sum V_R / 2}{(V_{R_2} - V_{R_1}) / 2}$$
 (4.2)

Em que:

X é o valor codificado da variável;

V_R é o valor real da variável;

 $\sum V_R/2$ é a média dos valores reais da variável;

 V_{R1} é o valor real mínimo da variável;

 V_{R2} é o valor real máximo da variável.

Tabela 4.2 – Matriz estatística apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2³ com face centrada e 3 repetições no ponto central.

	Ensaios	ST*	SM*	\mathbf{E}^*			
		(% m/m)	(% m/m)	(FPU/g de material	$\mathbf{x_1}$	$\mathbf{x_2}$	X ₃
		\mathbf{x}_1	X ₂	lignocelulósico seco)			
	1	0	0	5	-1	-1	-1
<i>ب</i> ر	2	10	0	5	+1	-1	-1
rial 2	3	0	10	5	-1	+1	-1
Fato	4	10	10	5	+1	+1	-1
ento	5	0	0	30	-1	-1	+1
Planejamento Fatorial 2³	6	10	0	30	+1	-1	+1
Plan	7	0	10	30	-1	+1	+1
	8	10	10	30	+1	+1	+1
•	9	0	5	17,5	-1	0	0
odel	10	10	5	17,5	+1	0	0
do M ıtrad	11	5	0	17,5	0	-1	0
Composição do Modelo Face Centrada	12	5	10	17,5	0	+1	0
nposi Face	13	5	5	5	0	0	-1
Con	14	5	5	30	0	0	+1
	*PC1	5	5	17,5	0	0	0
Erro puro Ponto central	*PC2	5	5	17,5	0	0	0
	*PC3	5	5	17,5	0	0	0

^{*}ST = Surfactante no pré-tratamento

SM = Surfactante no meio reacional

E = Dosagem de enzimas

PC1, PC2, PC3 = ponto central

4.3 Fermentação

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a condição otimizada de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado na fermentação em separado (SHF) para produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.

4.3.1 Microrganismo e obtenção de inóculo para a realização da SHF

Foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 proveniente da coleção de cultura do *USDA Forest Service, Forest Products Laboratory* Wisconsin-WI (USA) mantidas em tubos de ágar malte inclinados e conservados a 4°C.

O inóculo foi obtido a partir de uma alçada da cultura estoque, recém-repicada (24 h) e transferida para frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio semi-definido YEPD (Extrato de levedura, peptona e dextrose) contendo (g/L): extrato de levedura, 10; peptona, 20; glicose, 30. O cultivo foi conduzido em incubadora de movimento rotatório (*New Brunswick, Scientific Co.*), com agitação de 200 rpm, à 30 °C, por 24 h.

Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação (2000 x g por 20 min) e lavadas com água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante foram utilizadas para preparar uma suspensão de células, empregada como inóculo. Uma alíquota do inoculo foi transferida para meio de fermentação (SHF) para uma concentração inicial de células de 2,5 g/L.

4.3.2 Meio de fermentação, condições de fermentação para a realização da SHF

O meio de fermentação foi preparado utilizando a melhor condição obtida na hidrólise enzimática do sabugo de milho com suplementação de 5 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L de MgSO₄.7H₂O e 3 g/L de (NH₄)₂SO₄. O meio foi autoclavado a 120 °C por 15 minutos. O cultivo foi conduzido em incubadora de movimento rotatório (*New Brunswick, Scientific Co.*), com agitação de 150 rpm, à 30 °C.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1 Determinação do teor de umidade do sabugo de milho

O teor de umidade do sabugo *in natura* e após diferentes pré-tratamentos foram determinados em balança semi-analítica MARTE ID50 equipada com secador de infravermelho a 105°C. Para esta determinação foi utilizado aproximadamente 1,0 g de sabugo úmido. O teor de umidade do sabugo foi utilizado nos cálculos para quantificação do volume de ácido necessário no processo de hidrólise ácida e na análise composicional do sabugo de milho.

4.4.2 Análise composicional do sabugo de milho sem tratamento e após diferentes pré-tratamentos

Os resíduos sólidos, sabugos de milho pré-tratados com acido sulfúrico diluído na presença de 0,5 e 10 % de Tween 80, provenientes do pré-tratamento ácido (item 4.1.2), bem como o sabugo *in natura* foram analisados quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina solúvel e lignina insolúvel de acordo com a metodologia utilizada no laboratório norte-americano NREL, 2009 (*National Renewable Energy Laboratory*), 'Procedimentos padrões para Análise Composicional da Biomassa' (*Standard Procedures for Biomass Compositional Analysis*).

Determinação de extrativos

Inicialmente, as amostras foram secas em estufa a 45° C e em seguida trituradas em moinho de facas a partículas de tamanho de 20 mesh. A unidade foi determinada em balança de infravermelho da marca Marte ID50 nas seguintes condições: temperatura de 105°C e ponto final com variação menor 0,2% em 30 segundos.

Para cada análise foi utilizada aproximadamente 1,0 g de amostra. Os resultados foram registrados em porcentagem de água perdida (umidade). Para execução do protocolo proposto o teor de umidade deve estar em aproximadamente 10%. Caso contrário deve-se realizar a secagem do material ao ambiente.

Para a determinação de extrativos foi necessário remover o material não estrutural da biomassa vegetal através do processo de extração exaustiva em Soxhlet (Figura 4.1) com

etanol a 95 % para remover componentes solúveis em etanol (clorofila, ceras e outros). Para isso, foram pesadas 3 gramas de cada amostra (em triplicata) que foram colocadas em pequenos envelopes feitos de papel filtro. Esses envelopes foram grampeados e dispostos no interior dos extratores. A montagem do sistema de extração esta apresentada na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Extração exaustiva em Soxhlet com etanol para a completa remoção dos extrativos.



FONTE: Arquivo pessoal.

A extração foi realizada em um período aproximado de 6 horas. Após esse tempo. Ao desmontar o sistema, os envelopes foram retirados e mantidos a temperatura ambiente para secagem e posterior pesagem.

A determinação do teor dos extrativos foi calculada de acordo com a Equação 4.3:

$$\%Extrativos = \left(1 - \left[\frac{massa_2 - massa_1}{Massa_{amostra}}\right]\right) * 100$$
 (4.3)

Em que:

Massa₂ = massa do conjunto (envelope + extrativos) após a extração e posterior secagem (g)

 $Massa_1 = massa do envelope (g)$

Massa_{amostra} = massa de amostra colocada dentro do envelope (g)

Essas amostras sem extrativos foram utilizadas em todas as etapas da análise composicional.

Determinação do teor de cinzas

Esta análise visa à determinação da quantidade de material inorgânico na biomassa, seja estrutural ou extraída, como parte da composição total. Inicialmente, os cadinhos para incineração foram rotulados apropriadamente e colocados na mufla a 800°C por um período de 2 horas. Os cadinhos foram resfriados em dessecador por 1 hora.

Esse procedimento em que o cadinho foi aquecido em mufla e resfriado em dessecador foi repetido de hora em hora até peso constante do cadinho. Após, transfere-se 1 g da amostra para o cadinho pesado e tarado. O cadinho e amostra foram aquecidos em mufla mantida 800°C por 24 h. Após esse tempo, esperou-se o resfriamento da mufla para remoção cuidadosa dos cadinhos para o dessecador até atingirem temperatura ambiente para pesagem do teor de cinzas.

Determinação de carboidratos estruturais e lignina no sabugo de milho

As amostras a serem analisadas devem conter entre 5 a 10% de umidade. A massa utilizada de cada amostra deve ser corrigida em função de sua umidade e sólidos totais. A preparação destas amostras para a determinação de carboidratos estruturais e lignina (solúvel e insolúvel) envolvem as etapas de hidrólise ácida concentrada e hidrólise ácida diluída.

Após a remoção dos extrativos, em tubos de ensaio, foram pesadas 0,3 g de cada uma das amostras em triplicata. Adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico 72 % previamente preparado, e os tubos foram colocados em banho de água na temperatura de 30 °C por 60 minutos. Com o auxílio de bastões de vidro, as amostras foram homogeneizadas em intervalos de 5 minutos. Decorrido este período, as amostras provenientes desta hidrólise ácida concentrada foram diluídas por meio da adição de 84 mL de água destilada. O hidrolisado resultante foi então transferido para Erlenmeyers de 125 mL e incubados em autoclave a 121°C por 60 minutos para a completa hidrólise dos oligômeros.

Após o período de incubação, a mistura reacional de cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foi filtrada em filtro de vidro (GF-3) previamente seco a estufa a 105°C e tarado juntamente com o pesa filtro. Todo o sólido do Erlenmeyer de 125 mL foi coletado através da lavagem com 113 mL de água destilada. Desta forma, o filtrado (200 mL) foi coletado em

frasco Erlenmeyer de 250 mL. Os sólidos coletados foram direcionados para a determinação de lignina insolúvel e o filtrado (hidrolisado) foi utilizado para a determinação de lignina solúvel e carboidratos.

Determinação de lignina solúvel

O filtrado coletado foi diluído para faixa de leitura de 0,2 a 1,0 em absorbância medidas no comprimento de onda de 205 nm num espectrofotómetro de UV-Visível utilizando cubeta de quartzo. Para isso, 4 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL aferido com água destilada (diluição das amostras foi de 1:25). O filtrado (200 mL) proveniente da filtração da Lignina Insolúvel foi coletado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Deste hidrolisado, 4 mL foram transferidos para um balão de 100 mL (diluição das amostra foi de 1:25). Uma solução, sem conter o hidrolisado, porém nas mesmas condições, foi preparada e chamada de 'branco' para ser utilizada na análise de lignina solúvel. Deste filtrado (hidrolisado diluído) foi determinada os carboidratos pelo método de HPLC. A determinação da porcentagem da lignina solúvel foi calculada conforme a equação 4.4:

$$\%LigninaSolúvel = \frac{A}{a \times b} \times FD \times \frac{V}{M_{amostra}} \times 29 \times 100$$
 (4.4)

Em que:

A = absorbância a 205 nm.

a = absortividade, 110 L/g.cm.

 $b = caminho ext{ ótico (1cm)}.$

FD = Fator de diluição.

V = volume da solução inicial de H₂SO₄ a 72% (m/m) (L)

 $M_{amostra}$ = massa seco da amostra inicial.

Determinação de lignina insolúvel

Os filtros de vidro contendo os resíduos sólidos provenientes da etapa de hidrólise ácida após lavagem foram colocados em pesa-filtros previamente tarados e secos em estufa a 105°C até atingir peso constate. A seguir, estes filtros de vidro secos, foram transferidos a cadinhos de incineração e levados á mufla a 575 °C por 24 h. A seguir, os cadinhos foram

retirados cuidadosamente da mufla e levados diretamente para um dessecador por 1 h. Após, pesou-se os cadinhos e cinzas.

A lignina insolúvel foi determinada através da equação 4.5:

$$\%Lignina\ Insol\'uvel = \left(\frac{(massa_{C2} - massa_{C1}) - (massa_{R2} - massa_{R1})}{Massa_{amostra}}\right) * 100 \tag{4.5}$$

Em que:

Massa_{R2} = Massa do pesa filtro contendo o micro-filtro com resíduo insolúvel (g)

 $Massa_{R1} = Massa do pesa filtro contendo micro-filtro (g)$

 $Massa_{C2} = Massa do cadinho com cinzas (g)$

 $Massa_{C1} = Massa do cadinho (g)$

Como a lignina apresentada é livre de extrativos, devemos fazer uma correção para que os extrativos sejam considerados, assim, essa correção é feita segundo a equação 4.6:

$$\%Lignina\ insol\'uvel_{corrigida} = \%Lignina\ insol\'uvel * \left(\frac{100 - \%Extrativos}{100}\right)$$
 (4.6)

Determinação de carboidratos e determinação dos teores de hemicelulose e celulose no sabugo de milho

As amostras, que correspondem ao filtrado da hidrólise (antes da lavagem do resíduo) após devidamente diluídas foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e as concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como de ácido acético, foram determinadas por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com item.4.4.5. Para a determinação da quantidade (%) de hemicelulose e celulose no sabugo de milho foram utilizados os seguintes fatores de conversão 0,88 e 0,99, respectivamente.

4.4.3 Dosagem da atividade enzimática do coquetel comercial

A dosagem da concentração dos açúcares redutores liberados durante as reações enzimáticas empregou o reagente DNS. Este reagente foi preparado de acordo com Teixeira (et al. 2012) sem a adição de fenol e metabissulfito pela adição de água destilada a 10 g de

ácido 3,5-dinitrosalicílico, 16 g de hidróxido de sódio e 300 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio) para perfazer um volume final de 1000 mL.

A atividade de papel de filtro (FPase - *Filter paper activity*) foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC e expressa em FPU/g (GHOSE, 1987). Este método baseia-se na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação de uma fita de papel de filtro.

O meio reacional foi constituído de 0,5 mL do extrato enzimático (diluído em tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8, quando necessário), 1,0 mL de tampão citrato de sódio 50 mmol/L, pH 4,8 e uma tira de papel de filtro Whatman n°1 medindo 1,0 cm X 6,0 cm (aproximadamente 50 mg). A mistura reacional foi incubada a 50° C por 60 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 3,0 mL de DNS, fervida por 5 min e resfriada em banho de gelo. Desta mistura resultante, 0,2 mL foram transferidos para uma placa contendo 2,5 mL de água para leitura da absorbância desta mistura a 540 nm. Assim, teremos a determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do DNS. Assim, foi determinada a concentração de açúcares redutores pelo método do DNS.

4.4.4 Determinação da concentração celular, viabilidade, pureza da cultura e morfologia celular

A concentração celular foi determinada por densidade ótica a 600 nm, a partir de uma curva padrão obtida pela correlação entre a absorbância a 600 nm e a concentração de células determinada pela técnica de massa seca de células cultivadas em meio semi-definido.

A viabilidade da cultura foi verificada a partir de visualizações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, onde as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01 (m/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2 % (p/v).

A pureza e a morfologia celular foram verificadas a partir de visualizações microscópicas de lâminas fixadas e coradas com fuesina.

4.4.5 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, etanol

As concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como de ácido acético, e etanol foram determinadas por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (HPLC), empregando-se as seguintes condições: coluna Bio Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna, 45 °C; temperatura do detector, 35°C; detector de índice de refração

Waters 410; eluente, solução de H_2SO_4 0,005M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 μ L. As amostras, após devidamente diluídas, foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana de éster de celulose, 0,45 μ m de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore) e simultaneamente foi degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 25 minutos (RODRIGUES, 2005).

4.4.6 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural nos hidrolisados hemicelulósicos obtidos durante o pré-tratamento com ácido diluído foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com Rodrigues (2005), empregando-se as seguintes condições: coluna Waters Resolvetm 5 μ Spherical C18 (3,9 x 300 mm); temperatura da coluna, 25 °C; detector de ultravioleta Waters 2487 no comprimento de onda de 276 nm; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada, 20 μL.

As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Swennex com membrana HA de éster de celulose, 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore). Na composição do eluente, a água deionizada foi filtrada a vácuo empregando-se membrana HA em éster de celulose, 0,45 µm de poro, 0,47 mm de diâmetro (Millipore) e os outros componentes como ácido acético e acetronitrila foram, nas proporções adequadas, adicionados à água devidamente filtrada. Em seguida o eluente foi degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 15 minutos e deixado, antes de ser utilizado, em repouso por 10 minutos.

4.4.7 Determinação do pH e condutividade elétrica do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

O pH e a condutividade das amostras dos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho obtidas sob diferentes condições experimentais foram determinadas em pH/condutivímetro marca Mettler Toledo modelo SevenGO Duo-SG23.

4.5 Caracterização de celulignina

4.5.1 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

Os sabugos de milho *in natura* e após pré-tratamento ácido na presença ou não de surfactante foram fixados sobre um porta-amostra com o auxílio de uma fita condutora de carbono e submetidas à análise em Microscópio Eletrônico de Varredura. As imagens foram obtidas por elétrons retroespalhados no equipamento Zeiss modelo EVO LS15 e pelo equipamento Phenom-World modelo Pro-X. As amostras foram dispostas de forma a propiciar a observação dos sabugos de milho *in natura* e pré-tratados com a intenção de se observar as eventuais modificações superficiais e estruturais.

4.5.2 Análise cristalográfica por Difratometria de Raios X

Com o propósito de se avaliar a redução da cristalinidade dos materiais lignocelulósicos após as etapas de pré-tratamento, os sabugos de milho foram preparados para análise de difratometria de raios X, utilizando um difratômetro da marca BRUKER com um anodo rotatório de cobre, filamento de tungstênio e monocromador de grafite no intervalo de ângulos de 5 a 60°, passo angular de 0,05° e tempo de exposição de 1 segundo por medida.

A cristalinidade relativa, esperada das amostras foi calculada de acordo com (RAMOS, 2005). O índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos foi calculado pela equação 4.7, segundo CAO; TAN 2002:

$$I_c = \frac{I_{002} - I_{101}}{I_{002}} \times 100 \tag{4.7}$$

Em que:

 I_c : Índice de cristalinidade (%);

 I_{002} : Intensidade do pico devido aos planos cristalinos (002), com $2\theta = 22,24^{\circ}$;

 I_{101} : Intensidade do pico devido aos planos cristalinos (101), com $2\theta = 16,46^{\circ}$.

Utilizando-se os dados obtidos da composição química da celulose em cada etapa do processamento, pode-se determinar a cristalinidade esperada. A diferença entre a cristalinidade esperada e a cristalinidade obtida experimentalmente, nos fornece o valor de

diminuição da cristalinidade da celulose conforme indicado nas equações 4.8 e 4.9 (MORI, 2015):

$$Ice = \frac{CQcelulose*67}{CQcelulose in natura}$$
 (4.8)

$$Dc = Ice - Icmedida$$
 (4.9)

Onde:

Ice: Índice de cristalinidade esperada;

CQcelulose: composição química da celulose das amostras de sabugo;

CQcelulose in natura: Composição química da celulose do sabugo in natura;

De: Diminuição da cristalinidade;

Ic medida: Índice de cristalinidade obtido experimentalmente

4.6 Determinação dos parâmetros fermentativos

4.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol e de açúcares em células

O fator de conversão expressa: massa de etanol produzido por massa de açúcares consumidos (Yp/s) e massa de célula produzida por massa de açúcares consumida (Yx/s), em gramas, e foram calculados pelas seguintes equações (STAMBURY *et al.*, 1995):

$$Y_{x/s} = \frac{-\Delta x}{\Delta s} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i}$$
 (4.10)

$$Y_{p/s} = \frac{-\Delta p}{\Delta s} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i}$$
 (4.11)

Em que: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final da soma dos açúcares (glicose, D-xilose e L-arabinose);

P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol (g/L).

Xi e X_f correspondem às concentrações inicial e final de células (g/L).

4.6.2 Produtividade volumétrica de etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica de etanol expressa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h). Foi calculada de acordo com a seguinte equação (STAMBURY *et al.*, 1995):

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i}$$
 (4.12)

Em que P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol (g/L).

t_i e t_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

4.6.3 Eficiência de conversão (η)

Este parâmetro fermentativo expresso em %, representa a razão entre $Y_{p/s}$ calculado experimentalmente e o fator de conversão teórico de $0.50g_{etanol}/g_{acúcares\ totais}$

4.6.4 Velocidades instantâneas e específicas

Para o estudo cinético do processo fermentativo, as velocidades instantâneas de crescimento celular (dx/dt), consumo de substrato (-ds/dt), e formação de xilitol (dp/dt), foram calculadas pelo método proposto por Le Duy e Zajic (1973). Ao se dividir estas velocidades instantâneas pela concentração celular nos pontos em que se calcularam as derivadas, obtêmse as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de D-glicose (μ_s) e de produção de etanol (μ_p).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise composicional do sabugo de milho

A caracterização química do sabugo de milho *in natura* e submetido às diferentes condições de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído na presença de 0, 5 e 10 % do surfactante Tween 80 estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Composição química do sabugo de milho *in natura* (SM) e do sabugo de milho após pré-tratamento ácido com surfactante nas concentrações (% m/m) de: 0 (SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%).

Amostras	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Klason (%)	Cinzas (%)	Extrativos (%)	Sólidos hidrolisados** (%)	Total (%)
SM-in natura	40,3±0,9	31,8±0,8	17,3±1,0	0,7±0,02	6,3±0,1	nd	96,3±0,8
SM-0%*	31,9±0,9	$5,6\pm1,2$	$3,0\pm0,3$	$0,2\pm 0,1$	-	$52,9\pm0,1$	93,8±2,2
SM-5%*	$32,0\pm1,6$	6,2±0,7	4,4±1,0	0,2±0,1	-	51,5±2,2	94,4±0,3
SM-10%*	30,2±5,8	5,2±0,2	3,2±1,1	0,2±0,02	-	60,5±9,2	94,0±2,8

^{*=} composição química do sabugo de milho pré-tratado após correção com relação ao rendimento mássico (valores de recuperação mássica utilizados na correção foram para SM-0% = 47%, SM-5% = 47% e SM-10% = 40%)

Fonte: Arquivo pessoal.

A composição química do sabugo *in natura* (Tabela 5.1) corrobora com os teores encontrados em outros trabalhos para celulose (35-45%), hemicelulose (35-42%) e lignina (5-15%) (VAN DYK et al. 2012; SAHA 2003). Os teores baixos de cinzas no sabugo *in natura* (0,7%) e após os pré-tratamentos (0,2%) (Tabela 5.1) representam vantagem para o uso do sabugo de milho em processos de bioconversão em comparação a outros resíduos agrícolas, como palha de arroz e palha de trigo, os quais apresentam teor de cinzas de 17,5 e 11,0%, respectivamente (PANDLEY et. al. 2000).

Após os pré-tratamentos foram observados perdas/solubilização destes macrocomponentes (celulose, hemicelulose e lignina) (Tabela 5.1) independentemente da adição do surfactante Tween 80. Nesses casos, para as condições de pré-tratamentos sem adição de Tween 80 (SM-0%) as perdas/solubilização com relação ao sabugo *in natura* foram de 20,9 %, 82,4 % e 82,4 % para celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Para o

^{**=} sólidos hidrolisados a partir do SM-in natura

pré-tratamento ácido adicionado de 5 % de Tween 80 obteve-se valores similares para perdas/solubilização de celulose (20,9 %), hemicelulose (80,1 %) e lignina (74,6 %) com relação ao sabugo *in natura*. No entanto, com o aumento no teor de Tween 80 para 10 % (m/m) durante o pré-tratamento ácido observou-se também aumento nas perdas/solubilização para celulose (25,3 %), hemicelulose (83,7 %) e lignina (81,9 %) com relação ao sabugo *in natura*.

De acordo com Nasirpour et al. (2014) o uso de surfactantes durante o pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar resultou numa alteração estrutural das lignoceluloses e proporcionaram um aumento na remoção de lignina. No entanto, é difícil deslignificar completamente a lignocelulose.

A localização da lignina dentro da estrutura carboidrato-lignina é estável devido a ligações fortes entre C-O-C, C-C e hidrofobicidade (KIM et al., 2003). Os elevados valores observados de perdas/solubilização de hemiceluloses nos sabugos pré-tratados com relação ao sabugo *in natura* sugere a remoção quase que total da hemicelulose e despolimerização.

A hemicelulose tem uma estrutura amorfa, assim, liberação de seus monômeros é mais fácil do que para a celulose. Os sabugos pré-tratados (SM-0%, SM-5% e SM-10%) estão praticamente livres de hemicelulose o que poderá facilitar a sacarificação enzimática da celulose na próxima etapa deste trabalho. Isto, porque a remoção de hemicelulose aumenta a área de superfície interna, proporcionando um maior acesso à celulose para as enzimas, e diminui a ligação não produtiva de celulase com os açúcares da hemicelulose (GROHMANN et al, 1989; JEOH et al., 2007).

Os resultados evidenciam que o uso do surfactante Tween 80 como coadjuvante no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído do sabugo de milho surtiu maior efeito na remoção de lignina e hemicelulose quando empregado na concentração de 10% (m/m) no meio reacional.

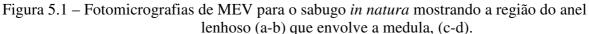
5.2 Caracterização de celulignina após pré-tratamento ácido

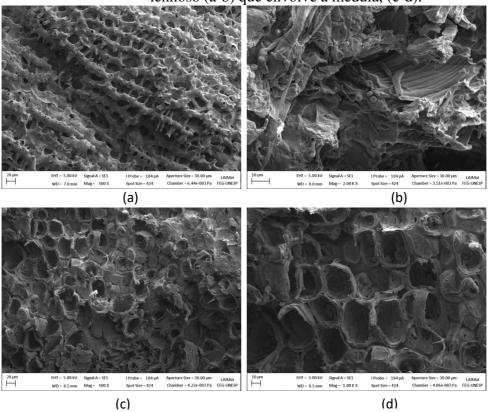
5.2.1 Análise morfológica do sabugo de milho por microscopia eletrônica de varredura

O sabugo de milho apresenta em sua estrutura quatro partes distintas: palha fina, palha grossa, anel lenhoso e medula (RAMOS, 2013). A palha fina constitui aproximadamente

4,1 % do sabugo de milho em peso, a palha grossa 33,7 %; o anel lenhoso 60,3 % e a medula 1,9 % (ZIGLIO et al. 2009).

Através das fotomicrografias do sabugo de milho triturado (Figura 5.1) utilizado neste trabalho foi possível constatar que utilizou-se sabugo de milho com predominância de um estrutura porosa, com a formação baseada na orientação de várias fibras em forma circular, como anéis se sobrepondo ao longo de eixos dando origem á estruturas tubulares interligadas por uma resina resultando numa estrutura esponjosa bastante porosa que seria característica da medula; uma mais sólida, semelhante á madeira, com a presença de várias fibras mais orientadas também recobertas pela resina correspondendo ao anel lenhoso. No sabugo de milho *in natura* analisado não foram observadas as estruturas palha grossa e palha fina (Figura 5.1).



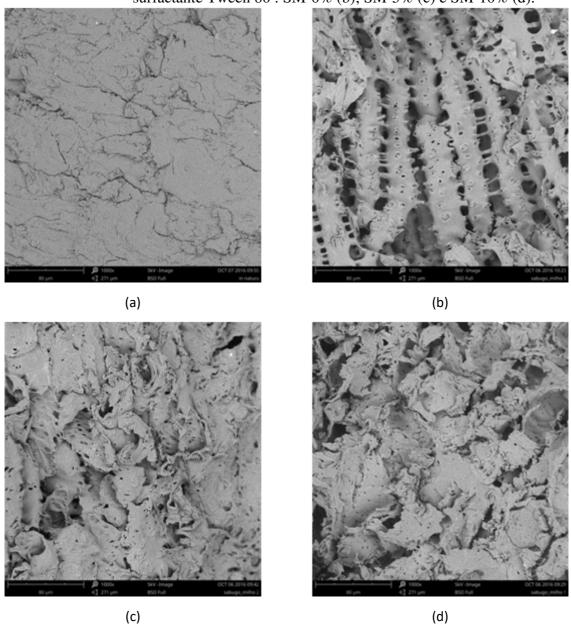


FONTE: Arquivo pessoal.

A Figura 5.2 revela fotomicrografias (magnificação de 1000 vezes) das superfícies dos sabugos de milho *in natura* e submetidos ao pré-tratamento ácido com surfactante Tween 80.

Analisando a Figura 5.2 é possível notar que a morfologia dos sabugos de milho prétratados com ácido diluído, apresentou maior porosidade e fragmentação em suas estruturas em comparação com o sabugo *in natura*. O sabugo de milho tratado apenas com ácido diluído (Figura 5.2 b) se apresenta de uma forma mais ordenada e alinhada indicando que o tratamento preservou algumas de suas estruturas.

Figura 5.2 – Fotomicrografias de MEV (magnificação de 1000 vezes) das superfícies dos sabugos de milho *in natura* (a) e submetidos ao pré-tratamento ácido com surfactante Tween 80 : SM-0% (b); SM-5% (c) e SM-10% (d).



FONTE: Arquivo pessoal.

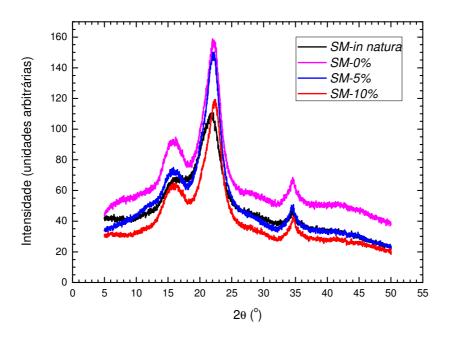
No entanto, o sabugo de milho que foi pré tratado com ácido diluído na presença de surfactante Tween 80 na condição de 5 e 10 % (m/m), a morfologia se apresenta de uma

forma mais desordenada e descompactada, sinalizando assim que a biomassa pré tratada nestas condições, facilita a ação das enzimas durante a hidrólise enzimática. Tal observação corrobora para os resultados anteriormente mencionados em que o pré-tratamento ácido do sabugo de milho favoreceu as perdas dos macrocomponentes (celulose, hemicelulose e lignina) e que o uso de Tween 80 no pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído favoreceu a remoção de lignina e hemicelulose quando empregado na concentração de 10 % (m/m) no meio reacional.

5.2.2 Análise cristalográfica do sabugo de milho por difratometria de raios X

A Figura 5.3 apresenta os resultados das análises de difratometria de raios X dos sabugos de milho *in natura* e após o pré-tratamento ácido utilizando diferentes concentrações do tensoativo Tween 80. A partir destes dados foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para as amostras de sabugo (Tabela 5.2).

Figura 5.3 – Difratograma de raios X dos sabugos de milho *in natura* (SM-*in natura*) e após pré-tratamento ácido em presença de surfactante nas concentrações (%,m/m) de: 0 (SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%).



FONTE: Arquivo pessoal.

A Tabela 5.2 mostra que os pré-tratamentos independentemente da presença ou não do surfactante Tween 80 favoreceram uma diminuição da cristalinidade do sabugo de milho.

Comparando-se a diminuição da cristalinidade em função dos pré-tratamentos realizados, encontram-se os mesmos valores (~ 60%) para as condições em que o surfactante Tween 80 estava em 0% e 5%. No entanto, a diminuição da cristalinidade foi de 81,23% quando se utilizou o pré-tratamento em presença de 10% de Tween 80. Estes resultados indicam que a combinação do pré-tratamento ácido com o coadjuvante surfactante Tween 80 podem contribuir para aumentar a susceptibilidade do material à hidrólise enzimática.

Observa-se também que a cristalinidade medida (Ic) nos sabugos pré-tratados apresentaram valores maiores do que para o sabugo *in natura* (Tabela 5.2). Muitos estudos evidenciam que o índice de cristalinidade dos materiais lignocelulósicos aumenta após as etapas de pré-tratamento e deslignificação, devido à remoção da hemicelulose e lignina, as quais são estruturas amorfas (CAO; TAN, 2002).

Tabela 5.2 – Cristalinidade dos sabugos de *milho in natura* e após pré-tratamento ácido em presença de surfactante nas concentrações (%,m/m) de: 0 (SM-0%), 5 (SM-5%) e 10 (SM-10%).

Amostras	Cristalinidade medida (Ic)	Cristalinidade esperada (Ice)	Diminuição da cristalinidade (Dc) (%)
SM-in natura	36,78		
SM-0%	52,83	113,05	60,22
SM-5%	51,01	109,89	58,88
SM-10%	46,78	128,01	81,23

FONTE: Arquivo pessoal.

O índice de cristalinidade de um material lignocelulósico mede a quantidade relativa de celulose cristalina no sólido total. Se estes valores forem corrigidos se obterá índices menores de cristalinidade devido à medição da recalcitrância do material lignocelulósico, uma vez que durante o pré-tratamento ocorre rompimento da estrutura rígida da biomassa vegetal, o que diminui a barreira física ao transporte de massa (HIMMEL et al., 2007).

De acordo com Mosier et al. (2005), as ligações de hidrogênio nas cadeias inter e intra da celulose nos materiais lignocelulósicos se rompem mediante a aplicação de diferentes prétratamentos alterando a sua cristalinidade. O índice de cristalinidade é utilizado para determinar a cristalinidade da celulose, pois a determinação do índice de cristalinidade por

DRX apresenta somente valores relativos para as regiões cristalinas e amorfas (PARK et al., 2010).

Na Figura 5.3 podem-se observar dois picos de difração referentes aos planos (101) e (002), onde se tem $2\theta = 22,24^{\circ}$ e $2\theta = 16,46^{\circ}$, respectivamente, para o sabugo *in natura*, os quais correspondem aos planos da celulose cristalina I, confirmando que a celulose nativa em plantas superiores é a celulose I. O pico principal $2\theta = 16,46^{\circ}$ no sabugo *in natura* alterou-se para valores mais baixos no eixo 2θ em todos os sabugos pré-tratados. O pico em $2\theta = 22,24^{\circ}$ alterou-se suavemente para valores mais elevados para os sabugos pré-tratados, indicando uma alteração na ordem estrutural da celulose, incluindo expansão na rede cristalina e, em alguma extensão, transformação da celulose I para celulose III (NELSON; D'CONNOR, 1964).

Os padrões de difratometria de raios X encontrados para os sabugos pré-tratados com ácido na presença de Tween 80 nas concentrações de 0 % e 5 % apresentaram-se muito similares e praticamente sobrepostos, indicando que ambas as concentrações de Tween 80 apresentaram um efeito similar sobre as mudanças estruturais no sabugo de milho *in natura*. Novamente, é evidenciado pela Figura 5.4 um efeito sinérgico positivo do Tween 80 empregado na concentração de 10% no pré-tratamento ácido do sabugo de milho, visto que nesta situação os dois picos principais apresentaram-se reduzidos em relação ao sabugo *in natura*. Estes fatos são representativos da diminuição da cristalinidade confirmada pelos valores calculados dos índices de cristalinidade apresentados na Tabela 5.2.

5.3 Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho após prétratamento do sabugo de milho com ácido sulfúrico diluído empregando como aditivo surfactante em diferentes concentrações

Os hidrolisados hemicelulósicos (HSM-0%, HSM-5% e HSM-10%) obtidos pelos prétratamentos ácido foram caracterizados em relação as suas propriedades físicas (pH e condutividade elétrica), e seus teores de açúcares e compostos furanos (furfural e 5-HMF) (Tabela 5.3)

A Tabela 5.3 mostra predominância do açúcar xilose em relação aos açúcares D-glicose e L-arabinose independentemente da associação do surfactante Tween 80 durante o pré-tratamento ácido do sabugo de milho. Estes resultados corroboram com o observado para a caracterização química dos resíduos pré-tratados (SM-0%, SM-5% e SM-10%) (item 5.1) em que se observou maior perda/solubilização da hemicelulose frente a celulose.

Tabela 5.3 – Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir do prétratamento ácido do sabugo de milho com surfactante nas concentrações (%,m/m) de: 0 (HSM-0%), 5 (HSM-5%) e 10 (HSM-10).

		HSM-0%	HSM-5%	HSM-10%
	pН	0,98	1,01	1,06
Propriedades Físicas	Condutividade (mS)	21,9	22,70	22,1
	D-xilose	24,08	25,24	24,88
Açúcares (g/L)	D-glicose	1,24	1,39	1,72
	L-arabinose	6,84	7,13	6,68
Produtos da Degradação de	Furfural	0,109	0,159	0,263
Açúcares (g/L)	Hidroximentilfurfural	0,059	0,096	0,140
(compostos Furanos)				
Ácido Acético (g/L)		3,66	3,52	3,88

FONTE: Arquivo pessoal.

De acordo com Herrera (et. al., 2003), ácidos diluídos conduzem a uma condição limitada de hidrólise conhecida como pré-hidrólise a qual é responsável para a eficiência de hidrólise da fração hemicelulósica, visto que a hemicelulose é uma molécula amorfa facilmente penetrada por catalisadores químicos devido à desordem de sua cadeia, tendo uma elevada taxa de despolimerização e consequente liberação de seus monômeros para o hidrolisado. No entanto, a degradação química da celulose por catálise ácida é um processo heterogêneo que consiste da cisão da cadeia macromolecular para formar produtos de baixo peso molecular. Além disso, ligações β 1-4 glicosídicas conferem a estrutura das fibras de celulose uma elevada estabilidade química (HERRERA et al. 2003).

É evidente pelos dados apresentados na Tabela 5.3 que ocorreu um aumento na liberação do açúcar D-glicose com o aumento da concentração de surfactante durante o prétratamento ácido. Observou-se aumento de 12,1% de D-glicose no hidrolisado hemicelulósico HSM-5% em relação ao hidrolisado hemicelulósico HSM-0%. Esse aumento foi ainda maior (38,71 %) na concentração de D-glicose no HSM-10% em relação ao HSM-0%. Este fato esta condizente com o que Kurakake et. al. (1994), que relata que o surfactante atua na região amorfa da celulose otimizando assim sua liberação para o hidrolisado.

Com relação á D-xilose e L-arabinose foi observado que suas concentrações foram praticamente mantidas no meio reacional independentemente do uso de surfactante no prétratamento. Entretanto, observa-se um aumento gradativo tanto nos teores de furfural (produto degradação das pentoses) como no 5-HMF (produto de degradação das hexoses) com a

elevação da concentração do surfactante Tween 80 no pré-tratamento. Em que o aumento de furfural foi de 45,9 % e 141,3% nos hidrolisados HSM-5% e HSM-10% com relação ao HSM-0%, respectivamente.

Com relação ao 5-HMF observou-se aumento de 62,71% e 137,3% nos hidrolisados HSM-5% e HSM-10% com relação ao HSM-0%, respectivamente. Esses resultados mostram que na presença do agente tensoativo Tween 80, a liberação de açúcares nos hidrolisados hemicelulósicos provavelmente poderia ter sido maior, se não ocorresse à formação dos compostos furanos (5-HMF e furfural) que são compostos formados a partir da degradação de açúcares.

Os resultados obtidos com relação ao pH e condutividade elétrica nos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho (Tabela 5.3) corroboram com os valores encontrados por José (2013). Neste trabalho utilizou-se as condições otimizadas de pré-tratamento ácido do sabugo de milho obtido por José (2013) que afirmou que a minimização da condutividade do hidrolisado para valores em torno de 19,8 mS/cm pelo emprego do ácido em 50 mg de ácido/g matéria seca (relação sólido liquido de 1:10) e temperatura em 133°C resultou em um hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho rico em xilose (~29 g/L).

Cabe aqui salientar que em todos os pré-tratamentos foram obtidas elevadas concentrações de xilose (~ 25 g/L) (Tabela 5.3). De acordo com Rodriguez-Chong et. al. (2004), são considerados de interesse industrial somente processos de hidrólise de materiais lignocelulósicos que apresentam rendimentos iguais ou superiores a 20 g/L, sendo, portanto, o processo de pré tratamento empregado viável do ponto de vista industrial. Os resultados obtidos para ácido acético são condizentes em vista da clivagem da ligação dos grupos pendentes das cadeias de hemicelulose.

5.4 Estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré tratado por ácido diluído na presença de diferentes concentrações de surfactante: metodologia de análise de superfície de resposta

O estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por ácido diluído na presença de diferentes concentrações de surfactante foi realizado em associação com a dosagem de enzima e adição de surfactante também ao meio reacional empregando um planejamento fatorial completo 2³ incluindo 6 pontos na fase centrada e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2^3 com fase centrada (6 pontos) e 3 repetições no ponto central para os três fatores $(X_1, X_2 e X_3)$ e resposta (Y_1) .

	Ensaios	ST* (% m/m) x ₁	SM* (% m/m) x ₂	E* (FPU/g de material lignocelulósico seco)	X ₁	X ₂	Х3	Glicose (%)
	1	0	0	x ₃ 5	-1	-1	-1	26,17
~	2	10	0	5	+1	-1	-1	58,48
ial 2	3	0	10	5	-1	+1	-1	51,49
Fator	4	10	10	5	+1	+1	-1	64,31
Planejamento Fatorial 2³	5	0	0	30	-1	-1	+1	72,08
ıejam	6	10	0	30	+1	-1	+1	91,62
Plan	7	0	10	30	-1	+1	+1	89,31
	8	10	10	30	+1	+1	+1	88,75
	9	0	5	17,5	-1	0	0	72,33
odelo	10	10	5	17,5	+1	0	0	88,73
nposição do Mo Face Centrada	11	5	0	17,5	0	-1	0	71,68
ição e Cen	12	5	10	17,5	0	+1	0	79,58
Composição do Modelo Face Centrada	13	5	5	5	0	0	-1	52,97
Con	14	5	5	30	0	0	+1	83,65
	PC1	5	5	17,5	0	0	0	81,03
ouro	PC2	5	5	17,5	0	0	0	76,58
Erro puro Ponto central	PC3	5	5	17,5	0	0	0	72,00

FONTE: Arquivo pessoal.

A Tabela 5.4 apresenta os valores reais e codificados das variáveis independentes: concentração de surfactante no pré-tratamento (ST, X_1), concentração de surfactante na hidrólise enzimática (SM, X_2) e dosagem de enzimas (E, X_3) e a resposta rendimento em glicose (Y_1).

Inicialmente foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2³ (ensaios 01 a 08) e 3 repetições no ponto central (PC1, PC2 e PC3). Nesta etapa foi possível selecionar fatores e interações de segunda ordem que foram significativos ao nível de 90-95% de confiança. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, apresentando-se em media 76,47% para o rendimento em glicose (Y₁) indicando uma boa repetibilidade do processo (Tabela 5.4).

Constatou-se que os resultados relativos ao rendimento em glicose (Y₁) apresentaram curvatura significativa e não apresentavam falta de ajuste significativo no nível de 95% de confiança. Assim, prosseguiu-se a realização dos ensaios correspondentes à face centrada (ensaios 9 a 14) para compor o modelo estatístico para o rendimento em glicose.

Conforme as condições empregadas na etapa de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por ácido diluído na presença ou não de surfactante, o rendimento em glicose variou entre 26,17 % (ensaio 01) e 91,62% (ensaio 6). Neste ensaio de maior rendimento em glicose observou-se também um bom rendimento em xilose (66,19 %) em 72 horas (Tabela 5.4).

Estes resultados mostram houve ótimo sinergismo ao se associar nível máximo de surfactante no pré-tratamento ácido em conjunto com uso máximo de dosagem de enzimas no meio reacional explicitando, portanto, que o acesso do coquetel enzimático á biomassa foi facilitado de forma que houve maior rompimento das ligações constituintes da estrutura supramolecular de celulose tornando as unidades monoméricas livres no hidrolisado aumentando assim o rendimento em glicose.

No entanto, no ensaio 5 que difere do ensaio 6 por não empregar surfactante em nenhuma das duas condições (pré-tratamento e meio reacional) observa-se menor rendimento em glicose (72 %) (Tabela 5.4) e maior rendimento em xilose (86 %).

Segundo Chen et. al. (2014), tensoativos em baixas concentrações podem criar um ambiente hidrofílico de forma a favorecer a dessorção da xilanase a partir de grupos funcionais de hemicelulose, aumentando assim a hidrólise da hemicelulose. No entanto, tensoativos em concentrações elevadas podem enfraquecer a adsorção de xilanase em hemicelulose, inibindo assim a hidrólise de hemicelulose.

Os coeficientes de regressão (Tabela 5.5) foram calculados com os resultados dos experimentos realizados de acordo com a Tabela 5.4. Observa-se que os termos lineares das variáveis (X_1 , X_2 e X_3), bem como o termo quadrático da variável X_3 juntamente com as interações X_1X_2 e X_1X_3 foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5 %

(p < 0,05). Os fatores e interações que não foram estatisticamente significativos no nível de 95% de confiança foram retirados da composição do modelo.

Tabela 5.5 – Coeficientes de regressão para a resposta rendimento em glicose, $Y_1(\%)$.

				Estimativas por			
Fatores	Coeficiente	e Erro p – va		Interva	lo (95%)		
	de regressão	padrão		Limite inferior	Limite superior		
Média	77,35182	1,24	<0,0001	74,42	80,28		
$X_1(L)$	8,05092	0,92	<0,0001	5,89	10,22		
$X_2(L)$	5,33941	0,92	0,0006	3,17	7,50		
$X_3(L)$	17,19917	0,92	<0,0001	15,03	19,36		
$X_1(Q)$	2,56633	1,77	0,1902	-1,62	6,75		
$X_2(Q)$	-2,33546	1,77	0,2283	-6,52	1,85		
$X_3(Q)$	-9,65426	1,77	0,0009	-13,84	-5,47		
X_1X_2	-4,94956	1,02	0,0019	-7,37	-2,53		
X_1X_3	-3,26955	1,02	0,0152	-5,69	-0,85		
X_2X_3	-2,09865	1,02	0,0796	-4,52	0,32		

FONTE: Arquivo pessoal.

A análise dos resíduos do modelo proposto mostrou uma disposição dos valores preditos pela curva com relação à média e seus respectivos resíduos dispostos de maneira aleatória (dados não apresentados). Este fato não sugere um padrão geométrico que possa indicar uma anormalidade na distribuição dos resíduos. Com isso, considerou-se que a curva está representando os pontos de maneira satisfatória, pois os erros seguem uma distribuição normal.

A seguir, foi realizada a análise de variância (ANOVA), que utiliza o método do ajuste do mínimo quadrado, incluindo as médias quadráticas e as interações de 2ª ordem, para testar se a equação de regressão era estatisticamente significativa. Como se pode observar pela Tabela 5.6 os níveis de significância para os fatores e interações encontram-se em 95% de confiança, indicando que o F estimado foi maior que o F Tabelado. Assim, tem-se a evidência da existência de uma relação quadrática dos fatores e interações (variáveis independentes)

com a variável resposta que é o rendimento em glicose, indicando que todos os fatores foram estatisticamente significativos, com bom intervalo de confiança.

Tabela 5.6 – Análise de variância (ANOVA) para a obtenção de um hidrolisado rico em glicose utilizando o complexo CellicCTec2 seguindo um planejamento fatorial 2³ com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Fonte de variação		Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Modelo			4547,29	6	757,88	64,19	<0,0001
		$X_1(L)$	648,17	1	648,17	54,90	<0,0001
		$X_{2}(L)$	285,09	1	285,09	24,15	0,0006
		$X_3(L)$	2958,11	1	2958,11	250,53	<0,0001
		X_3Q)	374,40	1	374,40	31,71	0,0002
		X_1X_2	195,98	1	195,98	16,60	0,0022
		X_1X_3	85,52	1	85,52	7,24	0,0227
Resíduo			118,07	10	11,81	-	-
	Falta de ajuste		77,32	8	9,66	0,47	0,8161
	Erro puro		40,76	2	20,38	-	-
Total (Corr)			4665,36	16	-	-	-

 $R^2 = 0.9747$ $R^2 \text{ (ajustado)} = 0.9595$

FONTE: Arquivo pessoal.

Na Tabela 5.6, também se encontra a análise de variância de ajuste do modelo quadrático. O resíduo total foi desmembrado em falta de ajuste e erro puro. Este procedimento é válido uma vez que foram realizadas as repetições no ponto central para poder se obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro). Assim, pode-se julgar de maneira quantitativa se o modelo representa satisfatoriamente as observações.

Analisando a Tabela 5.6 para a resposta rendimento em glicose (Y_1) , verifica-se que o modelo, depois de retirada dos termos estatisticamente não significativos ao nível de 95% de confiança foi altamente significativo (p < 0.0001) e a porcentagem de variação explicada, de

97,47%. O valor de p da análise de variância do modelo foi menor que 0,01; indicando que estatisticamente existe uma relação entre as variáveis ao nível de 99% de confiança.

A Equação 5.1 descreve o rendimento em glicose previsto pelo modelo em função das variáveis codificadas, no modelo reparametrizado que contém apenas os termos estatisticamente significativos (Tabela 5.6).

$$Y_1 = +77,41778 + 8,05092X_1 + 5,33941X_2 + 17,19917X_3 - 9,53552X_3^2 - 4,94956X_1X_2 - 3,26955X_1X_3$$
(5.1)

Em que: Y_1 corresponde ao rendimento em glicose (%) e X_1 , X_2 e X_3 correspondem aos valores codificados para as variáveis: concentração de surfactante no pré-tratamento (ST, X_1), concentração de surfactante na hidrólise enzimática (SM, X_2) e dosagem de enzimas (E, X_3), respectivamente.

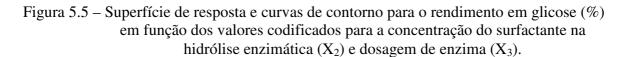
Observa-se pela Equação (5.1) que para as variáveis: concentração de surfactante no pré-tratamento (ST, X_1) , concentração de surfactante na hidrólise enzimática (SM, X_2) e dosagem de enzimas (E, X_3) , os efeitos destes fatores principais foram positivos. Isto indica que a utilização de seus maiores níveis (-1) interferiu favoravelmente no aumento do rendimento em glicose durante a hidrólise enzimática do sabugo de milho.

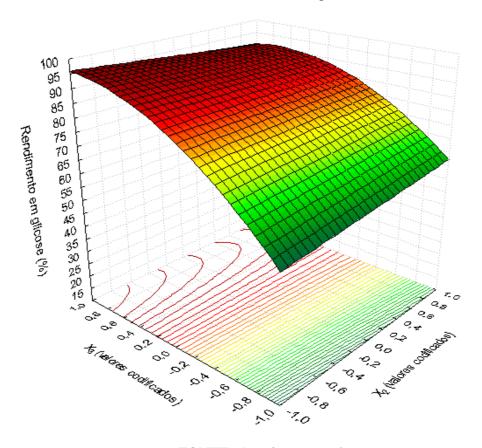
Devido à existência de efeitos de interação significativos (X_1X_2 e X_1X_3) os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. A Figura 5.4 apresenta o rendimento em glicose (Y_1) estimado em função de pares de fatores. Nestes pares o primeiro fator varia de seu nível inferior (-1) para o seu nível superior (+1). Enquanto que o segundo fator principal que compõe a interação é mantido em seu nível inferior (linha negativa) e em seu nível superior (+1) (linha positiva). Assim, os efeitos de interação de primeira ordem, X_1X_2 e X_2X_3 podem ser entendidos como a variação causada na resposta, quando se faz variar os níveis de um dos fatores "dentro" de cada nível do outro (RODRIGUES, 2014).

O rendimento em glicose foi favorecido e variou entre 80 e 90 % quando a concentração de surfactante no pré-tratamento aumentou de 0 a 10 % (m/m) mantendo-se constante em seus níveis superiores a concentração de surfactante na hidrolise enzimática (X₂, 10 % m/m) e dosagem de enzima (X₃, 30 FPU/g _{de material lignocelulósico seco}). Apesar, destes fatores (X₂ e X₃) terem sido mais significativos na variação do rendimento em glicose quando empregados em seus níveis inferiores (Figura 5.4). Nestes casos, todos os fatores além dos dois envolvidos na interação foram mantidos constantes em seus níveis centrais (Figura 5.4). No entanto estes resultados podem ser melhores visualizados na Figura 5.5.

Figura 5.4 – Interações dos fatores significativos na resposta rendimento em glicose, Y1.

FONTE: Arquivo pessoal.





FONTE: Arquivo pessoal.

Analisando a superfície de resposta e curvas de contorno, pode-se verificar a existência de uma região ótima para o rendimento em glicose onde se encontra uma faixa de combinação da concentração de surfactante na hidrolise enzimática e dosagem de enzima (Figura 5.5). Neste caso, a concentração de surfactante no pré-tratamento foi mantida em seu nível superior (10 % m/m).

Evidentemente uma condição de concentração de surfactante na hidrolise enzimática e dosagem de enzima será fixada para a reação, no entanto este resultado de faixa ótima das variáveis é muito mais interessante do que apenas um valor pontual, pois ele fornece informação sobre a robustez do processo. As condições ótimas poderiam ser obtidas derivando-se as equações para se determinar o ponto crítico (RODRIGUES, 2014).

Validação experimental

A partir da análise da superfície de resposta foi possível determinar as condições de processo em que se obtém máximo rendimento em glicose. Esta análise foi facilitada com o uso do Software DESIGN-EXPERT 6.0.6. Tais condições empregadas na hidrolise enzimática do sabugo de milho pré-tratado com ácido diluído na presença de surfactante são apresentadas na Tabela 5.7.

Vários mecanismos subjacentes ao efeito positivo da adição de surfactante na hidrólise enzimática foram apresentados (OLSEN et al., 2011; WANG et al., 2011). Estes mecanismos incluem a alteração da natureza da celulose e a melhoria da acessibilidade das enzimas (HELLE et al., 1993; KAAR; HOLTZAPPLE, 1998) reduzindo a adsorção irreversível das enzima sobre a lignina (ERIKSSON et al., 2002; ZHANG et al., 2011), melhorando a estabilidade da celulase e prevenindo a desnaturação enzimática durante a hidrólise (KAAR; HOLTZAPPLE, 1998).

Outra possibilidade, é que o surfactante age de forma a aumentar o contato entre a celulose e o coquetel enzimático, bem como permitir que a enzima atinja áreas anteriormente inacessíveis (KAAR; HOLTZAPPLE, 1998). Além disso, Ooshima et al., (1986) mostrou que os surfactantes impedem a adsorção da endoglucanase da celulose e alteram o equilíbrio de adsorção da endoglucanase e exoglucanase, aumentando assim a concentração de endoglucanase na fase líquida. Os surfactantes melhoram eficazmente a atividade enzimática durante a hidrólise por ligação à estrutura terciária da proteína enzimática (YOON; ROBYT, 2005). Okino et al. (2013) mostraram que Tween 80 pode melhorar e estabilizar não apenas a produção de enzimas celulase, mas também hidrólise de celulose.

Tabela 5.7 – Condições operacionais utilizadas no ensaio experimental para validação dos modelos.

Variável	Valor codificado	Condição experimental
Concentração de surfactante no pré-tratamento (ST, X_1)	+1	10%
Concentração de surfactante na hidrólise enzimática (SM, X ₂)	+0,96	9,8%
Dosagem de enzima (E, X ₃)	+0,62	25,25 FPU

A Tabela 5.8 mostra os resultados preditos e observados pelo ensaio de validação experimental. O resultado experimental para o rendimento em glicose assemelhou-se com o resultado predito. Apesar da existência de desvios entre os resultados experimentais e preditos, pode-se considerar que os resultados obtidos no ensaio de validação foram satisfatórios, indicando que o modelo pode representar matematicamente o rendimento em glicose com um coeficiente de determinação de 0,9747.

Tabela 5.8 – Resultados preditos e experimentais obtidos nas condições de ponto ótimo do processo de hidrolise enzimática do sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído em associação com surfactante.

Variável de resposta	Resultado predito *	Resultado experimental
Rendimento em glicose (%)	89,56%	80,54%

^{*}modelos reparametrizados constituídos apenas dos parâmetros estatisticamente significativos .

FONTE: Arquivo pessoal.

Nestas condições experimentais em que o rendimento em glicose foi maximizado em (80,54%) foi obtido um hidrolisado contendo 61,98 g/L de glicose. Também foi observado 13,02 g/L de xilose correspondendo a um rendimento em xilose de 70,66%.

A partir da concentração ótima, foi traçado o perfil cinético da hidrólise enzimática do sabugo de milho (Figura 5.6) utilizando o coquetel enzimático CellicCTec2.

A partir da Figura 5.6 nota-se que houve uma liberação máxima em 72 horas para glicose, xilose e celobiose. Para glicose, observa-se que o período entre 2 horas e 24 horas foi onde ocorreu maior liberação de glicose. No caso de xilose, constata-se que o período entre 8 horas e 48 horas foi onde ocorreu maior lise das cadeias de hemicelulose. A celobiose, devida às baixas concentrações foi somente possível ser detectada a partir de 8 horas.

glicose xilose celobiose celobiose (g/L) D-xilose (g/L))-glicose (g/l

Figura 5.6 – Concentração de açúcares em função do tempo da hidrólise enzimática do sabugo de milho na condição otimizada.

Tempo (h)

Cai et al. (2016) estudou a hidrólise enzimática do sabugo de milho sob condições semelhantes ao do presente trabalho (pH 4,8; agitação 200 rpm; 72 horas de reação). O estudo utilizou o complexo enzimático comercial Cellulase KDN Biotech, empregando dois tipos de pré-tratamento diferentes: ácido e alcalino. De acordo com o autor, quando utilizado o tratamento ácido, obteve-se um rendimento de glicose ligeiramente inferior do que quando utilizado o tratamento alcalino (CAI et al., 2016). O fato deve-se que o tratamento alcalino é eficaz na deslignificação da biomassa evitando, por conseguinte, potenciais inibidores provenientes da lignina durante a hidrólise enzimática.

No entanto, observa-se que para a hidrólise enzimática da biomassa pré-tratada pelo tratamento alcalino, a relação sólido líquido foi inferior (5% m/v) ao do pré tratamento ácido (10% m/v). Além disso, nesta condição, foi requerida uma dosagem de 40 FPU/g_{material} lignocelulósico seco da enzima Cellulase KDN Biotech, frente a 30 FPU/g_{material} lignocelulósico seco da mesma enzima para o ensaio de pré-tratamento ácido. Os rendimentos de glicose obtidos para a biomassa pré-tratada com ácido e álcali foram, respectivamente, 78,1% e 77,4-86,9%.

Comparando ambos os resultados com o resultado do presente trabalho, nota-se que o presente trabalho obteve um rendimento de 80,54% na condição ótima utilizando uma menor dosagem de enzimas do que em ambos os estudos (25,25 FPU/g_{material lignocelulósico seco}). Com relação ao rendimento de hemicelulose, Cai et al. (2016) obteve um rendimento máximo de 61,90% quando utilizado a dosagem enzimática de 40 FPU/g_{material lignocelulósico seco}. O presente estudo obteve 70,66% utilizando 25,25 FPU/g_{material lignocelulósico seco}.

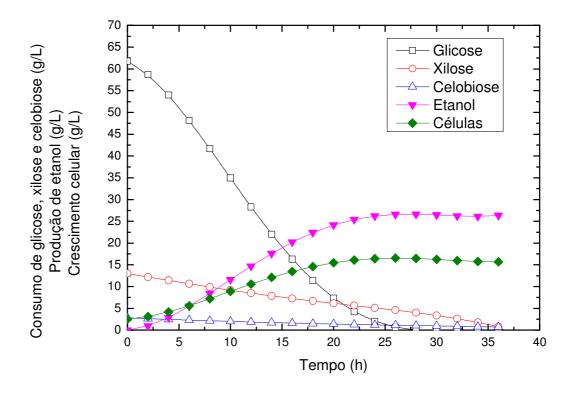
Por fim, conclui-se que a interação entre a adição de surfactante durante o prétratamento e a hidrólise enzimática atuou sinergicamente com o complexo enzimático e resultaram em um hidrolisado rico em glicose e xilose de forma a minimizar a dosagem de enzimas requerida.

5.5 Obtenção de bioetanol pelo processo de hidrólise e fermentação separada (SHF) em condições otimizadas para maior rendimento de glicose

A Figura 5.7 mostra os resultados obtidos durante o ensaio de SHF para o crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob condições otimizadas de hidrólise enzimática (SHF).

Constatou-se que a máxima concentração celular (16,54 g/L) foi obtida em 26 horas de cultivo apresentando um rendimento em células de 0,23 g/g (Tabela 5.9); Neste tempo, obteve-se consumo de glicose de 98,95 % e máxima produção em etanol (26,60 g/L) (Figura 5.7). Também foi observado que a xilose (64,90%) foi consumida concomitantemente com a glicose e que o consumo de celobiose (60,12%) só foi observado após drástico consumo de glicose.

Figura 5.7 – Concentração dos açúcares glicose, xilose, celobiose; produção de etanol e crescimento celular por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob condições otimizadas de hidrólise enzimática (SHF).



A Tabela 5.9 mostra elevada produtividade volumétrica em etanol (Q_p) $(1,02\,g_{\text{etanol}}/\text{L.h})$ a partir dos açúcares (glicose, xilose e celobiose) consumidos em 26 horas de cultivo com fator de conversão destes açúcares em etanol $(Y_{p/s})$ de 0,37 g/g, correspondendo a uma eficiência de 74%.

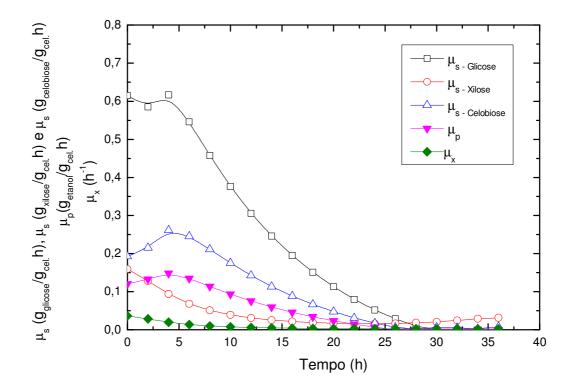
As velocidades específicas máximas de consumo ($\mu_{smáx}$) de glicose, xilose e celobiose foram de 0,616 $g_{glicose}/g_{cel}$.h; 0,128 g_{xilose}/g_{cel} .h; 0,029 $g_{celobiose}/g_{cel}$.h, respectivamente, sendo que para glicose esta velocidade apresentou-se constante por 4 horas enquanto para xilose e celobiose o valor máximo foi atingido em 2 horas de cultivo (Tabela 5.9 e Figura 5.8). A levedura *S. stipitis* CBS 6054 é conhecida por ser uma excelente fermentadora de xilose. No entanto, os resultados mostraram que ela foi capaz de consumir a celobiose com maior velocidade específica do que para a xilose (Figura 5.8).

Tabela 5.9 – Parâmetros fermentativos do cultivo de *S. stipitis CBS 6054* para produção de etanol em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob condições otimizadas de hidrólise enzimática.

Parâmetros	SHF	Tempo
		(h)
P _{etanol} máx (g/L)	26,60	26
$Q_p\left(g_{etanol}/L.h\right)$	1,02	26
$\mu_{xm\acute{a}x}~(h^{\text{-}1})$	0,15	4
$\mu_{\text{sm\'ax}}(g_{\text{glicose}}\!/g_{\text{cel}}\!.h)$	0,62	4
$\mu_{\text{sm\'ax}}(g_{\text{xilose}}\!/g_{\text{cel}}.h)$	0,13	2
$\mu_{sm\acute{a}x}(g_{celobiose}/g_{cel}.h)$	0,03	2
$\mu_{pm\acute{a}x}\left(g_{etanol}/g_{cel}\textbf{.}h\right)$	0,26	4
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,37	26
$Y_{x/s}(g/g)$	0,23	26
Consumo de açúcares totais (%)	91,83	26
Consumo de glicose (%)	98,95	26
Consumo de xilose (%)	64,90	26
Consumo de celobiose (%)	60,12	26
η (%)	74,00	26

A velocidade específica máxima de produção de etanol ($\mu_{pmáx}$) atingida em 4 horas foi de 0,262 g_{etanol}/g_{cel} .h (Figura 5.8). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{xmáx}$) de *S. stipitis* CBS 6054 foi de 0,148 h⁻¹ atingida em 4 horas (Figura 5.8). Em vista de tais parâmetros serem em função da célula, para se ter melhores resultados deve-se estudar como a variação de pH, agitação e nutrientes do meio refletem nos resultados. O presente estudo utilizou valores de pH e agitação otimizados para a estirpe adotada.

Figura 5.8 – Velocidades específicas em função do tempo de cultivo de *S. stipitis CBS 6054* em hidrolisado celulósico de sabugo de milho obtido sob condições otimizadas de hidrólise enzimática de: consumos de glicose ($\mu_{s\text{-glicose}}$), xilose ($\mu_{s\text{-xilose}}$) e celobiose ($\mu_{s\text{-celobiose}}$); produção de etanol e crescimento celular (μ_{x}).



Li et al. (2016) estudou a obtenção de etanol celulósico pelo processo SHF utilizando como substrato cinco partes do milho (folhas, flores, sabugo, espiga e casca) empregando também pré-tratamento ácido nestes materiais. No entanto, o processo de sacarificação enzimática foi conduzido em *shaker* com agitação de 150 rpm e dosagem enzimática de 15 FPU/g_{material lignocelulósico seco} (10% (m/v) de complexo enzimático Cellulase KDN Biotech). A etapa de fermentação foi conduzida em reator a 200rpm e 30 °C empregando *Saccharomyces cerevisiae* 3013.

Estes autores mostraram que os maiores rendimentos em glicose, xilose e etanol foram encontrados ao se utilizar como matéria-prima o sabugo de milho por este possuir maior quantidade de celulose do que as fibras da casca, folhas e flores resultando em um maior rendimento de monossacarídeos e etanol. Além disso, estes autores também constataram que devido à estrutura das fibras das flores serem mais compactas ocorreu

menor rompimento da estrutura cristalina da celulose pelo ácido sulfúrico e, consequentemente, obteve-se baixo rendimento de glicose no hidrolisado.

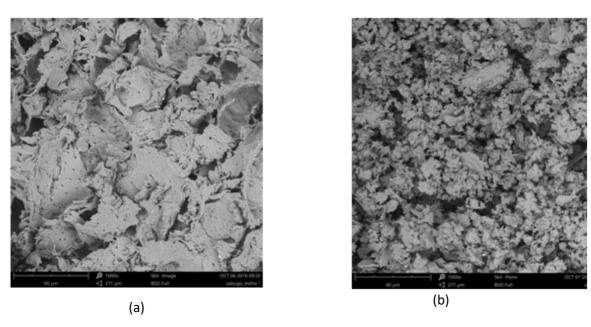
Com a utilização do sabugo de milho, estes autores obtiveram concentrações de glicose e xilose (52,7 g/L e 4,5 g/L, respectivamente) inferiores as concentrações encontradas pelo presente estudo (61,98 g/L para glicose e 13,02 g/L para xilose) O fato pode ser explicado em vista que Li (et al., 2016) utilizaram uma dosagem enzimática inferior (15 FPU/g_{material lignocelulósico seco}) a condição ótima do presente estudo (25 FPU/g_{material lignocelulósico seco}). Além disso, o presente estudo teve a ação coadjuvante do aditivo Tween 80, que teve uma notória atuação no rendimento em glicose na etapa de hidrolise enzimática do sabugo de milho.

Constatou-se ainda que a produção de etanol obtida pelas condições ótimas (26,60 g/L), foi próxima a obtida por Li (et al., 2016) (24,0 g/L) que empregaram *Saccharomyces cerevisiae* 3013. Os valores encontrados para Y_{p/s} (0,37 g/g) e Q_p (1,02 g_{etanol}/L.h) são próximos aos encontrados pelo autor (Y_{p/s}=0,476 g/g e Q_p=1,33 g_{etanol}/L.h), no entanto a eficiência do processo de Li (et al., 2016) foi de 93% frente a 74% do presente estudo. Essa diferença na eficiência de conversão deve-se provavelmente ao emprego por estes autores de *Saccharomyces cerevisiae* 3013.

5.6 Caracterização de celulignina após pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática: análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura e análise cristalográfica por difratometria de raios X

A superfície do sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído com o coadjuvante Tween 80 (10 % m/m) (Figura 5.9a e subsequente hidrólise enzimática nas condições otimizadas foi modificada tornando-se mais porosa e fragmentada. Tal fato corrobora com o difratograma apresentado na Figura 5.10 em que se evidencia a ação do complexo CellicCTec 2 sobre a celulose cristalina. Anteriormente foi observada diminuição da cristalinidade em 81,23% quando se utilizou o pré-tratamento em presença de 10% de *Tween 80* em comparação com o material *in natura* o que pode ter favorecido o aumento da susceptibilidade do material à hidrólise enzimática (Figura 5.9b).

Figura 5.9 – Fotomicrografias de MEV (magnificação de 1000 vezes) da superfície do sabugo de milho submetido ao pré-tratamento ácido com surfactante *Tween* SM-10% (a) com subsequente hidrólise enzimática (b).

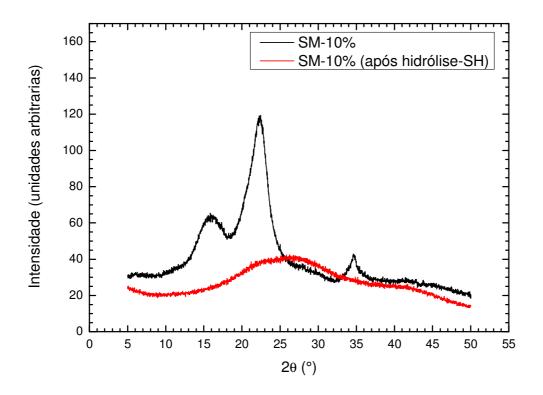


A Figura 5.10 apresenta os resultados das análises de difratometria de raios X do sabugo de milho após o pré-tratamento ácido utilizando concentrações do tensoativo Tween 80 em 10% (m/m) com subsequente hidrólise enzimática.

A partir destes dados foram obtidos os valores de índice de cristalinidade para as amostras de sabugo e notou-se que os dois picos principais de difração referentes aos planos (101) e (002), onde se tem $2\theta = 22,24^{\circ}$ e $2\theta = 16,46^{\circ}$, para o sabugo de milho antes da sacarificação enzimática, os quais correspondem aos planos da celulose cristalina I, não foram observados após a sacarificação.

Evidenciando que o complexo enzimático agiu de forma eficiente rompendo a celulose cristalina e que o material resultante apresentou-se amorfo. Tal resultado evidencia a atuação das β-D-glucosidases (EC 3.2.1.21) sobre a celulose cristalina (WILSON, 2011).

Figura 5.10 – Difratograma de raios X do sabugo de milho submetido ao pré-tratamento ácido com surfactante Tween 80 (SM-10%) e SM-10% após hidrólise enzimática (SHF).



O material residual amorfo obtido corrobora para os altos valores de glicose encontrados nos meios reacionais. Assim, conclui-se que para a obtenção de bioetanol, com complexo enzimático CellicCTec 2 foi adequado, no entanto, para a obtenção de outros produtos de alto valor agregado como, por exemplo, a nanocelulose cristalina, o tratamento enzimático foi agressivo sobre a estrutura cristalina, não restando material cristalino no sólido residual.

6 CONCLUSÕES

Com relação à análise composicional, morfológica e cristalográfica dos sabugos de milho *in natura* e após pré-tratamento ácido na presença de diferentes concentrações do surfactante Tween 80 concluiu-se que:

- O pré-tratamento ácido do sabugo de milho favoreceu as perdas dos macrocomponentes (celulose, hemicelulose e lignina) do sabugo de milho *in natura* independentemente da adição do surfactante Tween 80. No entanto, maior efeito na remoção destes macrocomponentes foi quando empregou-se maior concentração (10% m/m) de Tween 80 no meio reacional.
- Os sabugos pré-tratados (SM-0%, SM-5% e SM-10%) estão praticamente livres de hemicelulose e o aumento nas concentrações de surfactante Tween 80 no meio reacional interferiu positivamente na morfologia (aumento na porosidade, fragmentação e diminuição da cristalinidade) dos sabugos de milho pré-tratados com ácido diluído facilitando a sacarificação enzimática da celulose na próxima etapa deste trabalho.

Com relação à composição parcial dos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho conclui-se que:

 O uso do surfactante Tween 80 favoreceu a liberação de monômeros no meio de reação, no entanto nas condições do pré-tratamento ácido ocorreu degradação destes açúcares em furfural e 5-HMF. Estes compostos foram formados em maior quantidade com o aumento da concentração de surfactante no meio reacional.

Com relação ao estudo da hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado por ácido diluído na presença de diferentes concentrações de surfactante em associação com a dosagem de enzima e adição de surfactante ao meio reacional conclui-se que:

 A análise da superfície de resposta permitiu determinar as condições ótimas do processo para obtenção de máximo rendimento em glicose (entre 80 e 90 %) que foi quando a concentração de surfactante no pré-tratamento aumentou de 0 a 10 % (m/m) mantendo-se constante em seu nível superior a concentração de surfactante na hidrolise enzimática (10 % m/m) com redução na dosagem de enzima (25.50 FPU/g de material lignocelulósico seco).

 Nestas condições experimentais o modelo estatístico para obtenção de maior rendimento em glicose foi validado experimentalmente favorecendo elevados rendimento em glicose (80,54%) e concentração em glicose (61,98 g/L) no meio reacional concomitantemente com o favorecimento no rendimento em xilose (70,66%).

Com relação á realização na condição otimizada de hidrólise enzimática do sabugo de milho pré-tratado a fermentação em separado (SHF) para produção de etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 concluem-se que:

- Esta levedura fermentou concomitantemente os açúcares (glicose, xilose e celobiose) a etanol com elevados fator de conversão (0,37 g.g⁻¹) e produtividade volumétrica (1,02 g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹). No entanto, a velocidade especifica máxima de consumo destes açúcares foi favorecida na seguinte ordem: glicose, celobiose e xilose.
- A superfície do sabugo de milho pré-tratado com ácido sulfúrico diluído com o coadjuvante Tween 80 (10 % m/m) e subsequente hidrólise enzimática nas condições otimizadas foi modificada tornando-se mais porosa e fragmentada. Evidenciando que o complexo enzimático agiu de forma eficiente rompendo a celulose cristalina e que o material resultante apresentou-se amorfo. O material residual amorfo obtido corrobora para os altos valores de glicose encontrados nos meios reacionais.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realização do SHF na condição otimizada, avaliando diferentes parâmetros durante a fermentação tais como aeração e diferentes composições de meio.
- Realização do SHF na condição otimizada para Saccharomyces cerevisiae.
- Extração e caracterização de nanocelulose cristalina com diferentes coquetéis enzimáticos.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. M. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulases produzidas pelo fungo Aspergillus niger, 2010. Dissertação (Mestrado) PPG-EQ/Unioeste, Paraná.
- ALMEIDA, J. R. M.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes ad impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiol Biotechnology**, v.82, p.625-638, 2009.
- ALKASRAWI, M.; ERIKSSON, T.; BÖRJESSON, T.; WINGREN, A.; GALBE, M.; TJERNELD, F.; ZACCHI, G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. **Enzyme and Microbial Technology**. v.33, p.71–78, 2003.
- ALRIKSSON, B.; CAVKA, A.; JONSSOM, L.J. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents. **Bioresource Technology**, v.102, p.1254-1263, 2011.
- BABIKER, M. A.; BANAT, A.; HOSHIDA, H.; ANO, A.; NONKLANG, S.; AKADA, R. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.861-867, 2010.
- BALLSTROS, J.; OLIVIA, M.; CARASCOA, J. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded poplar biomass to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.70, p.369–381, 1998.
- BARNETT, J.A. The Utilization of Sugars by Yeast. **Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, New York, v. 32, p. 125-234, 1976.
- BARROS-NETO, B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: UNICAMP, 1995. p. 299.
- BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Renewable Sustainable Energy Revision.** v. 36, p. 91-106, 2014.
- BENNETZEN, JL; HALLI,BD. The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for Alcohol dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v.257, p.3018-3025, 1982.
- BON, E. P. S., GIRÍO, F.; PEREIRA, N. J. Enzimas na produção de etanol. **Enzimas em biotecnologia:** produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p.506.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Relação das unidades produtoras cadastradas no departamento de cana de açúcar e agroenergia,** 2013. Disponível em http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/Orie ntacoes_Tecnicas/Usinas%20e%20Destilarias%20Cadastradas/DADOS_PRODUTORES_23-08-2013.pdf Acesso em: 15 dez 2016.

- BRUINENBERG, P. M.; DE BOT P. H. M.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.256-260, 1984.
- CAI, D.; LI, P.; LUO, Z.; QIN, P.; CHEN, C.; WANG, Y.; WANG, Z.; TAN, T.; Effect of dilute alkaline pretreatment on conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone-butanol-ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v.211, p.117-124, 2016.
- CANILHA, L.; CÂNDIDO, E. J.; SILVA, J. B. A. Improvement in xylitol production achieved by the use of a wheat straw hemicellulosic hydrolisate. In: **Seminário De Hidrólise Enzimática De Biomassas**, 7, p.113, Maringá. UEM, 2002.
- CAO, Y; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. 2002. Disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151209. Acesso em: 03 mar 2016.
- CASTRO, P. R. C. Maturadores químicos em cana-de-açúcar. In: **Semana Da Cana-De Açúcar De Piracicaba**, 4., Piracicaba. Anais. Piracicaba: Saccharum, v. 1, p. 12-16, 1999.
- CASTRO, R. C. A. Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de Lorena, 2011.
- CHEN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; QIN, W.; GUO, C.; GUO, X.; XIAO, D.; Enhanced enzymatic xylose/cellulose fractionation from alkaline liquor-pretreated corn cob by surfactant addition and separate fermentation to bioethanol. **Turkish Journal of Biology**, v.38, p.478-484, 2014.
- CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira de Cana de Açúcar**. Ano base 2014. 2015. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_04_13_08_49_33_boletim_cana_p ortugues_-_1o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em: 15 dez 2016.
- CONAB Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra brasileira de Grãos**. Ano base 2014. 2015. Disponível em http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_06_11_09_00_38_boletim_graos_j unho_2015.pdf Acesso em: 25 fev 2016.
- COSTA, J. A.; MARQUES, J. E.; GONÇALVES, L. R. B.; ROCHA, M. V. P. Enhanced enzymatic hydrolysis and ethanol production from cashew apple bagasse pretreated with alkaline hydrogen peroxide. **Bioresource Technology**, v.179, p.249-259, 2015.
- CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food Biotechnology**, New York, v.14, p.79-97, 2000.
- DAGNINO, E.P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, p.363-368, 2012.

- DAS, O.; SARMAH, A. K.; Mechanism of waste biomass pyrolysis: Effect of physical and chemical pre-treatments. **Science of the Total Environment**. v. 537, p. 323-334, 2015.
- DAHNUM, D.; TASUM, S. O.; TRIWAHYUNI, E.; NURDIN, M.; ABIMANYU, H. Comparison of SHF and SSF processes using enzyme and dry yeast for optimization of bioethanol production from empty fruit bunch. **Energy Procedia**, v.68, p.107-116, 2015.
- du PREEZ, J.C., BOSCH, M., PRIOR, B.A. Xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, Temperature and Substrate Concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.8, p.360-364, 1986.
- ERRIKSSON, T.; KARLSSON, J.; TJERLAND, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Enzyme and Microbial Technology,** v.3, p.353–364, 2002.
- ECKARD, A.D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. Pretreatment of extruded corn stover with polyethylene glycol to enhance enzymatic hydrolysis: Optimization, kinetics, and mechanism of action. **BioEnergy Research**, v.5, p.424–438. 2011.
- ECKARD, A.D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. Evaluation of the role of polymerized micelles on yield of hydrolysis, chemical changes of biomass and cellulase structure and adsorption. **Bioenergy Research**, 2013.
- ECKARD, A.D.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; GIBBONS, W. Enzyme recycling in a simultaneous & separate saccharification and fermentation of corn stover: comparing polymeric micelles of surfactants and polypeptides. **Bioresource Technology**, v.132, p.202–209, 2013.
- EIA Energy Information Administration US. **Use of energy in the United States**. Disponível em http://www.eia.gov/energyexplained/?page=us_energy_transportation. Acesso em: 14 nov 2016.
- ENTENDENDO o mercado do milho. In: Jornalismo Agropecuário workshop. 2015. Disponível em http://www.imea.com.br/upload/pdf/arquivos/Paper_jornalistas_Milho_AO.pdf. Acesso em: 26 jan 2015.
- FENGEL, D.; WEGNER, G. **Wood-chemistry, ultrastruture and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, D.M. Estudo da estabilidade térmica de blendas de poli(álcool vinílico)/lignina modificada. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Maringá.
- GARCIA-APARICIO, M.P.; OLIVA, J.M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M. J. Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *kluyveromyces marxianus* cect 10875. **Fuel,** v.90, p.1624-1630, 2011.

GAUSS, W. F.; SUZUKI, S.; TAKAGI, M.; Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. v. 3990944. Bio Research Center Company Limited. 1976.

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

GROHMANN, K., TORGET, R., HIMMEL, M. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. **Biotechnology and Bioengineering**. v.15, p.59–80, 1989.

HAHN-HAGERDAL, B. et al. Trends in biotechology. v.24. n.12, p.549-556, 2006.

HARISH, B. S.; RAMAIAH, M. J.; UPPULURI, K. B. Bioengineering strategies on catalysis for the effective production of renewable and sustainable energy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.51, p.533-547, 2015.

HELLE, S.S.; DUFF, S.J.B.; COOPER, D.G. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v.42, p.611–617, 1993.

HERRERA, A; TÉLLEZ-LUIS, S.J; GONZÁLEZ-CABRIALES J.J; RAMÍREZ, J.A, VÁZQUEZ M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v.63, p.103-109, 2003.

HIMMEL, M. E.; DING, S-H.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W.S.; NIMLOS, M. R; Brady J. W.; FOUST, T.D. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v.315, p.804-807, 2007.

HOYER, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Influence of fiber degradation and concentration of fermentable sugars on simultaneous saccharification and fermentation of high-solids spruce slurry to ethanol. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.145, 2013.

HUYAN, J.K.; SUNG, B.K.; CHANG, J.K. The effect of nonionic surfactants on the pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.12, p.147–151, 2007.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v.27, p.1-32, 1983.

JEFFRIES, T.W, JIN Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 63, p.117-61, 2004.

JOSÉ A.H.M; RODRIGUES RCLB. Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por hidrólise ácida para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037. EEL, 2013. Relatório de iniciação científica – PIBIC.

JEOH, T.; ISHIZAWA, C.I.; DAVIS, M.F.; HIMMEL, M.E.; ADNEY, W.S.; JOHNSON, D.K. Cellulase digestibility of pretreated biomassis limited by cellulose accessibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v.98, p.112–22, 2007

JONSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, p.6-16, 2014.

- KAAR, W.E.; HOLTZAPPLE, M.T. Benefits from tween during enzymic hydrolysis of corn stover. **Biotechnology and Bioengineering**. v.59, p.419–427, 1998.
- KAZI, F.K.; FORTMAN, J.A.; ANEXM, R.P.; HSUM, D.D.; ADENM, A.; DUTTAM, A.; KOTHANDARAMAN, G. Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. **Fuel.** v.89, p.20–28, 2010.
- KIM, T.H.; LEE, Y.Y.; SUNWOO, C.; KIM, J.S. Pretreatment of corn stover by low liquid ammonia recycle percolation process. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v.133, p.41–57, 2006.
- KRISTNSEN, J. B.; JORGENSEN, H.; FELBT, C. Enzymatic conversion of lignocelluloses into fermetable sugars: challenges and opportunities. **Biofuels Bioproducts e Biorefining.** v.1, p. 119-134, 2007.
- KURAKAKE, M.; OOSHIMA, H.; KATO, J.; HARANO, Y. Pretreatment of bagass by non-ionic surfactant for the enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v.49, p.247–251, 1994.
- KUMAGAI, A.; KAWAMURA, S.; LEE, S. H.; ENDO, T.; RODRIGUEZ, M.; MIELENZ, J. R. Simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing for *Hinoki cypress* and *Eucalyptus* after fibrillation by steam and subsequent wet-disk milling. **Bioresource Technology**, v.162, p. 89-95, 2014.
- KUMAR, R.; WYMAN, C.E. Effect of additives on the digestibility of corn stover solid following pretreatment by leading technologies. **Biotechnology and Bioengineering,** v.102, p.1544–1557, 2008.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. E. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, p.1081-1099, 2005.
- LEE, J.W.; RODRIGUES, R.C.L.B.; JEFFRIES, T.W. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. **Bioresource Technology**, v.100, p.6307-6311, 2009.
- LEWIN, M. The impact of Kurt Lewin's life on the place of social issues in his work. **Journal of Social Issues**, v.48, n. 2, p.15–29, 1991.
- LINDHOUD, S. Polyelectrolyte complex micelles as wrapping for enzymes. 2009. Thesis (PhD), Wageningen Universiteit, Wageningen, The Netherlands.
- LI, P.; CAI, D.; LUO, Z.; QIN, P.; CHEN, C.; WANG, Y.; ZHANG, C.; WANG, Z.; TAN, T. Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production. **Bioresource Technology**, v.206, p.86-92, 2016.
- LI, Z.; GUO, X.; FENG, X.; LI, C. An environment friendly and efficient process for xylitol bioconversion from enzymatic corncob hydrolysate by adapted *Candida tropicalis*. **Chemical Engineering Journal**, v.263, p.249-256, 2015.

MANOCHIO, C. Produção de bioetanol de cana-de-açúcar, milho e beterraba: uma comparação dos indicadores tecnológicos, ambientais e econômicos. 2014. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Engenharia Química pela Universidade Federal de Alfenas- Campus Poços de Caldas, Poços de Caldas, 2014.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Natural products analysis over the last decades. **Planta Medica,** v.75, p.672-682, 2009.

MORI, N. R. Etanol celulósico a partir da palha e do bagaço de cana-de-açúcar: prétratamentos e conversão biotecnológica não convencionais. 2015. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ERLAND, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Biotechnology**, v.96, n.6, p.673-686, 2005.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.28, p.34-39, set/out 2002.

NASIRPOUR F.; IQBAL, Z.; KHAN, A.; AHMAD, L.; SHAH, Y.; KHAN, A.Z.; KHAN, J.A.; KHAN, S. Simultaneous determination of timolol maleate, rosuvastatin calcium and diclofenac sodium in pharmaceuticals and physiological fluids using HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.879, n.30, p.3434-3443, 2014.

NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY, GOLDEN, CO. LAP009., NREL 1996. Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass. Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html, Acessado em 22/01/2016

NELSON, M.L., O'CONNOR, R.T. Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. **Journal of Applied Polymer Science**, v.8, p.1325–1341, 1964.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton. v.98-100, p.49-58, 2002.

NOVACANA 2016. **Etanol de milho: o novo combustível do Mato Grosso.** Disponível em https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/etanol-milho-novo-combustivel-mato-grosso-120416/ Acesso em: 01 dez 2016.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova,** v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

OHGREN, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of Biotechnology**, v.126, p.488-498, 2006.

- OKINO, S.; IKEO, M.; UENO, Y.; TANEDA, D. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions. **Bioresource Technology**, v.142, p.535–539, 2013.
- OLSEN, S.N.; BOHLIN, C.; MURPHY, L.; BORCH, K.; MCFARLAND, K.C.; SWEENY, M.D.; WESTH, P.. Effects of non-ionic surfactants on the interactions between cellulases and tannic acid: a model system for cellulase–poly-phenol interactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p.353–359, 2011.
- OOSHIMA, H.; SAKATA, M.; HARANO, Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant. **Biotechnology and Bioengineering**, v.28, p.1727–1734, 1986.
- PASSOTH, V; ZIMMERMANN, M; KLINNER, U. Peculiarities of the regulation of fermentation and respiration in the crabtree-negative, xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v.57/58, p.201–212, 1986.
- PEREIRA Jr., N.; CASTRO, A. M.. Produção e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova,** v.33, n.1, p.181-188, 2010.
- PESSANI, N.K.; ATIYEH, H.K.; WILKINS, M.R.; BELLMER, D.D.; BANAT, I.M. Simultaneous saccharification and fermentation of Kanlow switchgrass by thermotolerant Kluyveromyces marxianus IMB3: the effect of enzyme loading, temperature and higher solid loadings. **Bioresource Technology**, v.102, p.10618-10624, 2011.
- QING, Q.; YANG, B.; WYMAN, C.E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. **Bioresource Technology.** v. 101, p. 9624–9630, 2010.
- QIU, Z.; AITA, G.M.; WALKER, M.S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse. **Bioresource Technology**, v.117, p.251–256, 2012.
- RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2007. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas.
- RAMOS, L.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: Seminário nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais. 2000. São Paulo: Cetesb.
- RAMOS, R. R. F. **Desenvolvimento de compósitos de polipropileno (PP) com sabugo de milho (SM) provenientes de resíduos agrícolas**. 2013. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba. 2013.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: Challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.199, p.92-102, 2016.
- RODRIGUES, R.C.L.B. Influência da disponibilidade de O₂ no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana. 2005. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

- RODRIGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v.61, n.2, p.143-152, 2004.
- ROSEIRO, J.C.; PEITO, M.A.; GIRIO, F.M.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. The Effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaromyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, v.165, p.484-490, 1991.
- SAHA B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Indian Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.
- SANTOS, M. F. R. F. Elaboração do technology roadmap para biorrefinaria de Produtos da lignina no Brasil. 2011. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SEO, D.J.; FUJITO, H.; SAKODA, A. Effects of a non-ionic surfactant, Tween 20, on adsorption /desorption of saccharification enzymes onto/from lignocelluloses and saccharification rate. **Adsorption**, v.17, p.813–822, 2011.
- SOCCOL, C. R, VANDENBERGHE, L. P. S, RODRIGUES, C., PANDEY, A. New perspectives for citric acid production and application. **Food Technol Biotechnol.** 2006.
- SINDICOM Sindicato Nacional das Empresas Distribuidoras de Combustíveis e de Lubrificantes. **Vendas dos combustíveis derivados do petróleo e etanol hidratado**. Ano base 2015. Disponível em http://www.sindicom.com.br/sind_estatisticas/download/Vendas_Combst_SINDICOM-porCIA-ANO2015.pdf. Acesso em: 16 dez 2016.
- SLININGER, P.J., BOLEN, P.L., KURTZMAN, C.P. *Pachysolen tonnophilus*: Properties and Process Consideration for ethanol production from D-Xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey. v. 9, p. 5-15, 1987.
- STANBURY, P.F.; WHITAKER, A; HALL, S.J. Media for industrial fermentations. In PRINCIPLES of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press. p. 93–121. 1995.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hidrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. **Bioresource Techonology**, v.83, p.1-11, 2002.
- TAYLOR, K.B.; BECK, M.J.; HUANG, D.H.; SAKAI, T.T. The Fermentation of xylose: studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p.29-41, 1990.
- TEIXEIRA, R. S. S.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; BON, E. P. S. Amino acids interference on the quantification of reducing sugars by the 3,5-dinitrosalicylic acid assay mislead carbohydrase activity measurements. **Carbohydrate Research**, v. 363, p. 33-37, 2012.
- UNICA UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA DE AÇÚCAR. Disponível em http://www.unica.com.br/historico-de-consumo-de-combustiveis.php?idMn=11&tipoHistorico=10. Acesso em: 15/12/2016.

- VAN DYK J. S., PLETSCHKE B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergist cooperation between enzymes factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, 2012.
- WANG, Z.; XU, J. H.; FENG, H.; QI, HS. Fractal kinetic analysis of polymers/nonionic surfactants to eliminate lignin inhibition in enzymatic saccharification of cellulose. **Bioresource Technology**, v.102, p.2890–2896, 2011.
- WEBB, S.R., LEE, H. Regulation of xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeast. **Biotechnology Advances**, v.8, p.685-697, 1990.
- WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**, v.14, p.259-263, 2011.
- XIAO, Z.Z.; ZHANG, X.; GREGG, D.J.; SADDLER, J.N. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113, p.1115–1126, 2004.
- XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.48, p.54–60, 2011.
- YANG, B.; WYMAN, C.E. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.86, p.88–95, 2004.
- YOON, S.H.; ROBYT, J.F. Activation and stabilization of 10 starchdegrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. **Enzyme and Microbial Technology.** v.37, p.556–562, 2005.
- ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hidrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic Escherichia coli. **Biotechnology and Bioengineering,** v.68, n.5, p.524-530, 2000.
- ZENG, Y.; ZHAO, S.; YANG, S.; DING. S. Y. Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. **Current Opinion in Biotechnology,** v.27, p.38-45, 2014.
- ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D.; JENKINS, B. Non-ionic surfactants and non-catalytic protein. Treatment on enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.146, p.231–248, 2008.
- ZHU, S.; HUANG, W.; HUANG, W.; WANG, K.; CHEN, Q.; WU, Y. Pretreatment of rice straw for etanol production by a two step process using dilute sulfuric acid and sulfomethylation reagent. **Applied Energy**, v.154, p.190-196, 2015.
- ZIGLIO, B. R. B. Elaboração de pães com adição de farinha de sabugo de milho. **Revista de Ciências Naturais e exatas,** 2009.