



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR
PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO**

João Pessoa – PB

2017

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR
PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO**

Trabalho Final de Curso,
apresentado como exigência do
curso de Engenharia Química da
Universidade Federal da Paraíba
como requisito para obtenção do
título de **Bacharel em
Engenharia Química.**

Orientadora:
Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos

**João Pessoa – PB
2017**

FELIPE AUGUSTO SANTOS

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR
PRÉ-TRATADA COM HIDRÓXIDO DE SÓDIO**

Trabalho Final de Curso,
apresentado como exigência do
curso de Engenharia Química da
Universidade Federal da Paraíba
como requisito para obtenção do
título de **Bacharel em
Engenharia Química.**

Data de aprovação: 27 de novembro de 2017.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Sharline Florentino de Melo Santos – DEQ/CT/UFPB
(Orientadora)

Profa. Dra. Andrea Farias de Almeida – CBIOTEC/UFPB
(Avaliadora)

Prof. Dr. Carlos Alberto Bispo de Sousa – DEQ/CT/UFPB
(Avaliador)

Prof. Dra. Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves– CTDR/UFPB
(Avaliadora)

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Angela, pelo amor e incentivo incondicionais.

A minhas irmãs, Isabella e Raissa, que sempre me apoiaram desde o começo.

A todos os meus amigos da graduação, em especial Thiago, Jefferson, Amanda, João, Gessyca, Karina, Tatiana, Marcos, Jéssica e Juliane, que estiveram sempre comigo durante a graduação e irão sempre continuar presentes na minha vida.

A minha orientadora e professora Sharline Florentino e também a Lais Campos, pela paciência na orientação e pelos ensinamentos que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Aos estudantes e pesquisadores do Laboratório de Bioengenharia. Em particular a Débora, Lorena, Angela, Natane, Willyan e Luzidelson, que nunca mediram esforços para me ajudar quando precisei.

E, por fim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e fizeram parte da minha formação acadêmica.

RESUMO

Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para o reaproveitamento de resíduos gerados nos diversos processos industriais. Vários bioprocessos têm sido desenvolvidos utilizando estes materiais como substratos para a produção de diversas moléculas com alto valor agregado, tais como as enzimas. Entre as diversas enzimas, destacam-se as xilanases e também as celulases, que são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol celulósico. Diante disso, esse estudo teve por objetivo a caracterização da composição química da palha de cana-de-açúcar in natura e pré-tratada e a avaliação da hidrólise enzimática da palha pré-tratada, realizada utilizando enzimas celulases e xilanases produzidas a partir dos fungos filamentosos *Penicillium* sp. FSDE 15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16, por fermentação em estado sólido. As condições ótimas de pré-tratamento químico utilizadas (concentração NaOH de 3%, temperatura de 120 °C e tempo de 90 min) foram estabelecidas a partir de um planejamento fatorial experimental de 2³ com três repetições no ponto central. A hidrólise enzimática da palha de cana pré-tratada foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 3 gramas de palha, tampão citrato de sódio (50 mM; pH 4,8) e carga enzimática de 1,25 FPU/mL. Os resultados de caracterização lignocelulósica obtidos para a palha de cana in natura (29,52% celulose, 27,08% hemicelulose, 19,35% lignina, 3,57% extrativos e 6,09% cinzas) e para a palha de cana pré-tratada (60,19% celulose, 17,97% hemicelulose, 8,49% lignina, 2,87% extrativos e 5,45% cinzas) demonstram que a etapa de pré-tratamento com NaOH foi satisfatória, com uma remoção eficaz de lignina (solubilização de 56,12%). Através dos ensaios fermentativos (70% de umidade, temperatura de 38 °C e concentração de esporos de 10⁶ esporos/mL), foi possível obter uma máxima produção de CMCase, FPase e xilanase de 1,63 U/mL, 0,092 U/mL e 20,73 U/mL, respectivamente, para cultivos realizados com palha de cana e farelo de trigo. Analisando a hidrólise enzimática, a maior concentração de açúcares redutores totais para a carga enzimática de 10 FPU/g foi de 36,01 g/L de solução em 48 h de hidrólise e, para a carga de 5 FPU/g, esse valor foi de 16,35 g/L, em 24 h de hidrólise. Esses resultados evidenciam a utilização da palha de cana bem como do *Penicillium* sp. FSDE 15 na liberação de glicose.

Palavras-chave: palha de cana-de-açúcar, pré-tratamento, celulases e xilanases, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

In recent years, special attention has been given to the reuse of waste generated in the various industrial processes. Several bioprocesses have been developed using these materials as substrates for the production of several high value-added molecules, such enzymes. Among the various enzymes, the cellulases stand out for being highly specific biocatalysts that act in synergy for the release of sugars, of which glucose is the one that shows greater industrial interest due to the possibility of their conversion into cellulosic ethanol. Therefore, the aim of this study was to characterize the chemical composition of untreated and pre-treated sugarcane straw and to evaluate the enzymatic hydrolysis of pretreated straw, using cellulases and xylanases enzymes produced from *Penicillium* sp. FSDE 15 and *Aspergillus* sp. FSDE 16 filamentous fungi, by solid-state fermentation. The chemical pretreatment conditions (NaOH concentration of 3%, temperature of 120 °C and time of 90 min) were established from an experimental factorial design of 2³ with three central points. Enzymatic hydrolysis of pre-treated sugarcane straw was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 3 g of sugarcane straw, sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8) and enzyme loading of 1.25 FPU/mL. The results for the lignocellulosic characterization obtained for untreated cane straw (29.52% cellulose, 27.08% hemicellulose, 19.35% lignin, 3.57% extractives and 6.09% ashes) and for pre-treated cane straw (60.19% cellulose, 17.97% hemicellulose, 8.49% lignin, 2.87% extractives and 5.45% ash) demonstrated that the pre-treatment step with NaOH was satisfactory, with a good removal of lignin (solubilization of 56.12%). Through the fermentative tests (70% humidity, 38 °C and spore concentration of 10⁶), it was possible to reach a maximum production of CMCase, FPase and xylanase of 1.63 U/mL, 0.092 U/mL and 20.73 U/mL, respectively, for tests with cane straw and wheat bran. Analyzing the enzymatic hydrolysis, the highest concentration of A.R.T. for the enzymatic loading of 10 FPU/g was 36.01 g/L in 48 hours of hydrolysis and, for the loading of 5 FPU/g, that value was 16.35 g/L, in 24 hours of hydrolysis. These results show the good use of sugarcane straw as well as the *Penicillium* sp. FSDE 15 in the release of glucose.

Keywords: sugarcane straw, pretreatment, cellulases and xylanases, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes da cana-de-açúcar.....	16
Figura 2. Estrutura dos componentes da parede celular vegetal.....	17
Figura 3. Mecanismo de ação do complexo enzimático sobre a molécula de celulose.....	21
Figura 4. Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico.....	23
Figura 5. Resíduos de farelo de trigo (a) e palha de cana (b) in natura.....	26
Figura 6. Aparelhagem de extração por Soxhlet.....	29
Figura 7. <i>Penicillium</i> sp. FSDE15 (a) e <i>Aspergillus</i> sp. FSDE 16 (b).....	35
Figura 8. Análise de açúcares redutores para planejamento experimental realizado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH.....	43
Figura 9. Gráfico de Pareto dos efeitos principais e de interação das variáveis.....	45
Figura 10. Superfícies de resposta para a concentração de açúcares redutores em função do tempo e temperatura (a), da concentração de NaOH e da temperatura (b) e do tempo e da concentração de NaOH (c).....	46
Figura 11. Palha de cana in natura (a) e a palha de cana pré-tratada com NaOH 3% (b).....	48
Figura 12. Produção de CMCase (a), FPase (b) e xilanase (c), em 120 h de fermentação, pelos microrganismos <i>Penicillium</i> sp. FSDE 15 e <i>Aspergillus</i> sp. FSDE 16, para ensaios realizados com farelo de trigo e palha de como fontes de carbono.....	50
Figura 13. Processo de liofilização do extrato enzimático de FSDE 15 diluído, com obtenção de pó com altas concentrações de enzimas celulolíticas.....	53
Figura 14. Teores de açúcares redutores totais, g/L, liberados nas hidrólises enzimáticas realizadas com palha de cana pré-tratada e extrato enzimático de <i>Penicillium</i> sp. FSDE 15. Os dados estão representados pelas médias \pm desvio padrão.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toneladas de cana-de-açúcar processadas pelas usinas brasileiras.....	15
Tabela 2. Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.....	19
Tabela 3. Diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	24
Tabela 4. Fatores e seus níveis correspondentes para o planejamento experimental.....	32
Tabela 5. Planejamento fatorial experimental 2^3 com três repetições no ponto central.....	33
Tabela 6. Parâmetros da caracterização físico-química.....	41
Tabela 7. Composição química da palha de cana-de-açúcar in natura.....	42
Tabela 8. Parâmetros do modelo estatístico.....	44
Tabela 9. Composição química da palha de cana-de-açúcar in natura e pré-tratada com NaOH 3%.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. Geral.....	13
2.2. Específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1. Valorização dos resíduos agroindustriais.....	14
3.2. Cana-de-açúcar.....	15
3.3. Composição química dos materiais lignocelulósicos.....	16
3.4. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas.....	19
3.5. Cultivo semissólido.....	22
3.6. Hidrólise enzimática.....	22
4. METODOLOGIA	26
4.1. Preparo dos resíduos.....	26
4.2. Caracterização físico-química.....	27
4.2.1. pH.....	27
4.2.2. Teor de sólidos solúveis (°Brix).....	27
4.2.3. Umidade.....	27
4.2.4. Densidade aparente.....	27
4.3. Caracterização lignocelulósica da palha de cana-de-açúcar.....	28
4.3.1. Cinzas.....	28
4.3.2. Extrativos.....	28
4.3.3. Lignina insolúvel.....	29
4.3.4. Holocelulose.....	30
4.3.5. Alfacelulose.....	31
4.3.6. Lignina solúvel.....	31

4.4.	Pré-tratamento químico da palha de cana-de-açúcar.....	32
4.5.	Produção do extrato enzimático	34
4.5.1.	Microrganismos	34
4.5.2.	Preparo do inóculo.....	35
4.5.3.	Ensaio fermentativo.....	36
4.6.	Atividade enzimática.....	37
4.6.1.	CMCase	37
4.6.2.	FPase.....	38
4.6.3.	Xilanase	39
4.7.	Obtenção e concentração do extrato enzimático bruto.....	40
4.8.	Hidrólise enzimática.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1.	Caracterização físico-química	41
5.2.	Caracterização lignocelulósica da palha de cana in natura	42
5.3.	Pré-tratamento químico da palha de cana in natura	43
5.4.	Caracterização lignocelulósica da palha de cana pré-tratada	48
5.5.	Produção de celulases e xilanas	49
5.6.	Hidrólise enzimática.....	52
6.	CONCLUSÕES	56
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

A crescente industrialização e o aumento expressivo de meios de transporte a nível mundial têm proporcionado grande aumento na demanda de combustíveis derivados do petróleo. Os combustíveis fósseis ocupam 80% da energia primária consumida no mundo, dos quais aproximadamente 58% são consumidos somente pelo setor de transporte (NIGAM; SINGH, 2011).

A iminente escassez desses combustíveis fósseis derivados do petróleo juntamente com as preocupações da sociedade com a preservação ambiental são os principais motivos que levaram os governos a buscarem estratégias para uma maior produção e maior consumo de combustíveis que sejam renováveis e sustentáveis (SANTOS et al., 2012). Como resposta à preocupação pelo possível esgotamento do petróleo somado aos problemas causados pelas emissões dos gases de efeito estufa, há um crescente aumento no interesse pelo uso de fontes alternativas de energia (AYALA, 2012).

Dentre as diversas fontes de energia alternativas, pode-se citar o etanol celulósico. Este é um dos mais importantes combustíveis renováveis e seu uso em grande escala contribui diretamente para a redução do impacto ambiental do uso indiscriminado de combustíveis fósseis (PITARELO, 2013). Segundo a Conab (2016), a produção de etanol deve se manter acima de 27,9 bilhões de litros, redução de apenas 8,5% em razão da preferência pela produção de açúcar. Esse patamar de produção pode ser atingido com aumentos na área de plantio, aprimoramento do processo de produção já existente, melhoramento genético das fontes de carbono e dos microrganismos fermentadores e, por último, o desenvolvimento de tecnologias de conversão dos resíduos agroindustriais celulósicos em fontes de açúcares fermentescíveis (OLIVEIRA, 2010).

O etanol pode ser produzido através da fermentação dos açúcares (etanol de primeira geração) extraídos de diversas fontes de carbono, como cana-de-açúcar, milho e beterraba. Outra maneira de se produzir etanol é pela hidrólise de biomassa lignocelulósica, com a liberação de glicose, que pode ser fermentada, produzindo o etanol celulósico ou etanol de segunda geração (OGEDA & PETRI, 2010). O etanol celulósico pode ser obtido a partir de diferentes resíduos da agroindústria, com destaque, no Brasil, para o bagaço e a palha da cana-de-açúcar (FREITAS, 2011).

A palha de cana-de-açúcar apresenta grande potencial para geração de calor, eletricidade e produção de etanol celulósico. O aproveitamento da palha deverá ocupar um lugar de destaque

como matéria-prima para a produção de etanol combustível. Estima-se que uma tonelada de palha equivale a algo entre 1,2 a 2,8 EBP (equivalentes barris de petróleo). Consequentemente, a não utilização dessa biomassa representa um alto desperdício energético (SANTOS et al., 2012).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, tendo grande importância para o agronegócio brasileiro. A área plantada em 2012 foi em torno de 8,4 milhões de hectares. O aumento da demanda mundial por etanol oriundo de fontes renováveis, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições edafoclimáticas favoráveis à cana-de-açúcar, tornam o Brasil um país promissor para a exportação dessa *commodity* (CONAB, 2016).

Os materiais lignocelulósicos, como a palha de cana-de-açúcar, são constituídos majoritariamente por polímeros (celulose e hemicelulose) e são recobertos por uma macromolécula (lignina), além de outros componentes minoritários (PITARELO, 2013; SANTOS et al., 2012). No entanto, a estrutura da lignina forma uma verdadeira barreira física que dificulta o acesso à celulose. Portanto, a etapa de pré-tratamento é um passo crucial necessário a fim de tornar a celulose passível de ataque enzimático antes da hidrólise enzimática (ZHENG et al., 2009). O objetivo do pré-tratamento é remover ou modificar a estrutura da lignina para facilitar o ataque enzimático, evitando a degradação da celulose.

Diante disso, com o aumento da demanda por combustíveis, a transformação das diferentes biomassas lignocelulósicas em etanol de segunda geração torna-se uma alternativa economicamente viável e atraente e, além disso, é possível aumentar a produção de etanol com a mesma área agrícola atualmente utilizada para a cultura da cana-de-açúcar (SAAD, 2010).

Tornar os rendimentos mais favoráveis a partir de pré-tratamentos e hidrólise enzimática possibilitará o melhor aproveitamento da celulose presente na palha de cana-de-açúcar e em outros resíduos que atualmente são desperdiçados ou utilizados de forma menos nobre (CORTEZ, 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Promover o pré-tratamento químico da palha de cana-de-açúcar e realizar sua hidrólise enzimática utilizando enzimas produzidas pelos fungos *Penicillium* sp. FSDE 15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16.

2.2. Específicos

- Realizar a caracterização físico-química do farelo de trigo e da palha de cana in natura;
- Utilizar a ferramenta do planejamento fatorial para avaliar a melhor concentração de reagente (hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio), tempo de contato e temperatura no pré-tratamento químico da palha de cana in natura;
- Realizar a caracterização lignocelulósica da palha de cana in natura e da palha de cana pré-tratada;
- Produzir enzimas celulasas e xilanasas por meio de fermentação em estado semissólido utilizando os fungos FSDE 15 e FSDE 16;
- Com a palha de cana pré-tratada, avaliar a quantidade de açúcares liberados por meio de estudo de hidrólise enzimática.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Valorização dos resíduos agroindustriais

Nos últimos anos, houve um aumento do interesse por fontes alternativas de energia devido, principalmente, às constantes crises no fornecimento de petróleo. Além disso, existe a possibilidade de sua escassez, instabilidade nos preços e efeitos maléficos ao meio ambiente (SANTOS et al., 2014). Logo, a procura por fontes alternativas está mais direcionada ao estudo da energia proveniente da biomassa, recurso considerado praticamente ilimitado na natureza. Atualmente, esse tipo de energia vem sendo utilizada em diversos segmentos da indústria, notadamente na indústria dos combustíveis (SOUSA, 2014).

Diante do aumento da demanda por energia e da necessidade de geração de nova matriz energética sustentável no mundo atual, pesquisas por fontes renováveis de energia, principalmente etanol, têm sido de interesse global (ALMEIDA, 2012). No Brasil, o principal processo de produção do etanol ocorre através da fermentação alcoólica do caldo de cana-de-açúcar. Essa produção gera diversos resíduos, como vinhaça, bagaço e palha, que são parcialmente utilizados por meio da queima para a geração de energia nas caldeiras. Parte considerável destes subprodutos não é utilizada, causando transtornos e problemas no que se refere a sua destinação e processamento (SILVA, 2009).

Diante disso, faz-se necessária a reutilização do bagaço e da palha, ricos em biomassa lignocelulósica. De forma geral, os resíduos da agroindústria de processamento de produtos de origem vegetal (frutas, oleaginosas, fibrosas, madeiras, entre outros) apresentam em suas composições grandes quantidades de biomassa lignocelulósica, além de outros constituintes, que abrem muitas oportunidades de agregação de valor pela sua aplicação para a produção de etanol de segunda geração (ROSA et al., 2011).

A possibilidade de produzir combustíveis derivados da lignocelulose, maior fonte de carbono existente no planeta, incentivou grandes investimentos na indústria de biocombustíveis (BANSAL et al., 2009). A produção de etanol de segunda geração é realizada através da transformação dos materiais lignocelulósicos, que se destacam como fontes energéticas, como bagaço e palha de cana-de-açúcar, em etanol (ALMEIDA, 2012).

3.2. Cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido por Índia e Austrália. A produção de cana-de-açúcar no Brasil tem crescido nos últimos anos, atingido na safra de 2015/2016 um total de aproximadamente 667.000.000 toneladas (Tabela 1), sendo que cerca de 92% dessa produção se concentra na região Centro-Sul brasileira. No ano de 2015, a área total plantada no país foi de 10.870.647 hectares, com apenas 11,5% dessa área correspondendo à região Norte-Nordeste, enquanto a área colhida para este mesmo ano foi de 9.695.774 hectares. A moagem da safra 2016/2017 da região Centro-Sul do Brasil deve atingir entre 605 e 630 milhões de toneladas de cana (UNICA, 2017).

A liderança do Brasil na área de produção de cana-de-açúcar consolidou-se devido às significativas reduções de custos de produção (CORTEZ, 2010), principalmente após o Programa Nacional do Álcool - Proálcool, decorrentes de ganhos de produtividade e eficiências agrícolas e industriais. Isso tornou o país uma grande referência no panorama internacional como grande produtor de combustível de fonte renovável (SOUSA, 2014).

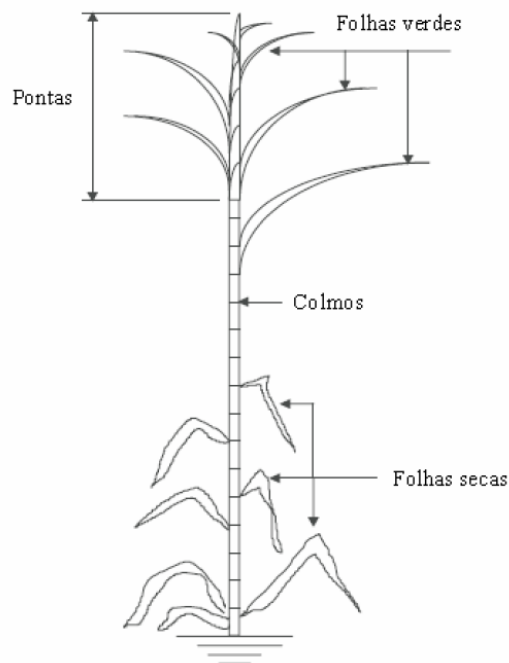
Tabela 1. Quantidade de cana-de-açúcar processada pelas usinas brasileiras, em mil toneladas.

Região/Safra	2007/2008	2009/2010	2010/2011	2013/2014	2015/2016
Norte-Nordeste	64.610	60.231	63.464	54.233	49.115
Centro-Sul	431.114	541.962	556.945	597.061	617.709
Brasil	495.723	602.193	620.409	651.294	666.824

Fonte: União da Indústria de Cana-de-Açúcar, UNICA, 2017.

A planta da cana-de-açúcar é composta essencialmente pelos colmos (nos quais a sacarose se concentra), pelas pontas e folhas (que constituem a palha) e também pelas raízes, no subsolo. Há também uma camada fina chamada epiderme, que recobre e protege os colmos, atuando como impermeabilizante. A casca, por sua vez, é composta de muitas fibras bastante lignificadas, protegendo a planta contra os efeitos mecânicos externos (MARABEZI, 2009; SEABRA, 2008). A Figura 1 ilustra as diferentes partes presentes na cana-de-açúcar.

Figura 1. Partes da cana-de-açúcar.



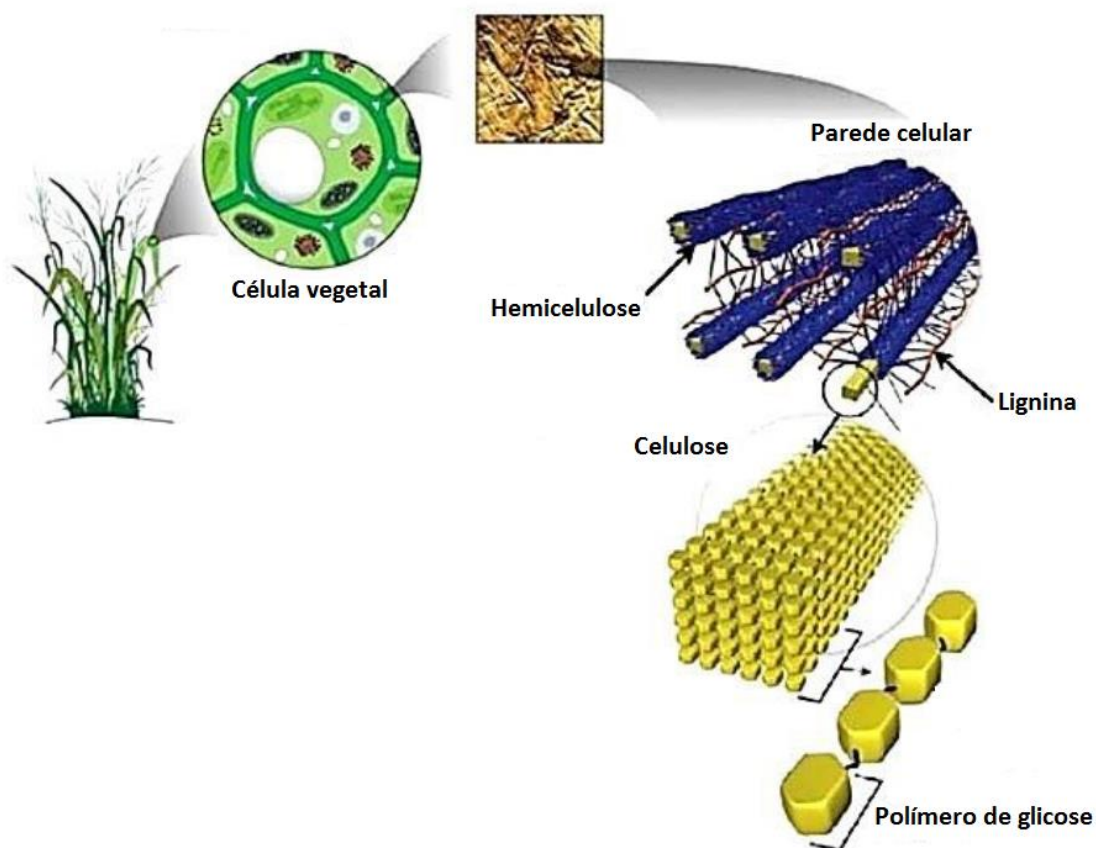
Fonte: SEABRA, 2008.

Para cada tonelada de cana-de-açúcar processada são gerados cerca de 140 kg de palha e 140 kg de bagaço em base seca, ou seja, 12 toneladas de palha e 12 toneladas de bagaço por hectare (SANTOS et al., 2014). O bagaço remanescente pode ser utilizado como matéria-prima industrial e alimentação animal, enquanto a palha pode ser utilizada para a geração de energia (MESCHEDÉ et al., 2012).

3.3. Composição química dos materiais lignocelulósicos

A fibra vegetal é composta por diversos constituintes. Em particular, é na parede celular das células das fibras que se encontram os compostos desejados: a celulose, a hemicelulose e a lignina. Os dois primeiros são, de fato, os compostos que, se tratados, são utilizados na obtenção dos carboidratos para a fermentação (SOUSA, 2014).

Figura 2. Estrutura dos componentes da parede celular vegetal.



Fonte: adaptado de ASSIS, 2015.

Percebe-se, pela Figura 2, que a ligação entre componentes da parede celular vegetal é muito forte e, por isso, há a necessidade de um pré-tratamento da biomassa para que o processo de obtenção dos açúcares a partir do material lignocelulósico seja mais eficiente. O principal revés ainda é o custo bastante elevado dos pré-tratamentos existentes (SOUSA, 2014).

A celulose é o polímero existente mais abundante na natureza e tem sido utilizada por muito tempo como fonte de alimento e de energia. Representa aproximadamente 40% de toda a reserva de carbono disponível na biosfera terrestre (CARVALHO, 2011). A celulose é constituída por moléculas de anidroglicose, unidas por meio de ligações β -1,4 glicosídicas. Duas moléculas adjacentes de glicose são unidas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxilas dos carbonos 1 e 4, formando a celobiose, que é a unidade básica de glicose. (AYALA, 2012; SOUSA, 2014). A característica de linearidade da celulose faz com que sua

estrutura seja cristalina e forte. Atualmente a celulose é muito utilizada como uma matéria-prima em várias aplicações industriais, por exemplo, em indústrias de papel, tintas, têxteis, alimentos e farmacêutica (SAAD, 2010).

As hemiceluloses, também chamadas de polioses, possuem peso molecular que varia entre 25.000 e 35.000, e se diferem da celulose por serem constituídas por cadeias amorfas, cadeias ramificadas e também compostas por diversos monômeros de açúcares e outros compostos (MILÉO, 2011; MARABEZI, 2009). As hemiceluloses podem ser classificadas de acordo com os carboidratos presentes em sua cadeia principal: xilanas, pectinas, galactanas, mananas e glucanas (SAAD, 2010). Logo, elas são uma classe de compostos poliméricos presentes em vegetais fibrosos, cada um possuindo características distintas entre si.

A lignina é a macromolécula mais abundante depois da celulose representa de 20 a 30% da massa total do material lignocelulósico. A estrutura da lignina apresenta forma tridimensional e é formada por unidades de p-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, unidas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si. Ela possui uma função estrutural na parede celular de plantas superiores, agindo como uma "cola" que confere coesão ao conjunto de células, além de possuir um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos por todo o vegetal (CARVALHO, 2011; SILVA, 2010; AYALA, 2012).

A dificuldade na remoção da lignina é o maior problema para a hidrólise do material lignocelulósico. Por isso, é necessário desenvolver um procedimento de pré-tratamento adequado para a remoção parcial ou total da lignina, com a preservação máxima da celulose e hemicelulose.

Outro fator que dificulta ainda mais o processo é que a lignina não possui uma estrutura definida para cada espécie vegetal, podendo variar muito a composição e o arranjo molecular (MARABEZI, 2009). Proporções de celulose, hemicelulose e lignina são mostradas na Tabela 2 para diferentes biomassas lignocelulósicas utilizadas na produção de glicose por hidrólise enzimática.

Tabela 2. Composição química de alguns materiais lignocelulósicos.

Material lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Sabugo de milho	31,7	34,7	20,3
Folhas de milho	37,6	34,5	12,6
Bagaço de cana	40,2	26,4	25,2
Palha de cana	44,4	30,7	19,8
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1
Casca de aveia	30,5	28,6	23,1
Farelo de cevada	23,0	32,7	24,4

Fonte: SILVA, 2010; SANTOS et al., 2014.

3.4. Enzimas celulolíticas e xilanolíticas

As enzimas são substâncias naturais envolvidas em todos os processos bioquímicos, que dentre outras funções, são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares (SOARES, 2010). Apesar de serem substâncias sólidas, são difíceis de serem cristalizadas pelo fato de possuírem estruturas químicas muito complexas. Com algumas exceções, são solúveis em água e álcool diluído, e são inativadas pelo calor.

A produção de enzimas através de microrganismos é considerada potencialmente ilimitada, desde que haja disponibilidade de substrato e que sejam conhecidos agente microbiano mais apropriado e o método e condição do cultivo (KIELING et al., 2002; CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Dentre as diversas enzimas que podem ser produzidas a partir de biomassa lignocelulósica, destacam-se as lignolíticas, como as xilanases e as celulases.

As xilanases são enzimas responsáveis pela degradação das ligações β -1,4 presentes na xilana, principal componente da hemicelulose. Sabe-se que as hemiceluloses são constituídas de vários polímeros, como xilanas, pectinas, galactanas, mananas e glucanas. Por este motivo, para uma completa degradação da hemicelulose é necessária a ação cooperativa de um conjunto de enzimas específicas (SAAD, 2010; MACIEL, 2006).

As celulases são enzimas que constituem um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise. Estas enzimas são biocatalisadores altamente específicos que atuam em sinergia para a liberação de açúcares, dos quais glicose é o que desperta maior interesse industrial, devido à possibilidade de sua conversão em etanol lignocelulósico.

As celulases podem chegar a representar cerca de 18% de todo o custo operacional de uma planta de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, logo, são insumos que impactam significativamente o processo (LYND et al., 2002; CASTRO; PEREIRA JR., 2010). Além disso, as celulases são amplamente utilizadas no descoramento e amaciamento de tecidos, formulações de detergentes domésticos e industriais, na produção de sucos, preparação de alimentos infantis, produtos dermatológicos e rações animais (SINGH, 2011; STROPARO, 2012).

A completa hidrólise da celulose (Figura 3) em glicose requer a ação combinada de múltiplas enzimas com diferentes especificidades ao substrato. As celulases secretadas por fungos filamentosos são formadas por três componentes principais que atuam na hidrólise completa da celulose: as endoglucanases (clivam as ligações internas da fibra celulósica), as exoglucanases (atuam na região externa da celulose) e as β -glicosidases, essas últimas não são consideradas como celulases legítimas, mas desempenham um importante papel na hidrólise da celulose (MARTINS et al., 2008; CASTRO; PEREIRA JR., 2010; MORETTI, 2013).

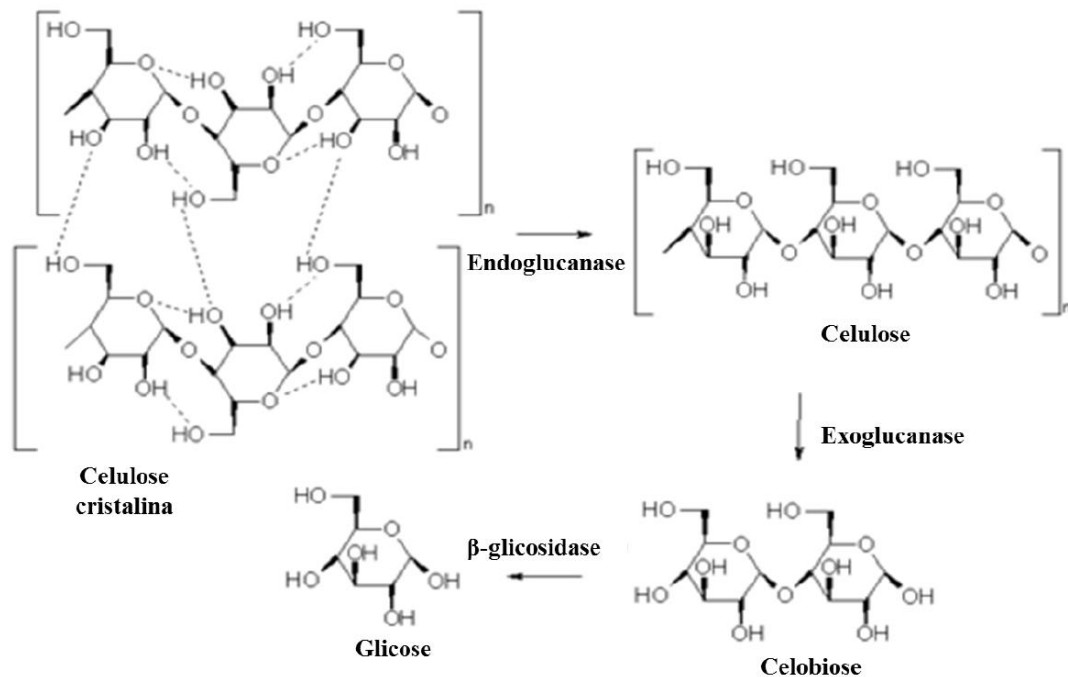
As endoglucanases são as enzimas do complexo celulolítico responsáveis por iniciar a hidrólise. Tais enzimas hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica de maneira aleatória, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. Sua atuação expõe as microfibras ao ataque subsequente de outras enzimas, além de aumentar o número de oligossacarídeos disponíveis ao ataque das exoglucanases (MORETTI, 2013).

Já exoglucanases são enzimas que se dividem em dois grupos: as celobiohidrolases que são capazes de liberar glicose diretamente do polímero, e as glucanohidrolases, funcionam como exoenzimas que agem no final das cadeias de celulose e liberam celbiose como principal produto (SALES et al., 2010; SANTOS, et al., 2011).

Por fim, as β -glicosidases hidrolisam celbiose liberadas pelas exoglucanases e, em alguns casos, outros oligossacarídeos curtos a glicose. As β -glicosidases tem como uma característica negativa a possibilidade de sofrerem inibição por seu produto de hidrólise. Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do

que quando atuam isoladamente umas das outras (CASTRO; PEREIRA JR., 2010; MORETTI, 2013).

Figura 3. Mecanismo de ação do complexo enzimático sobre a molécula de celulose.



Fonte: adaptado de MORETTI, 2013.

Na natureza, há uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases, porém apenas alguns são capazes de degradar a celulose natural. Dentre um grande número de microrganismos não patogênicos capazes de produzir enzimas úteis, os fungos filamentosos se destacam devido à sua facilidade de cultivo e também por liberarem suas enzimas diretamente no meio em que se encontram. Além disso, os fungos filamentosos apresentam elevados níveis de produção enzimática, com grande potencial para diversas aplicações industriais (GUIMARÃES et al., 2006).

As espécies de fungos mais estudadas que produzem celulases são o *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium solani*, *Myrothecium verrucaria*, *Sporotrichum pulverulentum* e *Aspergillus niger*. Tais fungos excretam uma celulase de alta atividade no meio de cultura. Entre as bactérias produtoras de celulase tem-se a *Cellulomonas fime* e a *Clostridium thermocellum* (RABELO, 2007).

A espécie *A. niger* está entre os organismos mais utilizados e estudados na produção industrial de enzimas. Contudo, seu potencial de produção de celulases não é elevado o suficiente para ser considerada uma alternativa à substituição de linhagens de *T. reesei* (VALADARES, 2013).

3.5. Cultivo semissólido

As duas principais maneiras de se produzir enzimas celulolíticas através de microrganismos são a fermentação semissólida (FES) e a fermentação submersa (FS). A diferença básica e crucial entre esses dois métodos é a quantidade de água livre presente no meio. A água, por sua vez, possui diversas funções em um bioprocessos, como difusão dos nutrientes no meio reacional e remoção de metabólitos indesejados (SCHEUFELE, 2012).

Segundo Castro e Pereira Jr. (2010) e Scheufele (2012), algumas características da fermentação semissólida são:

- Menor volume de resíduos líquidos gerado;
- O meio de cultivo é simples e simula o habitat natural do microrganismo;
- O extrato bruto obtido é mais concentrado quando comparado à fermentação submersa, de forma que a produtividade e a concentração final de produtos são maiores;
- Menor possibilidade de contaminação, devido a baixa umidade e atividade de água;
- Fácil aeração e devido à porosidade do meio, resultando numa baixa demanda de energia;
- Custo de produção mais baixo e atrativo.

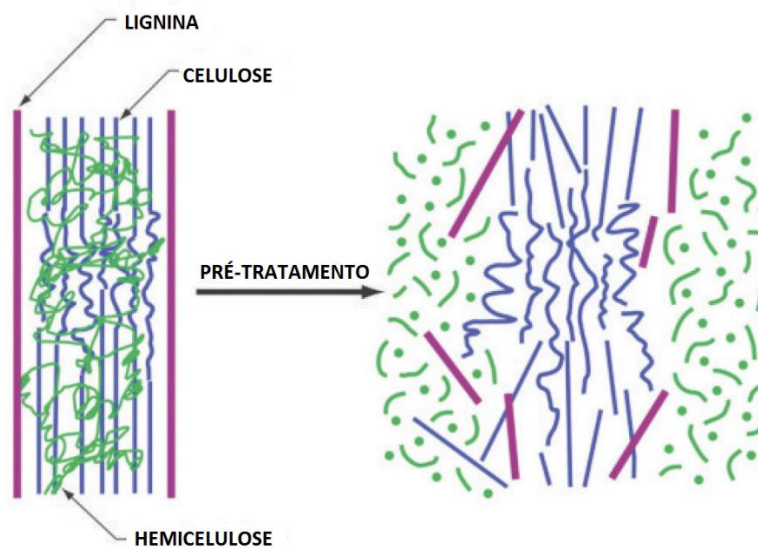
3.6. Hidrólise enzimática

As celulases são as enzimas responsáveis pela hidrólise enzimática da celulose, e são consideradas muito específicas em relação ao substrato utilizado. Isso reduz o possível aparecimento de subprodutos indesejáveis na reação, conseqüentemente levando a uma diminuição dos custos finais de separação dos produtos, além de evitar a degradação da glicose produzida, fato que pode acontecer na hidrólise ácida (CARVALHO, 2011).

Muitos fatores podem influenciar a hidrólise enzimática da celulose, afetando seu rendimento, tais como: pH, temperatura, teor de sólido, concentração de substrato, bem como outros parâmetros. A hidrólise enzimática é geralmente conduzida em temperaturas entre 45 e 50 °C e pH de 4,8. Entretanto, além de condições amenas de temperatura e pH, é necessário submeter a biomassa lignocelulósica a um determinado tipo de pré-tratamento, a fim de facilitar o ataque enzimático à celulose (ALMEIDA, 2012; ASSIS, 2015).

Uma das mais importantes prioridades nas áreas de pesquisa e desenvolvimento para a indústria do etanol celulósico é o desenvolvimento de um pré-tratamento eficiente na redução da estrutura rígida e liberação dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos. O objetivo geral da etapa de pré-tratamento é de quebrar o escudo formado pela lignina e hemicelulose, como pode ser visualizado na Figura 4, além de reduzir a estrutura cristalina e o grau de polimerização de celulose. Hoje, o pré-tratamento é visto como uma das etapas de processamento mais caras no âmbito da conversão da biomassa em açúcar fermentável (ZHENG et al., 2009; SOUSA, 2014).

Figura 4. Efeito do pré-tratamento no material lignocelulósico.



Fonte: adaptado de SANTOS et al., 2012.

Normalmente, as hidrólises enzimáticas possuem um rendimento de açúcar menor que 20%, enquanto que, se uma etapa de pré-tratamento for utilizada, o rendimento alcançado pode

ultrapassar 90% (OGEDA & PETRI, 2010). Os tipos de pré-tratamento dependem do material utilizado, bem como da finalidade de utilização dos materiais lignocelulósicos. Alguns deles estão exemplificados na Tabela 3. Eles podem ser classificados de diferentes formas, como: pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes, no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (SAAD, 2010; SANTOS et al., 2012).

Tabela 3. Diferentes métodos de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Métodos físicos	Métodos químicos	Métodos biológicos	Métodos combinados
Vapor	Ozonólise		Explosão à vapor
Moinho de bola	Hidrólise com ácidos diluídos (H ₂ SO ₄ , HCl, H ₃ PO ₄ , HNO ₃)		Hidrotérmico
Água quente	Hidrólise alcalina (NaOH, Ca(OH) ₂)	Fungos	SO ₂ e vapor
Pirólise	Deslignificação oxidativa		Alcalino e moinho de bolas
Radiação	SO ₂		NO ₂ e irradiação

Fonte: adaptado de SAAD, 2010 e SILVA, 2009.

Os pré-tratamentos físicos são aqueles caracterizados pela fragmentação do material através de uma ação mecânica, sendo que essa fragmentação não altera sua composição química. Já o pré-tratamento biológico é aquele no qual o material lignocelulósico é submetido à ação de determinadas enzimas ou microrganismos. Os pré-tratamentos químicos, por sua vez, podem ser definidos como técnicas que envolvem agentes químicos tais como ácidos, bases e solventes orgânicos (AYALA, 2012; NASCIMENTO, 2011). Dentre os pré-tratamentos químicos, destacam-se os ácidos (diluídos ou concentrados) e os alcalinos.

O pré-tratamento realizado com ácido diluído tem o intuito de hidrolisar as hemiceluloses, obtendo-se um hidrolisado contendo açúcares fermentáveis, principalmente

pentoses. Este tipo de pré-tratamento utiliza diferentes classes de ácidos, como: sulfúrico, fórmico, nítrico, clorídrico e fosfórico (OLIVEIRA, 2010; AYALA, 2012).

O pré-tratamento também pode ser conduzido com ácidos concentrados a fim de aumentar a solubilização da fração hemicelulósica. Porém, é necessário ter um cuidado intenso, pois esses reagentes são tóxicos, além de poderem provocar a corrosão dos equipamentos. O uso de ácidos concentrados também favorece uma maior formação de furfural, hidroximetil furfural e ácido acético, compostos estes que atuam como inibidores do processo fermentativo para a produção de etanol celulósico (SILVA, 2009; RABELO, 2007; SOUSA, 2014).

Processos alcalinos também podem ser utilizados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos e seu principal efeito consiste na remoção da lignina da biomassa, promovendo maior conversão das fibras de celulose durante a etapa de hidrólise enzimática (PITARELO, 2012). Esse tipo de pré-tratamento promove uma intensa deslignificação da biomassa, aumentando a reatividade da fibra. Quando comparado com o pré-tratamento ácido, este utiliza temperaturas e pressões mais moderadas e apresenta baixo custo dos reagentes utilizados, que geralmente são a soda e cal (PITARELO, 2012; NASCIMENTO, 2011).

O tratamento alcalino também pode ser realizado por agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que geralmente aumenta o rendimento de remoção da lignina (CARVALHEIRO et al., 2008). Porém, um dos problemas associados a esse processo é que, na maioria das vezes, o agente oxidante utilizado não é seletivo e, portanto, podem ocorrer perdas de hemicelulose e celulose como também a geração de inibidores de fermentação nos hidrolisados (PITARELO, 2012).

A etapa de pré-tratamento deve ser eficiente do ponto de vista químico e energético e, por isso, apresenta um grande potencial para melhorar a eficiência e baixar o custo no processo de pesquisa e desenvolvimento. Necessita-se, ao máximo, preservar a fração de hemiceluloses, evitar a degradação ou perda da celulose e também impedir a formação de compostos secundários inibidores do crescimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação (SAAD, 2010; RABELO, 2007).

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo dos resíduos

Para os diferentes tipos de cultivos realizados a fim de se produzir as enzimas de interesse, foram utilizados dois resíduos provenientes da agroindústria: farelo de trigo e palha de cana-de-açúcar. O farelo de trigo foi obtido no comércio local da cidade de João Pessoa-PB, seco e na forma de pó, pronto para ser utilizado. Já a palha de cana-de-açúcar foi adquirida na Usina Japungú, localizada no município de Santa Rita-PB, e também não necessitou do processo de secagem, apenas de trituração. A mesma foi realizada em liquidificador doméstico, com o intuito de diminuir o tamanho dos resíduos para a realização dos ensaios fermentativos. Ambos os resíduos foram armazenados em recipientes fechados e em temperatura ambiente. A Figura 5 mostra o aspecto dos resíduos de farelo de trigo e palha de cana-de-açúcar, respectivamente, prontos para utilização.

Figura 5. Resíduos de farelo de trigo (a) e palha de cana in natura (b).



Fonte: Autor, 2017.

4.2. Caracterização físico-química

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao pH, teor de sólidos solúveis (°Brix), umidade e densidade aparente foi realizada conforme procedimentos descritos a seguir. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.1. pH

Para a leitura do pH, preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 1 grama de resíduo. Após homogeneização a suspensão foi deixada em repouso por um período de aproximadamente 20 minutos. Após isso, o pH foi mensurado em pHmetro digital, que foi previamente calibrado com as soluções padrões (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.2.2. Teor de sólidos solúveis (°Brix)

Para a análise do teor de sólidos solúveis, foram utilizadas as mesmas amostras descritas no item 4.3.1. A mistura foi filtrada em papel de filtro simples e a análise foi feita em refratômetro digital (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.2.3. Umidade

Para a análise da umidade, foi determinado o peso seco de cápsulas de alumínio e nelas foram pesadas cerca de 2 gramas de cada resíduo. Após 24 horas, em estufa a 105 °C, foi determinada a umidade dos resíduos, através da equação a seguir (CORREIA, 2004).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final da amostra})}{\text{peso inicial da amostra}} * 100 \quad (1)$$

4.2.4. Densidade aparente

Para a determinação da densidade aparente, pesou-se 100 gramas dos resíduos, que foram colocados em proveta de 250 mL para determinar o volume ocupado, sem que houvesse

compactação dos mesmos. A densidade aparente foi expressa conforme a Equação 2 (CORREIA, 2004).

$$\text{Densidade aparente} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{volume ocupado (mL)}} \quad (2)$$

4.3. Caracterização lignocelulósica da palha de cana-de-açúcar

A caracterização lignocelulósica da palha de cana-de-açúcar foi realizada através da metodologia descrita por Morais et al., (2010). Essa caracterização visa determinar o percentual em massa das frações lignocelulósicas como cinzas, extrativos, hemicelulose, celulose e lignina de qualquer material vegetal. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.3.1. Cinzas

Primeiramente, cadinhos de porcelana foram levados para a mufla a 600 °C por 30 minutos e, posteriormente, resfriados em dessecador e pesados. Cerca de 2 g de palha de cana foram pesados em cada cadinho, e os mesmos foram calcinados a 600 °C por 3 horas, até obter cinzas claras. Os cadinhos foram, então, resfriados até a temperatura ambiente, em dessecador, e novamente pesados. A Equação 3 foi utilizada para o cálculo da porcentagem de cinzas em cada amostra:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{peso final da amostra}}{\text{peso inicial da amostra}} * 100 \quad (3)$$

4.3.2. Extrativos

Em uma aparelhagem limpa para a extração por Soxhlet (Figura 6), foi colocado um papel de filtro (seco e de massa conhecida) moldado em forma de cartucho contendo cerca de 5 gramas de resíduo de palha de cana previamente seco. Ao balão de vidro, adicionou-se 300 mL do solvente cicloexano/etanol na proporção 1:1. Toda a aparelhagem, composta por balão, extrator Soxhlet, condensador e manta aquecedora, foi conectada entre si.

O número de refluxos foi ajustado para um total de 20, em cerca de 5 horas de extração. Após esse tempo, o cartucho necessitou ser transferido para uma placa de Petri e levado à estufa por 105 °C por meia hora. A massa que corresponde ao cartucho e a placa foi pesada, a fim de se determinar o quanto de extrativos foi liberado. É importante manter o cartucho no dessecador, pois o conteúdo do mesmo foi utilizado nas próximas etapas.

Figura 6. Aparelhagem de extração por Soxhlet.



Fonte: Autor, 2017.

O teor em massa de extrativos foi calculado através da Equação 4 a seguir:

$$TE(\%) = \frac{(\text{massa amostra} - \text{massa livre de extrativos})}{\text{massa amostra}} * 100 \quad (4)$$

4.3.3. Lignina insolúvel

Cerca de 1 g de resíduo seco e sem extrativos foi pesado e transferido para um almofariz. Ao mesmo, foram adicionados 17 mL de H₂SO₄ 72% e uma agitação vigorosa foi obtida com o auxílio de um pistilo. O material ficou em repouso por 24 h. Após o tempo de digestão, 306 mL

de água destilada foram adicionadas ao almofariz a fim de diluir o ácido sulfúrico a 4% e o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico, acoplado a um sistema de extração com Soxhlet. O refluxo foi mantido por 4 horas contadas a partir do ponto de fervura. Após esse tempo, preparou-se a aparelhagem necessária para proceder uma filtração, composta por kitassato, funil de porcelana e papel de filtro, de massa conhecida. O conteúdo do balão foi transferido para o funil. O filtrado foi constantemente lavado com água destilada até que o pH do mesmo ficasse próximo ao da água que estava sendo utilizada. Na metade da operação, recolheu-se uma amostra do filtrado. Com essa porção, foi realizada a determinação de lignina solúvel. O papel de filtro contendo a amostra lavada foi apoiado em uma placa de Petri e levado à estufa a 105 °C por, pelo menos, meia hora. A massa que corresponde ao papel de filtro contendo a amostra foi pesada, a fim de se determinar o quanto de lignina insolúvel foi liberado.

O teor em massa de lignina insolúvel foi calculado por meio da Equação 5 a seguir:

$$\text{TLI}(\%) = \frac{(\text{massa papel de filtro e lignina insolúvel} - \text{massa papel de filtro})}{\text{massa amostra inicial}} * 100 \quad (5)$$

4.3.4. Holocelulose

Cerca de 3 g de resíduo seco e sem extrativos foram pesados e transferidos para um erlenmeyer de 500 mL e 120 mL de água destilada foram adicionados ao mesmo. Em uma capela de exaustão, preparou-se um banho-maria, com uma chapa aquecedora, que mantivesse a temperatura constante a 70 °C. Foram adicionados 2,5 g de clorito de sódio (NaClO_2), 1 mL de ácido acético glacial e uma barra magnética, a fim de garantir uma agitação constante durante a reação. O erlenmeyer foi tampado com outro erlenmeyer de 25 mL e o conjunto foi aquecido por 1 h. Após esse tempo, foi realizada uma nova adição de 2,5 g de clorito de sódio (NaClO_2) e 1 mL de ácido acético glacial, continuando a reação por mais 1 hora. Após esse tempo, adicionou-se novamente 2,5 g de clorito de sódio (NaClO_2) e 1 mL de ácido acético glacial e, dessa vez, a reação foi continuada por 3 horas. Após as 5 horas de aquecimento e agitação, o erlenmeyer foi levado a um banho de gelo por 30 minutos.

Enquanto isso, preparou-se a aparelhagem necessária para proceder uma filtração, composta por kitassato, funil de porcelana e papel de filtro, de massa conhecida. O conteúdo do erlenmeyer foi transferido para o funil. Com água destilada, lavou-se o erlenmeyer para que não houvesse perda de conteúdo. O filtrado foi constantemente lavado com água destilada até que o

pH do mesmo ficasse próximo ao da água que estava sendo utilizada. O papel de filtro contendo a amostra lavada foi apoiado em uma placa de Petri e levado à estufa a 105 °C por, pelo menos, 18 horas. A massa que corresponde ao papel de filtro contendo a amostra foi pesada, a fim de se determinar o quanto de holocelulose foi liberado. O papel de filtro foi mantido no dessecador, pois o conteúdo do mesmo foi utilizado nas próximas etapas.

O teor em massa de holocelulose foi calculado por meio da Equação 6 a seguir:

$$TH(\%) = \frac{(\text{massa papel de filtro e holocelulose} - \text{massa papel de filtro})}{\text{massa amostra inicial}} * 100 \quad (6)$$

4.3.5. Alfacelulose

Cerca de 1 grama da holocelulose obtida na etapa anterior foi pesada e transferida para um almofariz. Adicionou-se 15mL de solução de NaOH 17,5% e, após 2 minutos de contato entre a solução e a celulose, começou-se a misturar e triturar o conteúdo por 8 minutos. Terminado esse tempo, 40 mL de água destilada foram adicionados ao almofariz. Enquanto isso, foi preparada a aparelhagem necessária para proceder uma filtração, composta por kitassato, funil de porcelana e papel de filtro, de massa conhecida. O conteúdo do almofariz foi transferido para o funil e o mesmo foi lavado para que não houvesse perda de material lignocelulósico. O filtrado foi constantemente lavado com água destilada até que o pH do mesmo ficasse próximo ao da água que estava sendo utilizada. O papel de filtro contendo a amostra lavada foi apoiado em uma placa de Petri e levado à estufa a 105 °C por, pelo menos, 18 horas. A massa que corresponde ao papel de filtro contendo a amostra foi pesada, a fim de se determinar o quanto de alfacelulose foi liberado.

O teor em massa de alfacelulose foi calculado por meio da Equação 7 a seguir:

$$TA(\%) = \frac{(\text{massa papel de filtro e alfacelulose} - \text{massa papel de filtro})}{\text{massa amostra inicial}} * 100 \quad (7)$$

4.3.6. Lignina solúvel

Para a determinação da lignina solúvel, utilizou-se o método proposto por Goldschimid (1971), no qual se realiza uma varredura da absorbância de 280 nm a 215 nm. A amostra deve ser diluída, se necessário, com ácido sulfúrico 4% até que a absorbância fique menor do que 1,0.

Com base nos valores obtidos, foi empregada a Equação 8, na qual CLS representa a concentração de lignina solúvel, em g/L, A215 representa a absorvância a 215 nm e A280 representa a absorvância a 280 nm.

$$\text{CLS(g/L)} = \frac{4,53 \cdot A_{215} \cdot A_{280}}{300} \quad (8)$$

4.4. Pré-tratamento químico da palha de cana-de-açúcar

Para a etapa de pré-tratamento químico da palha de cana, hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) foram testados, seguindo um planejamento fatorial experimental tendo como fatores a temperatura (°C), o tempo (min) e a concentração da solução básica (% m/v). A resposta avaliada foi o teor de açúcares redutores liberados ao fim de cada reação. A Tabela 4 apresenta os níveis de cada fator.

Tabela 4. Fatores e seus níveis correspondentes para o planejamento experimental.

Fatores	Níveis		
	-1	0	1
Tempo (min)	30	60	90
Temperatura (°c)	30	75	120
Concentração (% m/v)	3	4	5

Fonte: Autor, 2017.

Foram realizados um total de 11 experimentos (Tabela 5) para cada reagente básico (NaOH e Ca(OH)₂), pois tem-se k = 3 fatores, 2^k = 8 pontos fatoriais + n = 3 repetições no ponto central.

Tabela 5. Planejamento fatorial experimental 2^3 com três repetições no ponto central.

Experimento	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Concentração reagente (%)
1	-1 (30)	-1 (30)	-1 (3)
2	-1 (30)	-1 (30)	+1 (5)
3	-1 (30)	+1 (120)	-1 (3)
4	-1 (30)	+1 (120)	+1 (5)
5	+1 (90)	-1 (30)	-1 (3)
6	+1 (90)	-1 (30)	+1 (5)
7	+1 (90)	+1 (120)	-1 (3)
8	+1 (90)	+1 (120)	+1 (5)
9	0 (60)	0 (75)	0 (4)
10	0 (60)	0 (75)	0 (4)
11	0 (60)	0 (75)	0 (4)

Fonte: Autor, 2017.

Para cada experimento, a proporção de palha de cana/solução básica utilizada foi a mesma, sendo 1g/20mL. Utilizou-se banho térmico e autoclave para atingir as temperaturas desejadas. Os experimentos foram realizados em béqueres de 125 mL e a mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo para a análise do extrato. Com o extrato obtido, procedeu-se com a análise da variável de resposta.

Como variável de resposta, foi analisado o teor de açúcares redutores liberados em cada extrato. Para a análise de açúcares redutores, em gramas de açúcares redutores por litro de solução, seguiu-se o procedimento adaptado de Miller (1959). O meio reacional foi formado por 0,5 mL do extrato previamente obtido e 0,5 mL de solução de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS), e o mesmo foi incubado por 5 minutos a 100 °C. A reação enzimática foi interrompida com um banho de gelo e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 4,0 mL de água destilada.

O valor da concentração de açúcares redutores foi calculado por meio da Equação 9 a seguir:

$$A.R. \text{ (g/L)} = \text{abs} * f * d \quad (9)$$

Onde:

f = Fator de conversão da curva de calibração;

d = Diluição da amostra (mL/g), se houver.

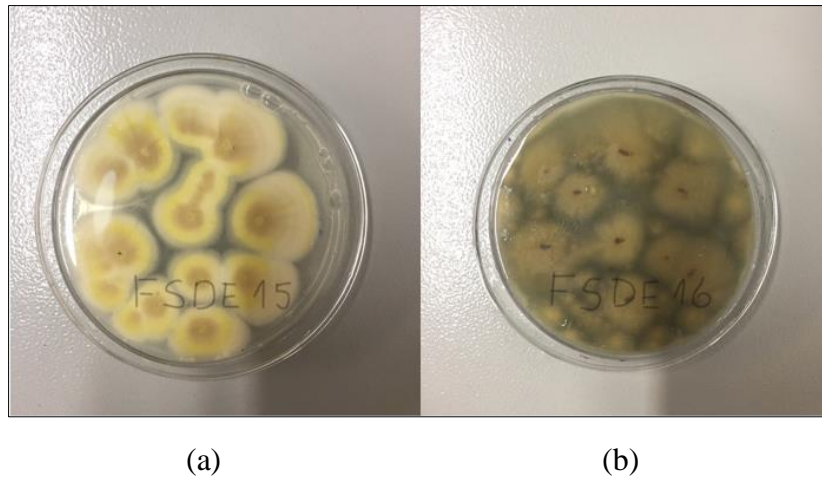
A partir da comparação dos resultados obtidos das variáveis de resposta para o hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio, escolheu-se a solução que promoveu uma maior liberação de açúcares redutores. Utilizou-se a melhor temperatura, tempo e concentração para tratar 200 gramas de palha de cana-de-açúcar, que foram utilizados na etapa de hidrólise. A palha, depois de ser devidamente pré-tratada, foi filtrada utilizando uma aparelhagem composta por kitassato, funil de porcelana e papel de filtro. O filtrado foi constantemente lavado com água destilada até que o pH do mesmo fique próximo ao da água que está sendo utilizada. Após isso, a palha pré-tratada foi seca em estufa a 60 °C por cerca de 48 horas e armazenada em recipiente fechado e em temperatura ambiente.

4.5. Produção do extrato enzimático

4.5.1. Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram os fungos *Penicillium* sp. FSDE 15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16, cedidos pelo Prof. Dr. Demetrius Antônio Machado de Araújo do Centro de Biotecnologia-UFPB, isolados do solo de descanso do cultivo de cana-de-açúcar da Usina Japungú Agroindustrial S.A, localizada no município de Santa Rita, no estado da Paraíba, pela Doutora em Biotecnologia pela UFPB, Laís Campos Teixeira de Carvalho Gonçalves. Os microrganismos foram conservados sob refrigeração, em meio ágar-batata-dextrose (BDA) e podem ser visualizados na Figura 7.

Figura 7. *Penicillium* sp. FSDE15 (a) e *Aspergillus* sp. FSDE 16 (b).



Fonte: Autor, 2017.

4.5.2. Preparo do inóculo

Foi feito o repique do fungo do estoque para placas de Petri contendo meio BDA em condições estéreis. As placas contendo o meio BDA foram inoculadas com os fungos *Penicillium* sp. FSDE15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16 e incubadas em temperatura ambiente por sete dias, para o crescimento dos mesmos. Após o crescimento, foi feita a suspensão dos esporos, usando água destilada esterilizada, o suficiente para cobrir a placa. Os esporos foram suspensos com auxílio de alça de platina. A suspensão de esporos foi acondicionada em tubo estéril.

A quantificação da suspensão assim obtida foi feita por meio da contagem dos esporos em câmara de Neubauer espelhada, com auxílio do microscópio. Todo o processo foi feito próximo ao bico de Bunsen, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação.

O volume de suspensão de esporos adicionado ao meio de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. As Equações 10 e 11 utilizadas para o cálculo do volume de inóculo foram as seguintes:

$$\text{Concentração (esporo/mL)} = \Sigma * 5.10^4 * \text{fator de diluição} \quad (10)$$

Onde:

Σ : número de esporos na câmara de Neubauer (quatro extremidades e o centro)

$$\text{Volume (inóculo)} = \frac{\text{concentração (esporo/grama)} * \text{massa do meio (g)}}{\text{concentração (esporo/mL)}} \quad (11)$$

4.5.3. Ensaios fermentativos

Todos os cultivos foram realizados em duplicata e para um total de 100 gramas de massa, com umidade de 70%, concentração de esporos de 10^6 esporos por grama de substrato e temperatura de 38 °C.

- Cultivo 1 – *Penicillium* sp. FSDE15: farelo de trigo puro
farelo de trigo (60%) e palha de cana (40%)
- Cultivo 2 – *Aspergillus* sp. FSDE16: farelo de trigo puro
farelo de trigo (60%) e palha de cana (40%)

Na etapa de pré-inóculo, preparou-se uma solução de sulfato de amônia 1% (m/v), responsável pelo umedecimento dos resíduos e para atuar como indutor da atividade enzimática. Para o preparo dessa solução, foi necessário calcular a quantidade de água para umedecer os resíduos. Esse cálculo foi feito de acordo com a umidade apresentada por cada resíduo, obtida anteriormente no item 4.2.3. A Equação 12 foi utilizada para o cálculo da quantidade de água.

$$m_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{\text{massa do resíduo} * (\text{umidade ideal} - \text{umidade do resíduo})}{1 - \text{umidade ideal}} \quad (12)$$

Após o preparo da solução de sulfato de amônia 1% (m/v), os resíduos foram umedecidos e dispostos em Erlenmeyer de 1000 mL para esterilização em autoclave por 15 minutos e temperatura de 121 °C. Após o processo de esterilização, os Erlenmeyer com os meios de cultivo foram deixados em temperatura ambiente para resfriar.

Em seguida, foi feita a inoculação com os esporos previamente suspensos. O volume de suspensão de esporos adicionado aos meios de fermentação foi ajustado de modo a ter-se uma concentração de 10^6 esporos por grama de substrato sólido. Foi necessário homogeneizá-los bem para um crescimento uniforme do fungo.

Os cultivos foram monitorados por cinco dias. No último dia, 120 horas, uma amostra de aproximadamente 3 g foi retirada de cada cultivo, para análise do pH e atividade enzimática. O pH foi analisado da mesma maneira mencionada no item 4.2.1. O extrato enzimático foi obtido adicionando-se 15 mL de água destilada para cada 1 g de substrato (amostra). Após homogeneização e repouso de 30 min em temperatura ambiente, as amostras foram filtradas, usando papel de filtro qualitativo. O extrato enzimático foi estocado em microtubos e congelado para posterior análise de atividade de CMCase, FPase e xilanase.

4.6. Atividade enzimática

Para a análise da atividade enzimática, o extrato obtido a partir do quinto dia do ensaio fermentativo necessitou ser descongelado e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.6.1. CMCase

Para a análise da atividade enzimática CMCase, que representa a dosagem de endoglucanases, seguiu-se o protocolo da reação enzimática utilizando carboximetilcelulose (CMC) como substrato. Foi preciso, primeiramente preparar solução de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) e da sua curva padrão de glicose.

Para elaboração da curva padrão de glicose, o seguinte procedimento foi utilizado: pesou-se 0,36 g de glicose e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água destilada, homogeneizando vigorosamente. Em seguida, transferiu-se 0,5; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5 e 9,0 mL da solução-mãe para tubos de ensaio e completou-se o volume de cada tubo para 10mL, com água destilada. Após isso, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos de ensaio, que já continham 0,5 mL de solução DNS (em duplicata). Esses novos tubos foram aquecidos em banho-maria a 100 °C por 5 minutos e depois esfriados em banho de gelo até a temperatura ambiente. Finalmente, 6,5 mL de água destilada foram adicionados a cada tubo de ensaio e eles foram homogeneizados. A leitura foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro. O branco foi feito com 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de solução DNS.

A atividade CMCase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). O método se baseia na dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato CMC.

O meio reacional foi formado por 0,25 mL de uma solução de CMC 4% (g/mL) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,25 mL do sobrenadante das culturas (extrato enzimático). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata de 0,5 mL de DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática, obtida após fervura por 5 minutos a 100 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada.

O valor da atividade enzimática CMCase pode então, ser calculado através da Equação 13:

$$\text{CMCase (U/mL)} = \frac{(A-B)*f*0,5}{0,18*10*0,25} \quad (13)$$

Onde: A = Absorbância da amostra; B = Absorbância do controle da amostra; f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL); 0,5 = Volume total do meio de reação (mL); 0,18 = Fator de conversão de mg para μmol de glicose; 10 = Tempo de reação (min); 0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

4.6.2. FPase

A quantificação da atividade enzimática FPase (celulase total) foi realizada utilizando papel de filtro como substrato de acordo com metodologia adaptada de Ghose (1987). Foram adicionadas em tubos de ensaio das amostras tiras de papel de filtro (1cm x 6cm) em forma espiral e 1 mL de solução tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 50 mM) juntamente com 0,5 mL de extrato enzimático. Nos tubos de ensaio correspondentes aos brancos das amostras apenas o papel de filtro não foi adicionado. Todos os tubos foram agitados e levados ao aquecimento em banho-maria por 60 minutos a 50 °C. Terminado esse tempo, 0,5 mL de cada tubo foram transferidos para novos tubos contendo 0,5 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Todos os tubos foram novamente agitados e levados ao aquecimento em banho-maria por 5 minutos a 100 °C. As

amostras foram, então, resfriadas em banho de gelo e a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada.

O valor da atividade enzimática FPase foi calculado por meio da Equação 14:

$$\text{FPase (U/mL)} = \frac{(A-B)*f*1,5}{0,18*60*0,5} \quad (14)$$

Onde: A = Absorvância da amostra; B = Absorvância do controle da amostra; f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL); 1,5 = Volume total do meio de reação (mL); 0,18 = Fator de conversão de mg para μmol de glicose; 60 = Tempo de reação (min); 0,55 = Volume da enzima no meio de reação (mL).

4.6.3. Xilanase

A xilanase foi determinada de acordo com a metodologia padrão descrita pela IUPAC (GHOSE, 1987). Para elaboração da curva padrão, utilizou-se a xilose como substrato e seguiu-se o mesmo procedimento empregado na elaboração da curva padrão de glicose descrita no item 4.6.1.

O meio reacional foi formado por 0,25 mL de uma solução de xilano 4% (g/mL) em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4,8 e 0,25 mL do sobrenadante das culturas. Nos tubos de ensaio correspondentes aos brancos das amostra, foi adicionado 0,25 mL de tampão citrato em vez de solução xilano 4%. A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNS. Todos os tubos foram novamente agitados e levados ao aquecimento em banho-maria por 5 minutos a 100 °C, com posterior resfriamento dos mesmos em banho de gelo. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, após diluição com 6,5 mL de água destilada.

O valor da atividade enzimática xilanase foi calculado por meio da Equação 15:

$$\text{Xilanase (U/mL)} = \frac{(A-B)*f*0,5}{0,15*10*0,25} \quad (15)$$

Onde: A = Absorvância da amostra; B = Absorvância do controle da amostra; f = Fator de conversão da curva de calibração (mg/mL); 0,5 = Volume total do meio de reação (mL); 0,15 =

Fator de conversão de mg para μmol de glicose; 10 = Tempo de reação (min); 0,25 = Volume da enzima no meio de reação (mL); R = razão volume de solvente por grama de meio cultivado (mL/g).

4.7. Obtenção e concentração do extrato enzimático bruto

O extrato enzimático utilizado nas hidrólises foi obtido utilizando-se o material fermentado do quinto dia dos ensaios realizados para a análise de atividade enzimática. Utilizou-se uma proporção de 1 grama de material para 6 mL de solução tampão citrato (pH 4,8 e 50 mM); o extrato foi, então, centrifugado a 3600 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi armazenado apropriadamente em congelador. Posteriormente, o mesmo foi liofilizado a uma temperatura de $-48\text{ }^{\circ}\text{C}$ por, aproximadamente 48 horas, com o intuito de se obter um extrato com concentrações altas de enzimas celulases.

4.8. Hidrólise enzimática

Para a hidrólise, cerca de 3 g da palha de cana-de-açúcar pré-tratada foram colocadas em erlenmeyers e 60 mL de volume total de uma mistura de tampão citrato de sódio (pH 4,8 e 50 mM) e extrato enzimático concentrado foram adicionados. A proporção tampão citrato/extrato enzimático foi realizada de acordo com as concentrações de celulase total a serem estudadas, que foram de 5 FPU/g e 10 FPU/g de biomassa seca.

Os erlenmeyers foram devidamente vedados, para que não houvesse uma alteração considerável dos volumes reacionais e encubados em *shaker* com rotação mantida a 150 rpm durante as 48 h de hidrólise. A temperatura utilizada durante a hidrólise correspondeu ao valor encontrado na literatura para a temperatura ótima da enzima ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$), onde sua atividade pode chegar a um ponto máximo (AYALA, 2012; RABELO, 2007).

Ao longo da hidrólise, alíquotas de 1 mL do líquido reacional foram coletadas em períodos de tempo pré-determinados de 0, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4, 6, 8, 18, 24 e 48 horas e imediatamente congeladas para posterior análise de concentração de açúcares redutores totais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química

Os resultados da caracterização físico-química quando a umidade, pH, teor de sólidos solúveis e densidade aparente pode ser visualizada na Tabela 6. O resultado representa a média aritmética das análises, que foram realizadas em triplicata.

Tabela 6. Parâmetros da caracterização físico-química.

Resíduo	Umidade (%)	pH	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Densidade aparente (g/mL)
Farelo de trigo	11,53	6,43	0,00	0,229
Palha de cana	7,11	6,26	0,00	0,092

Fonte: Autor, 2017.

Os teores de umidade encontrados de 7 a 15% mostram que os mesmos podem ser armazenados em temperatura ambiente, sem que haja problemas com contaminação. Assim, todos os experimentos puderam ser realizados com o mesmo resíduo, evitando variações de composição inerentes às diferentes safras.

O pH do farelo de trigo bem como o da palha de cana são próximos a neutralidade, o que para o crescimento de fungos não é favorável. Geralmente o pH baixo, em torno de 4,5, favorece o desenvolvimento de fungos no meio de cultivo. O pH é uma variável importante em qualquer processo biológico, existindo valores de pH mínimo, ótimo e máximo para o crescimento do microrganismo.

Os teores de sólidos solúveis para ambos os resíduos foi de zero, evidenciando que não há presença de açúcares nos mesmos. A presença de açúcares nos resíduos pode provocar repressão catabólica, fazendo com que o microrganismo cresça mas não produza a enzima de interesse.

A densidade aparente de ambos os resíduos é baixa, revelando que os mesmos tendem a não se compactar completamente, criando espaços vazios que são responsáveis pela circulação de ar, fator favorável ao desenvolvimento de qualquer microrganismo (SANTOS, 2007).

5.2. Caracterização lignocelulósica da palha de cana in natura

A caracterização lignocelulósica procedeu-se em triplicata e os resultados mostrados na Tabela 7 são apresentados como média aritmética dos três valores obtidos.

Tabela 7. Comparação da composição química da palha de cana-de-açúcar in natura.

Componentes	Autor (2017)	Ayala (2012)	Oliveira (2010)	Silva (2009)
Celulose	29,52%	34,43%	39,80%	38,10%
Hemicelulose	27,08%	23,61%	28,60%	29,20%
Lignina total	19,35%	24,09%	22,50%	24,20%
Extrativos	3,57%	7,67%	6,20%	5,90%
Cinzas	6,09%	9,61%	2,40%	2,40%
Total	85,61%	99,38%	99,50%	99,80%

Fonte: Autor, 2017; Ayala, 2012; Oliveira, 2010; Silva, 2009.

O percentual de celulose encontrado na palha de cana utilizada foi de 29,52%. Comparando esse valor com os dados obtidos por outros autores, percebe-se que o percentual está abaixo da média para esse resíduo, que é de 40-44% (SANTOS et al., 2012). Porém, é necessário considerar que a espécie de cana-de-açúcar plantada e também o tipo de colheita realizado influenciam consideravelmente a porcentagem dos componentes presente na planta. Ainda assim, é possível afirmar que o teor de celulose encontrado é considerado alto, tornando a palha de cana uma excelente biomassa para a produção de etanol de segunda geração (PITARELO, 2013).

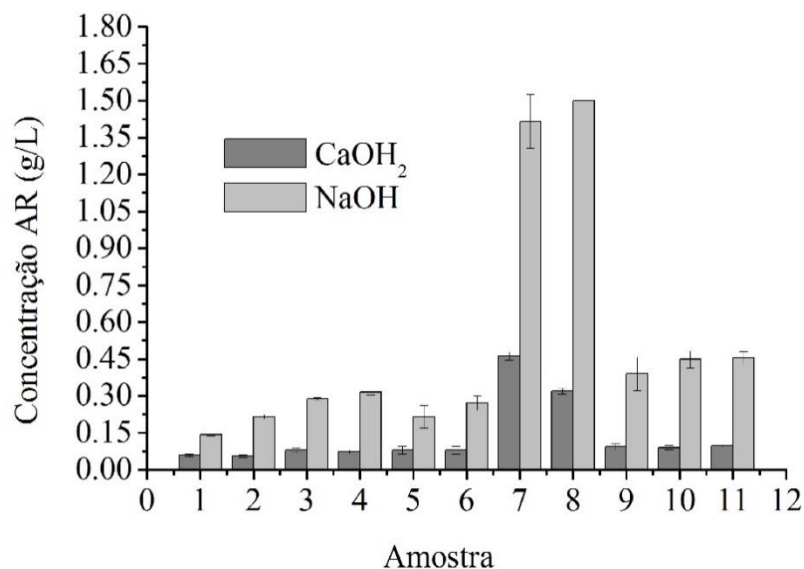
Em relação ao teor de cinzas, é necessário levar em conta que há diferentes concentrações de cinzas dependendo da localização da palha de cana utilizada. Uma palha que se encontra mais próxima do solo apresenta uma concentração de cinzas entre 6 e 10% (AYALA, 2012). Já a palha proveniente da região central da cana apresenta uma concentração de cinzas consideravelmente

menor, com valores entre 2 e 3% (SILVA, 2009). Isso mostra que a quantidade de cinzas da palha de cana-de-açúcar analisada nesse trabalho condiz com os dados encontrados na literatura.

5.3. Pré-tratamento químico da palha de cana in natura

O estudo do pré-tratamento químico foi realizado utilizando-se a ferramenta do planejamento fatorial experimental, com o intuito de avaliar a influência de três variáveis independentes: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo de reação (min) e concentração de reagente (%m/v). Dois reagentes diferentes foram testados: hidróxido de cálcio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e hidróxido de sódio, NaOH . A variável de resposta analisada foi o teor de açúcares redutores liberados no fim de cada reação. Na Figura 8, observa-se os resultados obtidos para os 22 experimentos realizados.

Figura 8. Análise do teor de açúcares redutores, em g/L, para planejamento experimental realizado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e NaOH . Os dados estão representados pelas médias \pm desvio padrão.



Fonte: Autor, 2017.

Analisando a Figura 8, percebe-se que as maiores concentrações de açúcares redutores ocorreram nas amostras de números 7 e 8, com 90 minutos de reação, 120°C de temperatura e concentrações de NaOH iguais a 3 e 5%, respectivamente. Nessas amostras, a concentração de açúcares redutores obtida foi de, aproximadamente, 1,50 g/L.

A fim de ilustrar os efeitos das variáveis na concentração de açúcares redutores, a análise estatística para o pré-tratamento com NaOH foi realizada através do *software* Statistica, versão 7.0. A Tabela 8 abaixo relaciona parâmetros do modelo estatístico.

Tabela 8. Parâmetros do modelo estatístico.

Fatores	Coefficientes	Desvio padrão	Intervalo de confiança (-95%)	Intervalo de confiança (+95%)
Média	0,51447	±0,02689	0,43979	0,58915
Tempo	0,30479	±0,03154	0,43443	0,78471
Temperatura	0,33435	±0,03154	0,49356	0,84384
Interação	0,27261	±0,03154	0,37998	0,72036

Fonte: Autor, 2017.

De acordo com a Tabela 8, percebe-se que não houve consideração do fator concentração de NaOH, pois o valor do seu coeficiente para o intervalo de confiança de 95% compreende um valor muito próximo de zero. Conseqüentemente, a elaboração do modelo matemático que representa o processo de pré-tratamento alcalino foi realizada apenas com os fatores tempo, temperatura e sua respectiva interação.

Para este intervalo de confiança, o valor do R^2 foi de 0,98598, evidenciando o bom ajuste do modelo estatístico na regressão linear. O modelo estatístico obtido pode ser representado através da equação linear abaixo (Eq. 15).

$$[AR] = 0,51447 + 0,30479 * t + 0,33435 * T + 0,27261 * t * T \quad (15)$$

Onde:

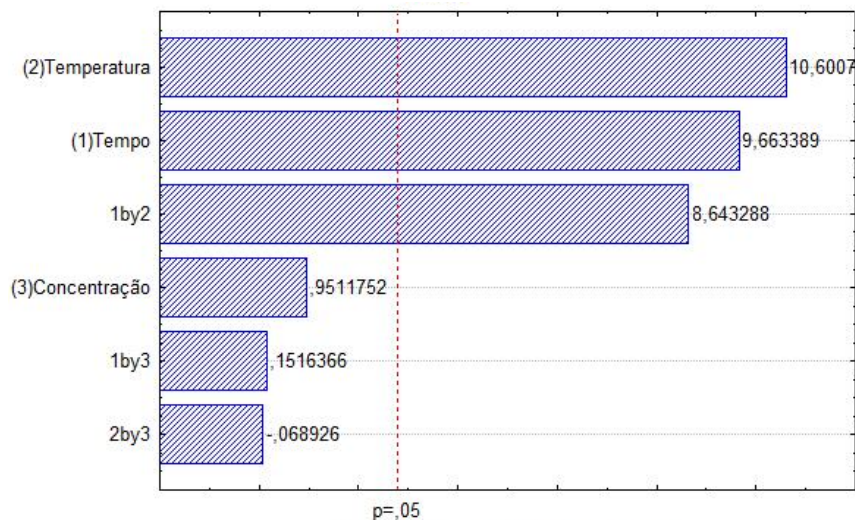
[AR] = concentração de açúcares redutores (g/L);

t = tempo de reação (min);

T = temperatura (°C).

Uma representação do quão significativa é uma variável independente sobre uma resposta pode ser obtida pelo Gráfico de Pareto na Figura 9. Nesse tipo de representação gráfica, toda variável que ultrapassar a linha do coeficiente de significância é considerada estatisticamente significativa.

Figura 9. Gráfico de Pareto dos efeitos principais e de interação das variáveis.

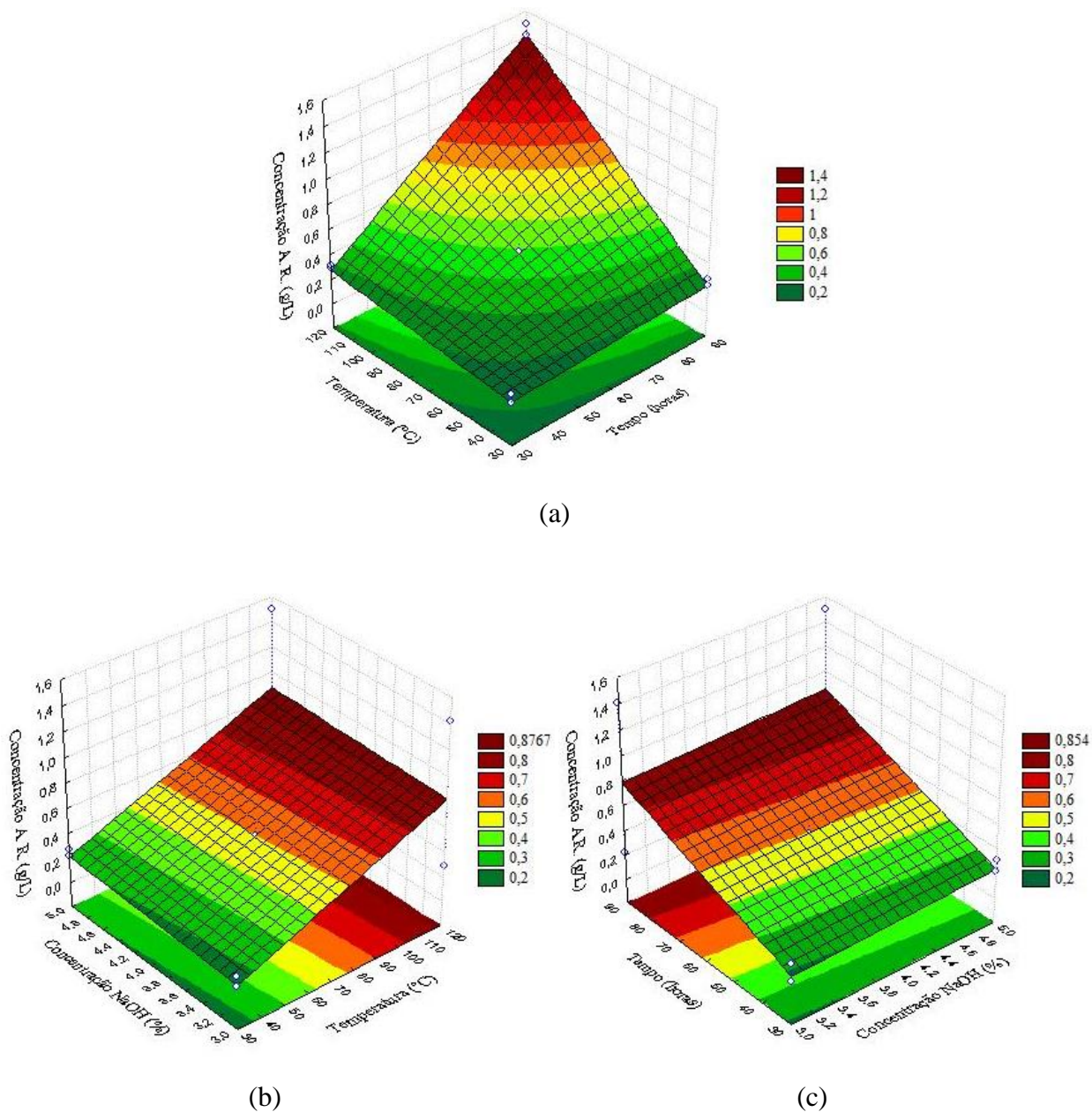


Fonte: Autor, 2017.

De acordo com o Gráfico de Pareto apresentado na Figura 9, apenas a temperatura e o tempo são as variáveis estatisticamente significativas para o nível de confiança de 95% e influenciam positivamente a concentração de açúcares redutores. Ainda é possível observar que a concentração de NaOH não altera de maneira expressiva a concentração de açúcares redutores.

Na Figura 10 abaixo, são apresentadas as superfícies de resposta (a, b e c). Essas figuras mostram a otimização das variáveis na forma real, duas a duas, em relação à resposta concentração de açúcares redutores.

Figura 10. Superfícies de resposta para a concentração de açúcares redutores em função do tempo e temperatura (a), da concentração de NaOH e da temperatura (b) e do tempo e da concentração de NaOH (c).



Fonte: Autor, 2017.

A análise das superfícies de resposta da Figura 10 (a, b e c) permite observar que a região com a maior concentração de açúcares redutores (em vermelho escuro) está localizada nos pontos

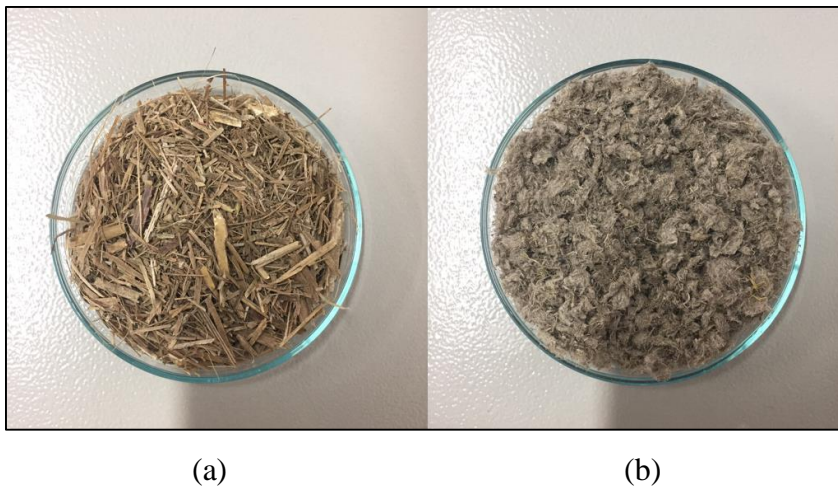
nos quais a temperatura está acima de 100 °C e o tempo de reação acima de 80 minutos. Logo, uma maior temperatura e um maior tempo de reação irão gerar uma maior concentração de açúcares redutores. Isso já era esperado, pois o aumento nessas variáveis implicam aumento na severidade do processo de pré-tratamento (NASCIMENTO, 2011).

Como os valores da concentração de NaOH estão muito próximos, para o processo de pré-tratamento nas condições avaliadas estas concentrações não apresentaram valores que venham a interferir no processo; logo, é interessante utilizar menores concentrações para redução dos custos. Logo, a condição escolhida para o pré-tratamento da palha de cana-de-açúcar a ser utilizada na hidrólise enzimática foi: temperatura de 120 °C, tempo de reação de 90 min e concentração de NaOH de 3%.

O pré-tratamento com a condição citada acima foi realizado com 200 g de palha de cana in natura. A reação de pré-tratamento químico apresentou um rendimento em massa de 40,5%, portanto, cerca de 60% dos componentes da palha foram solubilizados e removidos através das lavagens com água destilada que foram realizadas após o pré-tratamento.

Nascimento (2011) obteve um rendimento em massa de, aproximadamente, 50%, para o pré-tratamento químico do bagaço de cana com NaOH na proporção de 4%, a 121 °C por 60 min, percentual que pode ser considerado semelhante ao obtido neste trabalho. Isso evidencia que o tempo de reação é uma variável significativa, já que um aumento de 30 minutos no pré-tratamento realizado neste trabalho promoveu uma perda de 10% a mais no rendimento final. Após o pré-tratamento, a palha foi seca em estufa a 60 °C por 48 horas. Por meio da Figura 11, é possível comparar a palha de cana-de-açúcar in natura e a palha de cana-de-açúcar pré-tratada. De acordo com Santos et al. (2012) o escurecimento da palha pode estar associado à formação de produtos de degradação de carboidratos.

Figura 11. Palha de cana in natura (a) e a palha de cana pré-tratada com NaOH 3% (b).



Fonte: Autor, 2017.

5.4. Caracterização lignocelulósica da palha de cana pré-tratada

Após a realização do pré-tratamento químico da palha de cana com NaOH 3%, a mesma foi caracterizada para fins de comparação com a palha de cana in natura. A palha foi, novamente, submetida a uma hidrólise ácida com a finalidade de obter os teores de celulose, hemicelulose e lignina insolúvel, além do teor de extrativos e cinzas. A caracterização procedeu-se em duplicata e os resultados mostrados na Tabela 9 são apresentados como média aritmética dos valores obtidos.

Tabela 9. Composição química da palha de cana-de-açúcar in natura e pré-tratada com NaOH 3%.

Componentes	In natura	Pré-tratada
Celulose	29,52%	60,19%
Hemicelulose	27,08%	17,97%
Lignina total	19,35%	8,49%
Extrativos	3,57%	2,87%
Cinzas	6,09%	5,45%

Fonte: Autor, 2017.

A partir da Tabela 9, é possível observar uma apreciável solubilização da lignina, alcançando um percentual de 56,12%. Silva (2009) encontrou que, para o pré-tratamento da palha de cana com H₂SO₄ 1% por 30 minutos e NaOH 1% por 60 minutos, obteve-se uma solubilização de lignina de, aproximadamente, 78%. Ayala (2012) obteve um percentual de solubilização de lignina de 43,4%, para pré-tratamento da palha de cana realizado com Ca(OH)₂ por 100 horas e 94 °C.

Isso confirma a eficiência do tratamento alcalino, cujo objetivo é a deslignificação da biomassa. A solubilização da hemicelulose, por sua vez, atingiu um valor de 33,64%. A preservação da celulose também deve ser observada, uma vez que esta é a matéria-prima necessária para a realização da hidrólise e consequente produção de etanol de segunda geração.

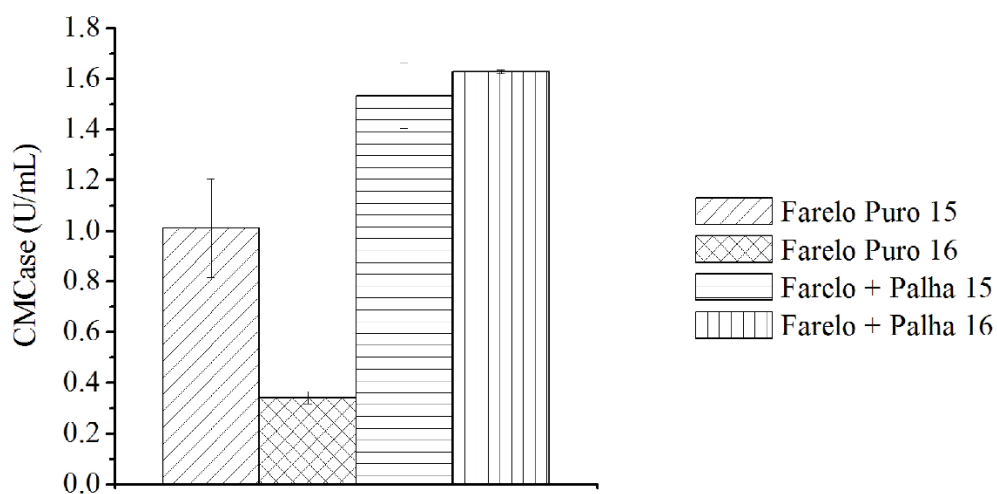
5.5. Produção de celulasas e xilanases

A Figura 12 relaciona a produção das enzimas CMCase (a), FPase (b) e xilanase (c), em 120 h de fermentação, para ensaios fermentativos realizados com o *Penicillium* sp. FSDE 15 e o *Aspergillus* sp. FSDE 16, além de farelo de trigo na proporção de 60% e palha de cana-de-açúcar in natura na proporção de 40% como substratos.

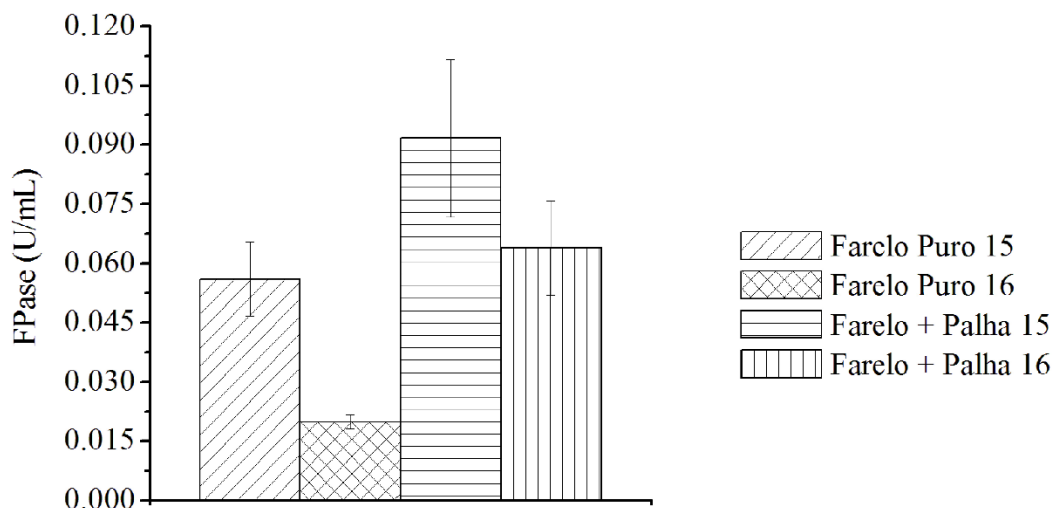
Como mostrado na Figura 12a, a máxima produção de CMCase foi de $1,63 \pm 0,01$ U/mL ($24,41 \pm 0,11$ U/g) e ocorreu para o cultivo realizado com o *Aspergillus* sp. FSDE 16 utilizando farelo de trigo e palha de cana na proporção de 60 e 40% como substratos, respectivamente. Já

analisando a produção da enzima FPase (celulase total) na Figura 12b, a máxima produção obtida foi de $0,092 \pm 0,02$ U/mL, que corresponde a $1,37 \pm 0,30$ U/g. A enzima xilanase, observada na Figura 12c, teve a máxima produção de $20,73 \pm 2,26$ U/mL ($310,90 \pm 20,72$ U/g). Ambas as enzimas FPase e xilanase tiveram seus maiores picos de produção alcançados em cultivo realizado com o *Penicillium* sp. FSDE 15, também utilizando farelo de trigo e palha de cana na proporção de 60 e 40%, respectivamente, como substratos.

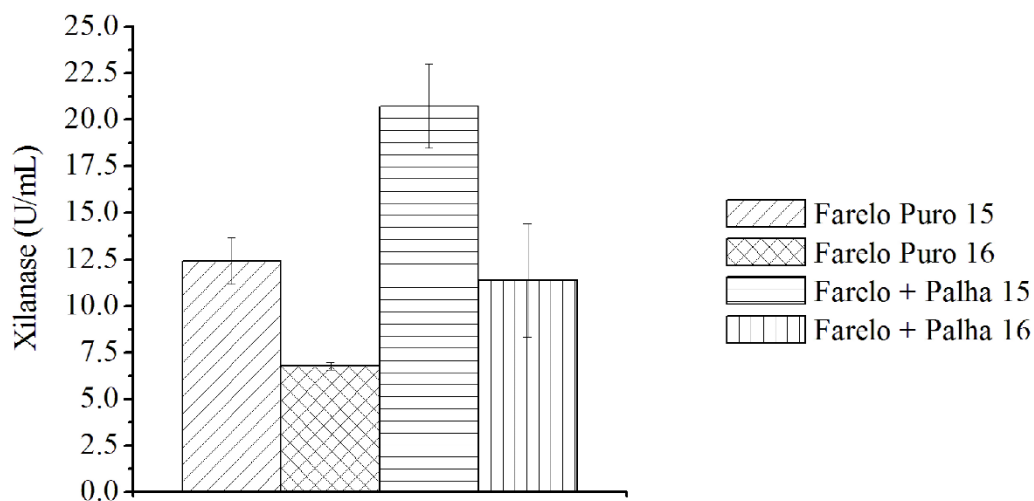
Figura 12. Produção de CMCase (a), FPase (b) e xilanase (c), em 120 h de fermentação, pelos microrganismos *Penicillium* sp. FSDE 15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16, para ensaios realizados com farelo de trigo e palha de como fontes de carbono.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autor, 2017.

Analisando os resultados de Rocha (2016), a melhor produção de CMCase e FPase por *Penicillium* sp. FSDE 15 foi de $1,0 \pm 0,1$ U/mL e $0,06 \pm 0,01$ U/mL, respectivamente, após 120 h de fermentação pelo método do cultivo em estado submerso, usando palha de cana pré-tratada com hidróxido de sódio como substrato. Comparando esses resultados com os obtidos neste trabalho, observa-se que o cultivo em estado sólido proporcionou um aumento de cerca de 50% na produção de CMCase e de FPase, evidenciando, assim, o potencial desse tipo de cultivo.

De acordo com Bonfim (2014), o ensaio fermentativo realizado com o *Penicillium* sp. FSDE 15 utilizando farelo de trigo puro como substrato e umidade de 50% apresentou um pico de atividade CMCase de 1,25 U/mL a 96 h de cultivo. Logo, este valor atividade CMCase foi menor se comparado com os cultivos realizados neste trabalho com farelo e palha de cana.

Santos et al. (2011) quantificaram a atividade da enzima CMCase, produzida por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *Rhizopus* sp., temperatura de 35 °C e resíduo proveniente do beneficiamento da seriguela como substrato. Em seus estudos, eles obtiveram uma atividade enzimática de 3,635 U/g, a 120 h de fermentação. Rocha (2010), por sua vez, obteve um valor máximo de CMCase de 9,00 U/g a 120 h de fermentação em estado sólido e 40 °C de temperatura, utilizando o fungo *Aspergillus niger* ATCC 16404 e farelo de arroz e casca de maracujá na proporção 1:1 como substratos.

Basso et al., (2010) obtiveram um valor de FPase igual a 1,6 U/g em 144 h de cultivo e 28 °C de temperatura, utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato e o fungo *T. reesei* QM9414 (conhecido na literatura por sua elevada capacidade hidrolítica), realizado em cultivo em estado sólido. No presente trabalho, observou-se a atividade FPase de, aproximadamente, 1,4 U/g (0,091 U/mL) para o cultivo realizado com o FSDE 15 e palha de cana e farelo de trigo como substratos. Analisando a produção de enzimas xilanases, Almeida (2012) obteve um valor de, aproximadamente, 237 U/g, em 14 dias de fermentação em estado sólido, utilizando o farelo de trigo puro a 50% de umidade como substrato e o fungo *T. reesei* RUT C-30, conhecido por ser um ótimo indutor de enzimas celulolíticas e xilanolíticas.

Portanto, os valores obtidos neste trabalho foram superiores aos encontrados na literatura e reforçam que a palha de cana utilizada apresenta potencial para a produção de enzima celulolíticas e xilanolíticas, bem como mostram que o *Penicillium* sp. FSDE 15 é forte candidato para a obtenção das enzimas de interesse.

5.6. Hidrólise enzimática

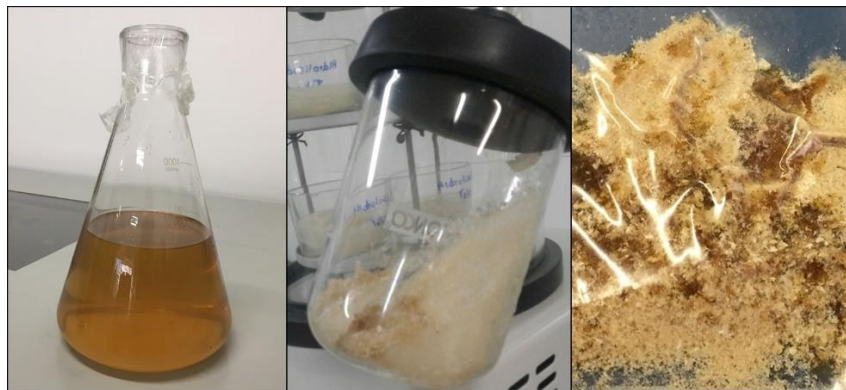
A hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada quimicamente com hidróxido de sódio na concentração de 3% foi realizada por meio da utilização do coquetel de enzimas proveniente do ensaio fermentativo com o *Penicillium* sp. FSDE 15 e palha de cana-de-açúcar in natura e farelo de trigo como substratos, nas proporções de 40 e 60%, respectivamente.

Nesse ensaio fermentativo, a concentração de enzimas FPase obtida no extrato (1,04 L) alcançou um valor de 0,092 U/mL, como pôde ser observado anteriormente na Figura 12b.

Por mais que esse valor tenha sido o maior quando comparado aos outros três ensaios fermentativos realizados, o mesmo ainda é considerado baixo para ser utilizado em hidrólises enzimáticas, significando que o extrato enzimático não é concentrado o suficiente a ponto de hidrolisar a celulose. Por este motivo, foi necessário liofilizar o extrato a fim de se obter um pó com altas concentrações de enzimas celulases.

O processo de liofilização pode ser visualizado em três etapas na Figura 13, onde o extrato diluído já centrifugado é liofilizado, dando origem a um pó com altas cargas da enzima de interesse. Esse pó, por sua vez, é ressuspensão em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. Após a liofilização, a concentração de enzimas FPase no extrato concentrado (80 mL) foi de 1,21 U/mL, significando um aumento em cerca de 13 vezes quando comparado ao extrato enzimático diluído.

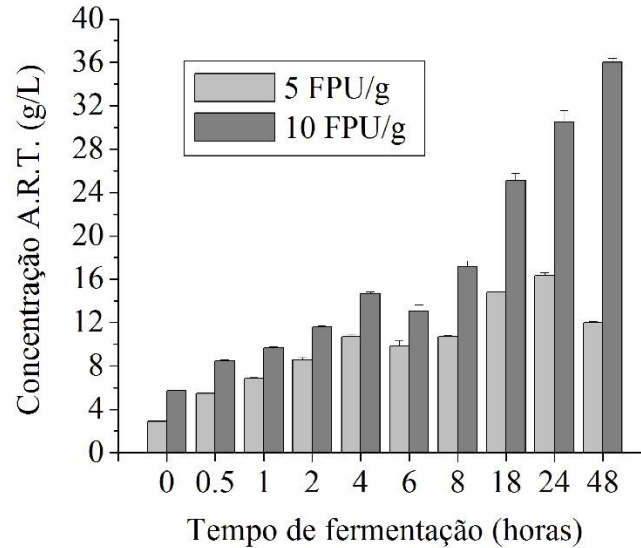
Figura 13. Processo de liofilização do extrato enzimático de FSDE 15 diluído, com obtenção de pó com altas concentrações de enzimas celulolíticas.



Fonte: Autor, 2017.

A Figura 14 abaixo relaciona a concentração de açúcares redutores totais, em g/L, liberados durante as 48 horas de hidrólise enzimática realizada com a palha de cana-de-açúcar pré-tratada com hidróxido de sódio 3%, para cargas enzimáticas de 10 e 5 FPU/g.

Figura 14. Teores de açúcares redutores totais, g/L, liberados nas hidrólises enzimáticas realizadas com palha de cana pré-tratada e extrato enzimático de *Penicillium* sp. FSDE 15. Os dados estão representados pelas médias \pm desvio padrão.



Fonte: Autor, 2017.

De acordo com a Figura 14, a maior concentração de A.R.T, para cargas enzimáticas de 10 FPU/g, foi de $36,01 \pm 0,40$ g/L de solução, a 48 h de hidrólise. Já para a carga enzimática de 5 FPU/g, o valor obtido foi de $16,35 \pm 0,24$ g/L de solução, em 24 h. Nas análises de A.R.T., estão incluídos vários açúcares redutores, tais como: glicose, celobiose, açúcares provenientes da hemicelulose (principalmente xilose) e oligossacarídeos de alto peso molecular (Rabelo, 2007).

Ayala (2012) realizou hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com hidróxido de cálcio 1,0% (por 100 minutos e 94 °C) e obteve um teor de 6,57 g/L de glicose, a 72 horas de hidrólise, utilizando uma carga enzimática de celulasas de 15 FPU/g de biomassa seca da enzima Celluclast. Oliveira (2010) também realizou hidrólise (temperatura de 45 °C e agitação de 100 rpm) utilizando a enzima Celluclast, com uma carga enzimática de 15 FPU/g. A biomassa utilizada foi a palha de cana-de-açúcar pré-tratada através da explosão à vapor, gerando um hidrolisado com 35,6 g/L de glicose, a 72 horas de fermentação.

Nos estudos realizados por Nascimento (2011), no qual realizou-se uma hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar com hidróxido de sódio 1% e carga enzimática de 20 FPU/g de

biomassa seca da enzima Accelerase 1500, o autor obteve um teor de glicose de, aproximadamente, 33 g/L de solução, em 48 horas de hidrólise.

Todos esses estudos realizados por diferentes autores evidenciam que os resultados obtidos neste trabalho, por meio da utilização da palha de cana-de-açúcar pré-tratada com NaOH 3% e do coquetel enzimático produzido por *Penicillium* sp. FSDE 15, apresentam grande potencial e são fortes candidatos em processo que visam a produção de etanol de segunda geração.

6. CONCLUSÕES

O etanol celulósico surge como uma fonte de energia promissora e renovável no setor de combustíveis, uma vez que utiliza como matéria prima os resíduos agroindustriais. Dentre as etapas necessárias para a sua produção, a etapa de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica ainda necessita ser estudada e aperfeiçoada, de modo que a desestruturação da parede celular seja satisfatória, e a celulose esteja totalmente disponível para a etapa de hidrólise.

Através dos experimentos realizados neste trabalho, foi possível verificar que a palha de cana-de-açúcar utilizada continha um valor considerável de celulose (~60%), e que o pré-tratamento químico com hidróxido de sódio se mostrou eficiente na remoção da lignina, com solubilização de quase 57%. O pré-tratamento também foi responsável por solubilizar cerca de 34% da hemicelulose presente no resíduo.

Em relação às condições de pré-tratamento, verificou-se que a utilização de concentração de hidróxido de sódio a 3%, temperatura de 120 °C e tempo de contato de 90 minutos foi a condição em que houve a maior liberação de açúcares redutores. Sendo assim, o hidróxido de sódio pode ser considerado um melhor reagente quando comparado ao hidróxido de cálcio.

Também foi possível perceber, através dos valores quantitativos encontrados para as enzimas produzidas, que a palha de cana é um bom resíduo a ser utilizado para a indução de celulases e xilanases, juntamente com os fungos filamentosos *Penicillium* sp. FSDE 15 e *Aspergillus* sp. FSDE 16, isolados de uma usina sucroalcooleira local. O potencial desses fungos, especialmente o 15, é igual ou até maior que algumas espécies largamente conhecidas na literatura e utilizadas para a produção das enzimas de interesse deste trabalho.

A partir dos resultados da hidrólise enzimática, confirmou-se que o coquetel enzimático rico em celulases e xilanases desempenhou bem o seu papel. Ao final das 48 horas, os teores de açúcares redutores totais liberados superaram os 35 g/L de solução, para uma carga enzimática de 10 FPU/g. É evidente que estudos mais aprofundados e mais repetições de experimentos são necessários para confirmar a eficácia do uso dos fungos analisados neste trabalho, bem como a sua implantação a nível industrial. Porém, é inegável que o uso da palha de cana como fonte de carbono é necessário de modo que mais um resíduo lignocelulósico seja aproveitado na produção de etanol de segunda geração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. C. O. *Indução de celulases e xilanase por Trichoderma reesei e Penicillium variabile em cultivo em estado sólido a partir de substratos lignocelulósicos*. 2012. 145 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ASSIS, T. R. *Obtenção de enzimas lignolíticas visando a hidrólise enzimática da fração lignocelulósica de bagaço de cana pré-tratado hidrotermicamente*. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

AYALA, O. L. B. *Avaliação de pré-tratamentos para a hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar considerando a produção de etanol*. 2012. 173 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 2012.

BANSAL, P. et al. *Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates*. Biotechnology Advances, 27, 833-848, 2009.

BASSO, T. P. et al. *Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e madeira em decomposição*. Pesq. Agropec. Bras., Vol. 45, No. 15, 1282-1289, 2010.

BONFIM, K. S. et al. *Comparação da síntese de celulases pelos fungos Trichoderma reesei e o FSDE15*. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

CARVALHEIRO, F. et al. *Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments*. Journal of Scientific & Industrial Research, Vol. 67, 849-864, 2008.

CARVALHO, M. L. *Estudo cinético da hidrólise enzimática de celulose de bagaço de cana-de-açúcar*. 2011. 103f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

CASTRO, A. M.; Pereira Jr., N. *Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais*. Química Nova, Vol. 33, No. 1, 181-188, 2010.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Acompanhamento da safra brasileira: cana*. Vol. 3. Safra 2016/17, No. 3. Terceiro levantamento, Brasília, Distrito Federal, 2016.

CORREIA, R. T. P. *Estudo do cultivo semissólido em resíduo de abacaxi por Saccharomyces cerevisiae e Rhizopus oligosporus*. 2004. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2004.

CORTEZ, L. A. B. *Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade*. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2010. 992 p.

FREITAS, T. *Etanol de 2ª geração já é quase realidade*. Disponível em <<http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2011/10/985140-etanol-de-2-geracao-ja-e-quase-realidade.shtml>>. Acesso em: 25 de março de 2017.

GHOSE, T.K. *Measurement of cellulase activities*. Pure & Appl. Chem. 59 (2): 257-268, 1987.
Goldschmidt, O. Ultraviolet Spectra. In: Sarkanen, K.; Ludwig, C. H. (Eds). *Lignins: occurrence, formation, structure and reactions*. New York: John Wiley & Sons, 1971. P. 241-298.

GUIMARÃES, L. H. S. et al. *Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest*. Brazilian Journal of Microbiology, 37, 474-480, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3ª ed. São Paulo: 1985.

KIELING, D. D. *Enzimas, aspectos gerais*. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

LYND, L.R. et al. *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 506–577, 2002.

MACIEL, G. M. *Desenvolvimento de bioprocesso para produção de xilanases por fermentação no estado sólido utilizando bagaço de cana de açúcar e farelo de soja*. 2006. 146 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

MARABEZI, K. *Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar*. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MARTINS, L.F. et al. *Comparison of Penicillium echinulatum and Trichoderma reesei cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates*. Bioresource Technology, v.99, p.1417-1424, 2008.

MESCHEDE, D. K. et al. *Teores de lignina e celulose em plantas de cana-de-açúcar em função da aplicação de maturadores*. Planta Daninha, Vol. 30, No. 1, 121-127, Viçosa, Minas Gerais, 2012.

MILÉO, P. C. *Aplicações da celulose de palha de cana-de-açúcar: obtenção de derivados partindo de celulose branqueada e de biocompósitos com poliuretana obtida a partir de óleo de mamona (Ricinus communis L.)*. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MILLER, G. L. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Anal. Chem., 31 (3): 426-428, 1959.

MORAIS, J. P. S.; Rora, M. F.; Marconcini, J. M. *Procedimentos para Análise Lignocelulósica*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

MORETTI, M. M. S. *Produção de ligno-hemi-celulases por fermentação em estado sólido e avaliação dos efeitos da aplicação das enzimas na composição química e estrutura do bagaço e*

da palha de cana. 2013. 128 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

NASCIMENTO, V. M. *Pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros*. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2011.

NIGAM, A.; Singh, B. *Production of liquid biofuels from renewable resources, Progress in Energy and Combustion Science*. Science 37: 52 – 68, 2011.

OGEDA, T. L.; Petri, D. F. S. *Hidrólise enzimática de biomassa*. Química nova, Vol. 33, No. 7, 1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, F. M. V. *Avaliação de diferentes pré-tratamentos e deslignificação alcalina na sacarificação da celulose de palha de cana*. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PITARELO, A. P. *Produção de etanol celulósico a partir de bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor*. 2013. 162 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2013.

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. 180 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, São Paulo, 2007.

ROCHA, C. P. *Otimização da Produção de Enzimas por Aspergillus niger em Fermentação em Estado Sólido*. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2010.

ROCHA, J. C. *Produção de celulasas e xilanasas utilizando o Penicillium sp. FSDE15*. 2016. 44 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2016.

ROSA, M. F. et al. *Valorização de resíduos da agroindústria*. Vol. 1, Palestras. II Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA. Foz do Iguaçu, Paraná, 2011.

SAAD, M. B. W. *Avaliação técnica preliminar da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar*. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SALES, M. R. et al. *Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de Aspergillus*. *Pes. Agropec, Bras*, Vol. 45, No. 11, 1920-1296, 2010.

SANTOS, F. A. et al. *Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando a produção de etanol celulósico*. *Química Nova*, Vol. 37, No. 1, 56-62, 2014.

SANTOS, F. A. et al. *Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol*. *Química Nova*, Vol. 35, No. 5, 1004-1010, 2012.

SANTOS, S. F. M. *Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato*. 2007. 148 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

SANTOS, T. C. et al. *Determinação da atividade de CMCase e FPase da estipe fúngica Rhizopus sp. através da bioconversão do resíduo de seriguela (Spondias purpurea L.)*. *UNOPAR Cient. Biol. Saúde*, 13 (3), 145-149, 2011.

SCHEUFELE, F. B. *Bioconversão de resíduos agroindustriais por micro-organismos do bioma amazônico produtores de enzimas lignocelulolíticas*. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná, 2012.

SEABRA, J. E. A. *Avaliação técnico-econômica de opções para o aproveitamento integral da biomassa de cana no Brasil*. 2008. 298 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

SILVA, N. L. C. *Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose*. 2010. 123 f. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, V. F. N. *Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico*. 2009. 113 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SOARES, I. A. et al. *Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso Aspergillus niger*. Ciênc. Tecnol. Aliment. 30(3), 700-705, Campinas, São Paulo, 2010.

SOUSA, V. M. Z. *Desenvolvimento de novas metodologias para o pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana para a produção de etanol celulósico*. 2014. 57 f. Monografia. Faculdade UnB Gama, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.

STROPARO, E. C. et al. *Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico*. Semina: Ciências Agrárias, Vol. 33, No. 6, 2267-2278, 2012.

UNICA, União da Indústria da Cana-de-Açúcar. Disponível em: <www.unica.gov.br>. Acesso em: 26 de março de 2017.

VALADARES, F. L. *Produção e uso de enzimas derivadas do fungo Pleurotus ostreatus na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico*. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZHENG, Y.; Pan, Z.; Zhang, R. *Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production*. Int. J. Agric & Biol. Eng. Vol. 2, No. 3, 2009.