

Hernán Darío Zamora Zamora

**Produção simultânea de hemi(celulases) e
açúcares redutores por *Pleurotus ostreatus*
utilizando resíduos de *Alstroemeria sp.***

Brasil

Fevereiro – 2017

Hernán Darío Zamora Zamora

**Produção simultânea de hemi(celulases) e açúcares
redutores por *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de
*Alstroemeria sp.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia - UFU e da Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis.

Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Instituto de Química – IQ

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis – PPGB

Orientador(a): Prof. Dr. Daniel Pasquini

Coorientador(a): Profa. Dra. Milla Baffi

Brasil

Fevereiro – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

Z25p
2017

Zamora Zamora, Hernán Darío, 1981--
Produção simultânea de hemi(celulases) e açúcares redutores por
Pleurotus ostreatus utilizando resíduos de Alstroemeria sp. / Hernán
Darío Zamora Zamora. - 2017.
94 f. : il.

Orientador: Daniel Pasquini.
Coorientadora: Milla, Baffi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Pós-
Graduação em Biocombustíveis.
Inclui bibliografia.

1. Biocombustíveis - Teses. 2. Celulase - Teses. 3. Resíduos vegetais
- Teses. I. Pasquini, Daniel. II. Baffi, Milla. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. IV.
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Programa de
Pós-Graduação em Biocombustíveis. V. Título.

CDU: 662.756



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 09/PPBIC.

DATA: 07/02/2017

DISCENTE: Hernán Darío Zamora Zamora

MATRÍCULA: 11512PGB001

TÍTULO DO TRABALHO: Obtenção de açúcares redutores a partir de resíduos de *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus*.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Biocombustíveis

LINHA DE PESQUISA: Processos químicos e bioquímicos

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: PRONEM FAPEMIG APQ-01360-14: Técnicas de pré-tratamento de resíduos lignocelulósicos para a produção de biogás (metano e hidrogênio), bioetanol, celulose nanocristalina e outros bioprodutos químicos de valor agregado.

Às quatorze horas do dia sete de fevereiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório da Biblioteca do Bloco 3C, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Fernanda Badotti, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Líbia Diniz Santos da Faculdade de Engenharia Química, e Daniel Pasquini, do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPBIC. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE HEMI (CELULASES) E AÇÚCARES REDUTORES POR PLEUROTUS OSTREATUS UTILIZANDO RESÍDUOS DE ALSTROEMERIA SP.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof(a). Dr(a). Fernanda Badotti

CEFET-MG

Prof(a). Dr(a). Líbia Diniz Santos

FEQUI-UFU

Prof(a). Dr(a). Daniel Pasquini

IQUFU-UFU

*Este trabalho é dedicado a Deus; pela oportunidade de viver e guia do meu caminho,
a meus pais Orlando e Enriqueta; por o seu apoio, sábios conselhos e amor incondicional,
a meus irmãos Daniel e Leo; porque me ajudaram a tornar me na pessoa que sou
e a minha esposa Adriana; por...realmente por tudo.*

AGRADECIMENTOS

Expresso meus mais verdadeiros sentimentos de gratidão a todos aqueles que contribuíram pela concretização desta pesquisa, especialmente à Organização das Nações Americanas (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ter me selecionado para realizar meu curso de mestrado.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e à Universidade Federal dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) por permitir me formar parte da família acadêmica que contribui com o desenvolvimento do povo. Ao Instituto de Química por brindar me a oportunidade de aprofundar em temas de índole mundial, aos Professores e Coordenadores do Programa de Pós-graduação em Biocombustíveis e aos Professores Dr. Daniel Pasquini e Dra. Milla Baffi por suas orientações e por convidar me a fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À professora Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya do Laboratório de Associações Micorrízicas (Departamento de Microbiologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária) da Universidade Federal de Viçosa, que gentilmente forneceu a linhagem fúngica usada no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a Júlia e a Beatriz, técnicas do Laboratório de Microbiologia Ambiental da UFU, pela ajuda na parte experimental e a todos meus colegas de laboratório.

Agradeço a meu vizinho e amigo país Brasil!

*“Pensar com cabeça e coração,
atuar com a alma
e crer com fé
faz parte da inspiração”
(...Hernán)*

RESUMO

Este trabalho é o primeiro no Brasil em avaliar a produção simultânea de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais (ART) a partir de caules e folhas de *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6 através de fermentação em estado sólido (FES). A pesquisa é pioneira em caracterizar resíduos da floricultura brasileira e serem aproveitados, desde o ponto de vista químico, para a obtenção de ART considerando sua posterior conversão em bioetanol de segunda geração. A composição química que apresentaram ditos resíduos foi: umidade 10,1 %, cinza 7,5%, celulose 36,1%, hemiceluloses 14,7% e lignina 15,2%. A análise elementar mostrou que o conteúdo de carbono foi de 42,8%, nitrogênio 1,1%, hidrogênio 5,4%, enxofre 1,3 % e oxigênio 42,0%. Além disso, as concentrações de alguns metais foram: cobre 20,0 mg/kg, ferro 256,8 mg/kg, zinco 133,4 mg/kg, chumbo 0,0 mg/kg e manganês 105,2 mg/kg. A primeira etapa da pesquisa (nomeada preliminar) verificou que é possível a produção paralela de enzimas hemi(celulolíticas) e ART usando um planejamento experimental univariado, onde as variáveis de resposta (ou variáveis dependentes) foram as atividades enzimáticas e a concentração de ART, e o fator (ou variável independente) selecionado foi o tempo, na faixa de 0 até 14 dias fazendo quantificações em intervalos de 24 horas em duplicata. Nesta etapa, o fungo foi capaz de produzir as enzimas exoglicanase, endoxilanase, β -xilosidase, endoglicanase e β -glicosidase; cujas máximas atividades foram 10,3 U/g no dia 4 da FES, 74,5 U/g (dia 5), 26,3 U/g (dia 6) 20,5 U/g (dia 9) e 94,9 U/g (dia 11), respectivamente, e encontrou-se que a concentração mais alta de ART foi de 3,3 g/L alcançada no dia 12 de fermentação. Depois de conferir a produção simultânea de enzimas e ART, uma segunda etapa foi desenvolvida (denominada triagem), na qual, avaliou-se os efeitos dos fatores temperatura (T, °C), concentração de substrato (CS, %) e tempo (t, dias) sobre a síntese de enzimas hemi(celulolíticas) e a produção de ART. Para esta fase, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 em triplicata, onde, os níveis de avaliação dos fatores foram 24 e 32 °C, 20 e 30 % de CS e 8 e 15 dias, e as variáveis de resposta foram as mesmas do estudo preliminar. Nesta parte, sob um nível de significância de 5%, o efeito de primeira ordem mais significativo na produção de enzimas (exceto para β -xilosidase) e ART foi a temperatura; as atividades celulolíticas e os ART foram maximizados quando a temperatura da FES foi mantida em 24 °C e as atividades hemicelulolíticas, tiveram uma forte influência positiva quando a temperatura foi de 32 °C. A última etapa desenvolvida neste estudo, foi a otimização de produção de ART, realizada com base em um planejamento composto central (PCC), suportado na significância dos fatores avaliada na triagem. Aqui, a produção máxima de ART predita pelo modelo matemático foi de 4,35 g/L sob as condições de 24,22 °C, 20,75% de CS e 8,94 dias de fermentação; configuração que esteve muito próxima do ponto central selecionado (4,36 g/L a 24 °C, 20 % de CS e 9 dias de fermentação) e da máxima concentração de

ART obtida na triagem (4,45 g/L nas mesmas condições do ponto central).

A composição lignocelulósica dos resíduos florais utilizados, está dentro da faixa dos teores de lignina, celulose e hemiceluloses para serem considerados como uma biomassa alternativa para a produção de bioetanol de segunda geração. Segundo os teores de carbono, nitrogênio, cobre e manganês, os resíduos de alstroeméria foram um substrato adequado para o correto crescimento e desenvolvimento das atividades do *P. ostreatus* PLO6 na síntese de enzimas para degradação de matérias-primas lignocelulósicas (LC). O sistema avaliado exibiu que a síntese de hemicelulases é potencializada a 32 °C, enquanto que a produção de celulasas e ART favorece-se a 24 °C.

Palavras-chaves: Celulasas. hemicelulasas. resíduos de flores.

ABSTRACT

This study is the first in Brazil to assess a simultaneous production of hemi(cellulolytic) enzymes and reducing sugars (RS) from *Alstroemeria sp.* stems and leaves by the fungus growth *Pleurotus ostreatus* PLO6 using solid state fermentation (SSF). The researching is pioneer to characterize brazilian flower waste and, from chemical view point, to taking advantage this biomass to obtain ART, regarding its subsequent conversion into second generation bioethanol. The chemical composition of this kind of waste was: moisture 10,1%, ash 7,5%, cellulose 36,1%, hemicelluloses 14,7% e lignin 15,2%. The elemental analysis was: carbon 42,8%, nitrogen 1,1%, hydrogen 5,4% and sulfur 1,3%. Besides, the metal concentrations were: copper 20,0 mg/kg, iron 256,8 mg/kg, zinc 133,4 mg/kg, lead 0,0 mg/kg e manganese 105,22 mg/kg. The researching first stage (called preliminary) verified the simultaneous production of hemi(cellulolytic) enzymes and RS designing univariate experiments, where the response variables were (hemi)cellulolytic enzymatic activities and RS concentration, and the factor chosen was time between 0 and 14 days; performing quantification in duplicate each 24 hours. At this stage, the basidiomycete was able to produce endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, endoxylanase and β -xylosidase enzymes, with maximum activities of 10,3 U/g (day 4), 74,5 U/g (day 5), 26,3 U/g (day 6), 20,5 U/g (day 9) and 94,9 U/g (day 11), respectively and the RS highest concentration got was 3,3 g/L at 12th day of fermentation. After to check the simultaneous production of enzymes and RS, a second stage was performed (called screening), which assessed effects of temperature (T, °C), substrate concentration (SC) and time (t, days) on enzymatic synthesis and RS. This phase, was developed with a statistical factorial design 2^3 in triplicate, where, the factor levels were 24 and 32 °C, 20 and 30 % de SC, and 8 and 15 days, and the response variables were the same used at preliminary phase. In this part, with a significance level of 0,05, the effect more significant on enzymes (except to β -xylosidase) and RS production was temperature; cellulolytic activities and RS were maximized during 24 °C, while hemicellulolytic enzymes were maximized at 32 °C. The last stage developed was RS optimization, it was performed based on central composite design (CCP), established according to significance results obtained at screening phase. There, the highest production of RS predicted by the mathematical model was 4,35 g/L at 24,22 °C, 20,75% of SC and 8,94 days of fermentation; conditions very close to center point chosen (4,36 g/L at 24 °C, 20% of SC and 9 days of SSF) and the highest RS concentration achieved at screening stage (4,45 g/L with the same conditions of center point). The chemical composition of flower waste is inside the rank of cellulose, hemicelluloses and lignine, considered like alternative biomass to produce second generation bioethanol. According to content of carbon, nitrogen, copper and manganese, *Alstroemeria sp.* waste were a suitable substrate that let good growth and developing of *P. ostreatus* PLO6 activities to synthesize enzymes that degrade lignocellulosic (LC) raw material. Also, results showed

that hemicellulases synthesis was maximized at 32 °C, while cellulases and RS production was more favorable at 24 °C.

Key-words: Cellulases. hemicellulases. flower waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Consumo mundial de energia primária entre os anos 1993 e 2013 dos países da OECD e não-OECD	23
Figura 2 – Dinâmica mundial do preço do petróleo nos últimos 25 anos	24
Figura 3 – Dinâmica mundial do preço do carvão tipo "steam" nos últimos 10 anos	25
Figura 4 – Dinâmica mundial do preço de gás natural nos últimos 20 anos	25
Figura 5 – Diferentes fontes de carboidratos usadas para a produção de bioetanol de primeira e segunda geração	28
Figura 6 – Dinâmica do preço mundial do Bioetanol	29
Figura 7 – Localização e constituição da estrutura lignocelulósica	32
Figura 8 – Estrutura química da celulose	33
Figura 9 – Estrutura química de monossacarídeos que compõem as hemiceluloses .	34
Figura 10 – Estrutura química da xilana em farelo de milho	35
Figura 11 – Estrutura química das unidades básicas da lignina	36
Figura 12 – Alstroeméria	38
Figura 13 – Corpo de frutificação do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
Figura 14 – Etapa micelial do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> PLO6	40
Figura 15 – Ação das hemicelulases sobre xilana	42
Figura 16 – Ação das celulasas sobre celulose	43
Figura 17 – Atividade enzimática da endoglicanase (verde), exoglicanase (vermelho) e β -glicosidase (azul) sintetizadas por <i>P. ostreatus</i> PLO6 durante 14 dias	53
Figura 18 – Atividade enzimática da endoxilanase (roxo) e β -xilosidase (laranja) sintetizadas por <i>P. ostreatus</i> PLO6 durante 14 dias	55
Figura 19 – Produção de ART por meio do crescimento do <i>P. ostreatus</i> PLO6 em resíduos de alstroeméria durante 14 dias	56
Figura 20 – Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de: a) endoglicanase; b) exoglicanase; c) β -glicosidase	58
Figura 21 – Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de: a) endoxilanase; b) β -xilosidase	61
Figura 22 – Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de açúcares redutores totais	63
Figura 23 – Superfície de resposta para produção de ART sob condições de a) CS e t, b) CS e T e c) t e T	65

Figura 24 – P-valores para a prova de significância das atividades enzimáticas e as concentrações de ART no estudo preliminar	90
Figura 25 – P-valores para a prova de normalidade das atividades enzimáticas e as concentrações de ART no estudo preliminar	91
Figura 26 – Significância dos efeitos dos fatores e correlação do modelo para as atividades enzimáticas e as concentrações de ART na triagem	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades químicas e físicas do etanol, metanol e gasolina.	27
Tabela 2 – Composição lignocelulósica de diferentes resíduos vegetais.	36
Tabela 3 – Variáveis e suas condições empregadas no planejamento experimental .	49
Tabela 4 – Níveis dos fatores empregados no planejamento experimental	49
Tabela 5 – Variáveis e suas condições empregadas no planejamento central composto	50
Tabela 6 – Composição química dos resíduos de <i>Alstroemeria sp.</i> determinados neste estudo e de outros resíduos agroindustriais da literatura	51
Tabela 7 – Composição de alguns metais nos resíduos de <i>Alstroemeria sp.</i> determi- nados neste estudo e de outros resíduos agroindustriais da literatura . .	52
Tabela 8 – Atividades enzimáticas (hemi)celulolíticas e concentrações de açúcares redutores totais produzidas por <i>P. ostratus</i> PLO6 durante 14 dias (Preliminar)	89
Tabela 9 – Atividades enzimáticas celulolíticas usando o <i>P. ostratus</i> PO6 (Triagem)	92
Tabela 10 – Atividades enzimáticas hemicelulolíticas e produção de açúcares redu- tores totais usando o <i>P. ostratus</i> PO6 (Triagem)	92
Tabela 11 – Concentração de açúcares redutores totais produzidos no planejamento central composto	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de carbono
toe	Tonelada equivalente de petróleo
FES	Fermentação em Estado Sólido
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
BRICS	Aliança política entre Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul
USD	Dólares americanos
WTI	West Texas Intermediate
NWE	Mercado da Europa Noroeste
Gt	Gigatoneladas
CO ₂ -eq	Dióxido de carbono equivalente
tCO ₂ -eq	Tonelada de dióxido de carbono equivalente
1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
3G	Terceira geração
GL	Gigalitros
hL	Hectolitros
ML	Megalitros
S1	Parede celular secundária externa
S2	Parede celular secundária meia
S3	Parede celular secundária interna
CS	Concentração de substrato
T	Temperatura
t	Tempo
ART	Açúcares redutores totais

SP	Estado de São Paulo (Brasil)
SC	Estado de Santa Catarina (Brasil)
RS	Estado de Rio Grande do Sul (Brasil)
C/N	Relação mássica entre o Carbono e Nitrogênio
CMCase	Enzima Carboximetilcelulase (endoglicanase)
CBH	Enzima Celobiohidrolase (exoglicanase)
MG	Metil galacturônico
LiP	Lignina peroxidases
MnP	Manganês peroxidases
C _α	Carbono adjacente ao grupo funcional
C _β	Segundo carbono adjacente ao grupo funcional
C _{LKS}	Concentração de lignina Klason solúvel
A ₂₁₅	Absorbância no comprimento de onda de 215 nm
A ₂₈₀	Absorbância no comprimento de onda de 280 nm
DNS	Ácido 3,5- dinitrosalicílico
PCC	Planejamento Central Composto
PC	Ponto Central
TAPPI	Associação Técnica da Indústria de Polpa e Papel
U	Unidade de atividade enzimática

SUMÁRIO

Introdução	18
1 Objetivos	22
1.1 Objetivo geral	22
1.2 Objetivos específicos	22
2 Fundamentação teórica	23
2.1 Matriz energética	23
2.2 Biomassa	26
2.3 Bioetanol	27
2.4 Estrutura lignocelulósica	32
2.4.1 Celulose	33
2.4.2 Hemiceluloses	33
2.4.3 Lignina	35
2.5 Floricultura	37
2.5.1 <i>Alstroemeria sp.</i>	38
2.6 Fungos de decomposição branca	39
2.6.1 <i>Pleurotus ostreatus</i>	39
2.7 Enzimas lignocelulolíticas	41
2.7.1 Ligninases	41
2.7.2 Hemicelulases	41
2.7.3 Celulases	42
2.7.4 Síntese de enzimas por meio de fermentação em estado sólido	43
3 Metodologia	44
3.1 Substrato	44
3.1.1 Umidade	44
3.1.2 Cinzas	44
3.1.3 Lignina Klason insolúvel	45
3.1.4 Lignina Klason solúvel	45
3.1.5 Holocelulose	45
3.1.6 Celulose	46
3.1.7 Hemiceluloses	46
3.1.8 Análise elementar	46
3.1.9 Metais	46
3.2 Linhagem fúngica	47
3.3 Obtenção de açúcares redutores totais	47
3.4 Atividade enzimática	48
3.4.1 Atividade da β -glicosidase (EC 3.2.1.21) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37)	48

3.4.2	Atividade da exoglicanase (avicelase ou EC 3.2.1.91), endoglicanase (CMCase ou EC 3.2.1.3) e endoxilanase (EC 3.2.1.8)	48
3.5	Análise estatística	48
3.6	Influência da temperatura, concentração de substrato e tempo na síntese de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais	49
3.7	Otimização estatística para produção de açúcares redutores totais	50
4	Resultados e Discussão	51
4.1	Caracterização do substrato	51
4.2	Atividades enzimáticas	52
4.2.1	Celulases	52
4.2.2	Hemicelulases	54
4.3	Açúcares redutores totais	55
4.4	Análise estatística	57
4.5	Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção enzimática celulolítica	57
4.6	Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção enzimática hemicelulolítica	60
4.7	Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção de açúcares redutores totais	62
4.8	Otimização teórica na produção de açúcares redutores totais	64
	Conclusões	66
	Referências	67
	Apêndices	88
APÊNDICE A	Atividades enzimáticas e açúcares redutores totais obtidos no estudo preliminar	89
APÊNDICE B	Anova para as atividades enzimáticas e açúcares redutores totais do estudo preliminar	90
APÊNDICE C	Prova de normalidade para as distribuições das atividades enzimáticas e açúcares redutores totais do estudo preliminar	91
APÊNDICE D	Atividades enzimáticas e Açúcares redutores obtidos na Triagem	92
APÊNDICE E	Anova para às atividades enzimáticas e açúcares redutores totais da triagem	93
APÊNDICE F	Açúcares redutores totais obtidos no Planejamento Central Composto	94

INTRODUÇÃO

O crescente uso mundial de energia não renovável está concentrado no petróleo com grande evidência de escassez anunciada, flutuações no preço do barril e excessivas emissões de gases do efeito estufa (MORIN, 2011; LIZARAZU RAMIRO E ALIAGA LORDEMANN, 2013; IPCC, 2014a). Estes gases alteram as condições naturais do globo terrestre como o degelo do Ártico, aumento da temperatura média e do nível do mar e maior acumulação da concentração de CO₂ na atmosfera, desencadeando modificações negativas em diversos ecossistemas (NASA, 2014; BP, 2015; NASA, 2016a; NASA, 2016b).

No ano de 2013, a energia primária¹ usada no mundo foi ao redor de 12,6 bilhões de toe² (2,3% maior em relação ao registro do ano anterior), das quais 33% correspondeu ao petróleo, 30% ao carvão, 24% ao gás, 7% às hidroelétricas, 4% às centrais nucleares e 2% à energia relacionada com fontes renováveis (BP, 2014). Este cenário, no qual 87% da energia que suporta as necessidades atuais é de origem fóssil, tem guiado à busca de novos requerimentos para diversificar a matriz energética tradicional, sugerindo alternativas baseadas em fontes renováveis não exploradas ou não convencionais para reduzir o uso de matérias-primas de origem mineral.

Os biocombustíveis como o bioetanol, biodiesel, biometano e biohidrogênio são compostos produzidos a partir de recursos biológicos que estão substituindo gradativamente os combustíveis fósseis com o objetivo de atenuar os prejuízos causados pelo uso deles (FAO, 2008). No caso de obtenção de bioetanol, a biomassa usada é considerada renovável, abundante e disponível, mas em alguns casos, usam-se espécies, como o milho, que competem com o destino de alimentação, tornando alguns dos processos de produção de bioetanol ambientalmente e socialmente não sustentáveis (BALAT, 2011; JANSSEN; RUTZ, 2011; SARKAR et al., 2012). Portanto, o desafio presente está focado na procura de opções baseadas no aproveitamento de subprodutos lignocelulósicos de cadeias produtivas estabelecidas que permitam a conversão do material em bioetanol, e que não competem com culturas alimentícias (NAIK et al., 2010; LIMAYEM; RICKE, 2012).

Dependendo do tipo de precursor usado no processo de obtenção de bioetanol, este biocombustível pode ser classificado em três grupos: o bioetanol de primeira geração (1G), que corresponde ao uso de matérias-primas sacarinas, amiláceas ou que apresentam frutose; o bioetanol de segunda geração (2G), quando os carboidratos dos materiais estão dispostos em macromoléculas ou polímeros com estrutura química complexa; e o bioetanol de terceira geração (3G), o qual provêm de algas ou microalgas; escolhidas por sua alta

¹ A energia primária é definida como a forma de energia disponível na natureza que não tem sido convertida.

² Unidade de energia, cuja abreviação representa tonelada equivalente de petróleo, 1 toe = 41,87 GJ.

taxa de crescimento e por ter uma estrutura química ausente de lignina, fazendo que o processo de sacarificação seja mais simples e favorável (JANSEN, 2013; BAEYENS et al., 2015; LEE; LEE, 2016).

Especificamente para produzir bioetanol de segunda geração, têm sido realizados trabalhos com diversas matérias-primas e diferentes configurações de processos de pré-tratamento e hidrólise (MENON; RAO, 2012). A palha de trigo, a palha de arroz, o bagaço de sorgo sacarino, o bagaço de cana-de-açúcar e o sabugo de milho são alguns exemplos de biomassas lignocelulósicas, atrativas por serem resíduos agroindustriais, que têm se avaliado como precursores para a produção do biocombustível (THANGAVELU; AHMED; ANI, 2016). No entanto, existem resíduos não avaliados que podem ser utilizados, de acordo com sua composição lignocelulósica, como matéria-prima dentro do esquema da sacarificação da celulose, entre eles os que provêm da floricultura.

A floricultura mundial no ano de 2013 alcançou 20,6 bilhões de dólares nas exportações totais, aumentando 41,7% na última década com a participação principal dos Países Baixos, Colômbia e Equador no mercado global, no entanto, nações como Brasil, México e Índia têm mostrado crescimento na produção e demanda interna (RIJSWICK, 2015). A atividade de produção de flores e plantas ornamentais é um dos principais segmentos do agronegócio brasileiro, atingindo em 2014 um valor transacionado de 5,64 bilhões de reais no mercado de consumo local e experimentando um crescimento de produtores de 13% entre os anos 2008 e 2013 (SEBRAE, 2013; SEBRAE, 2015a). Em 2013, 13.460 hectares foram cultivados com diferentes espécies no Brasil e estima-se que os resíduos vegetais gerados abrangem 1 tonelada por hectare de flor colhida, os quais geralmente são dispostos em aterros sanitários, outros são queimados e alguns servem como substrato para compostagem (SÁNCHEZ., 2005; SEBRAE, 2015b; MINAGRICULTURA, 2016).

O maior desafio no uso de biomassas lignocelulósicas para obter bioetanol de segunda geração, está focado na maximização da exposição da celulose, minimizar a sua cristalinidade e remover ou separar a maior quantidade de lignina e hemiceluloses da estrutura química do material, a fim de melhorar o rendimento da sacarificação (BHIKHU; SHAH, 2015). Para isto, existem vários processos usados, entre eles a hidrólise química e a enzimática, na qual, as enzimas produzidas por diferentes micro-organismos procedem com o desdobramento de moléculas maiores, proporcionando uma tecnologia eficiente desde o ponto de vista energético (WAN; LI, 2012; BARRETO; MENEZES, 2015; GUTIÉRREZ-ROJAS; MORENO-SARMIENTO; MONTROYA, 2015; NARANJO et al., 2016).

Existe uma grande variedade de fungos que atuam como catalisadores orgânicos sobre o complexo lignocelulósico, mas apenas uns poucos têm a capacidade de sintetizar o grupo de enzimas completo, capaz de mineralizar a lignina e desdobrar a celulose e as hemiceluloses em moléculas mais simples (KURT; BUYUKALACA, 2010). Este tipo de micro-organismos são conhecidos como fungos de podridão branca, entre os quais, pode se

nomear ao *Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus* (KHALIL et al., 2011). O *P. ostreatus* é um cogumelo que na sua forma frutificada é comestível, mas na sua etapa micelial tem a habilidade de ser considerado um fungo degradador de lignina e, em menor proporção, de celulase e hemicelulases (RADHIKA; JEBAPRIYA; GNANADOSS, 2013).

O complexo lignocelulósico é o componente com maior abundância da biomassa vegetal, corresponde aproximadamente à metade ou até 90% da massa (em base seca) das células vegetais; os principais constituintes são a celulose, hemiceluloses e lignina e em menor proporção a pectina, proteínas, cinzas, sais e minerais (BARRETO; MENEZES, 2015; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015). As três primeiras macromoléculas estão unidas entre si por ligações não covalentes e covalentes em uma matriz amorfa, a qual exibe diferentes características relacionadas com o tipo, as partes e a idade do vegetal (DYK; PLETSCHKE, 2012; MENON; RAO, 2012).

As enzimas responsáveis pela hidrólise da celulose são a endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase. A primeira, inicia a conversão atacando aleatoriamente as partes amorfas da celulose gerando extremos redutores e não redutores, os quais, são aproveitados pela exoglicanase para produzir celobiose. O processo de hidrólise termina com a ação da β -glicosidase, encarregada de quebrar a celobiose em duas moléculas de glicose (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013). Por outro lado, a sacarificação biológica da xilana (principal componente das hemiceluloses) ajusta-se a um comportamento sinérgico de dois tipos de enzimas; aquelas que iniciam atacando internamente a cadeia principal para liberar oligossacarídeos e xilobiose (endoxilanase) e a β -xilosidase, responsável da divisão do dímero em xilose (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

Estas enzimas possuem grande importância biotecnológica devido a sua aplicação biotecnológica: no caso das celulasas, o uso está presente na indústria do papel (para melhorar a flexibilidade das fibras), dos têxteis (para remover microfibras e dar uma aparência lisa e brilhante), dos detergentes de roupa (para modificar a estrutura das fibras e suavizar o algodão), dos sucos (atuando na hidrólise da pectina) e do bioetanol (LI et al., 2012). As aplicações das hemicelulases, estão relacionadas com a indústria do papel (na degradação de glicomanane para aumentar o brilho e melhorar a eficiência do branqueamento do papel), do pão (fornecendo estabilidade à massa), da cerveja (melhorando a filtração), bioetanol (fermentação de pentoses) e alimento animal (degradação de fibra para dietas) (SANCHEZ; DEMAINE, 2011).

De acordo com pesquisas anteriores, a rota enzimática comum para obter ART, consiste de duas etapas sucessivas que operam por separado; a primeira, relacionada com a síntese das enzimas e a segunda, referida ao uso dessas enzimas na sacarificação da biomassa (ALVIRA et al., 2010; RABELO, 2010; RIAÑO et al., 2010; HUMBIRD et al., 2011; RODRÍGUEZ, 2013; RODRIGUES et al., 2015). A diferença do presente trabalho com os convencionais, está focada na proposta e avaliação de um processo simultâneo que

envolveu a síntese de enzimas hemi(celulolíticas) e a produção de ART em uma só etapa a partir de resíduos de alstroeméria por meio do crescimento de *P. ostreatus* usando a metodologia de fermentação em estado sólido (FES).

Propor a síntese simultânea de enzimas e ART, está justificada pela inserção da ideia de integralidade de processos, já que é minimizado o número das etapas, e portanto o consumo energético; um exemplo desse conceito é hidrólisar e fermentar biomassas para obter bioetanol em um só passo, conseguindo rendimentos próximos aos evidenciados no processo comum (ZHANG; BAEYENS; TAN, 2012) Além disso, a seleção da FES fundamenta-se principalmente por incluir baixos custos energéticos de esterilização, volumes menores, fácil aeração, não precisar de agitação, alta estabilidade do sistema, ambiente menos favorável para crescimento de bactérias e pequeno risco de contaminação em comparação com a fermentação submersa (SINGHANIA et al., 2009; YOON et al., 2014).

CAPÍTULO 1 – OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6 para produzir de forma simultânea enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais a partir dos resíduos vegetais (caules e folhas) da flor *Alstroemeria sp.* usando fermentação em estado sólido.

1.2 Objetivos específicos

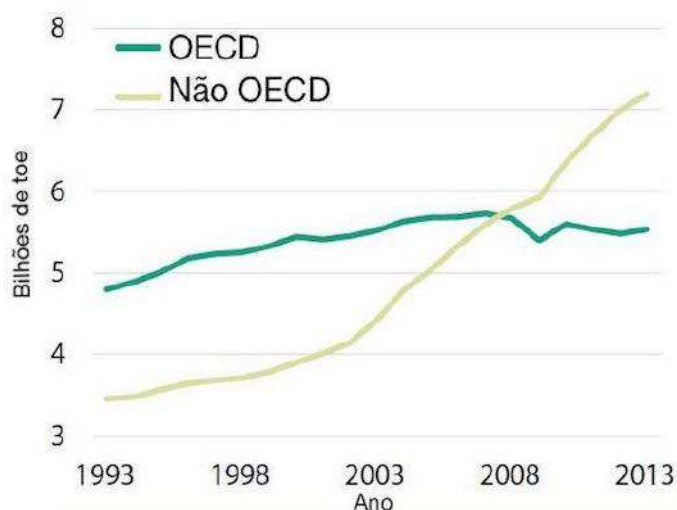
- Caracterizar físico-quimicamente os caules e folhas da flor *Alstroemeria sp.*.
- Verificar mediante um estudo univariado, usando o tempo como variável independente, a produção paralela de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais a partir dos resíduos de alstroeméria por meio do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6 em fermentação em estado sólido.
- Avaliar por meio de um planejamento multivariado, os efeitos da concentração de substrato, temperatura, e tempo sobre a produção simultânea de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais a partir dos resíduos de alstroeméria, usando fermentação em estado sólido para o crescimento do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6.
- Determinar com ajuda da otimização estatística, as melhores condições de tempo, temperatura e concentração de substrato na fermentação sólida usando os resíduos florais para a obtenção de açúcares redutores totais através do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Matriz energética

Hoje em dia, é indubitável que a energia que necessita a raça humana para desenvolver a maioria das atividades cotidianas cresce e mantém uma estreita relação com a taxa de crescimento da população (BP, 2013; SENER, 2015; UN, 2014; WB, 2016). O uso de energia nos anos 2014 e 2013 teve um incremento anual de 2,3%, maior que aquele reportado para 2012 que foi de 1,8%. Além disso, desde há 10 anos a evolução energética mundial tem mudado; as nações em desenvolvimento (economias fora da OECD¹) começaram um período de rápido crescimento econômico, entre elas os países pertencentes ao BRICS², os quais a partir de 2008 têm sido responsáveis por dominar o crescimento do consumo energético mundial superando aos países da OECD (RÜHL, 2014). Esta dinâmica pode ser observada na Figura 1, a qual mostra que a quantidade total de energia primária consumida pela humanidade no ano 2013 foi de 12,6 bilhões de toe e que os países pertencentes à OECD mantiveram um baixo crescimento do consumo nos últimos 20 anos (12%), diferentemente dos países não-OECD que exibiram 105% de ascensão no consumo da energia.

Figura 1: Consumo mundial de energia primária entre os anos 1993 e 2013 dos países da OECD e não-OECD



Fonte: Adaptado de IEA (2016) e Rühl (2014)

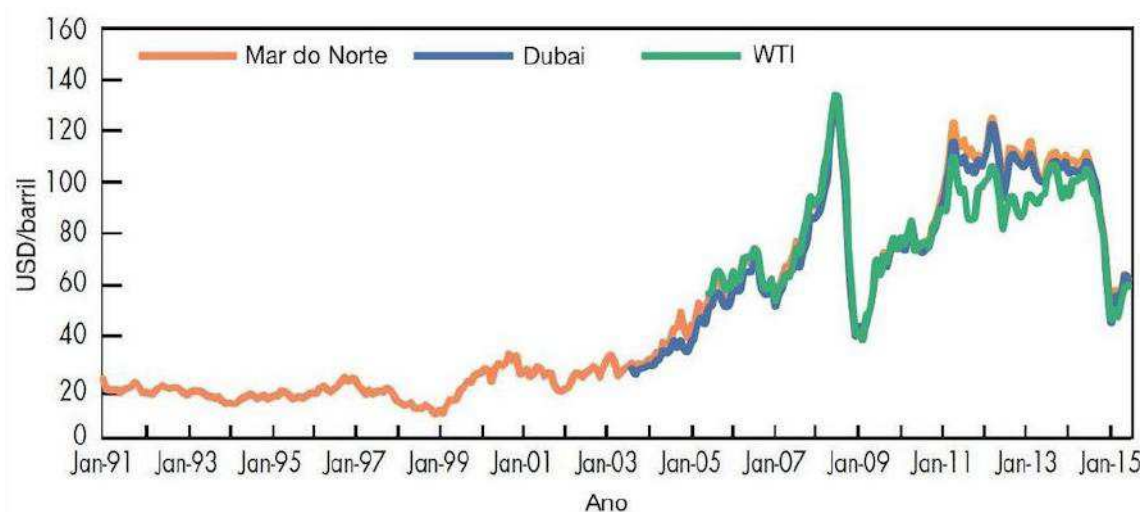
¹ Organização Internacional para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, formada por 34 países desenvolvidos que apresentam um elevado Índice de Desenvolvimento Humano e alto Produto Interno Bruto per Capita (OECD, 2016).

² Aliança política de cooperação entre Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul (BRICS, 2016).

Além da descrição prévia, a matriz mundial energética pode ser analisada pelo tipo de fonte que permite a sua produção; situando ao petróleo, ao carvão mineral e ao gás como os principais recursos de origem fóssil, os quais cobriram 81,4% do fornecimento da energia global em 2013 (31,1%, 28,9% e 21,4% respectivamente), apontando uma clara centralização da matriz (IEA, 2016). No entanto, em países como Brasil a distribuição dos recursos citados muda, de tal forma que a participação do petróleo foi de 39,3%, do gás natural 12,8% e do carvão mineral 5,6%, assim, às fontes não renováveis aportaram 59% à matriz energética brasileira (incluindo 1,3% gerado por centrais nucleares) e as renováveis 41% (MME, 2014).

Consequência dos aspetos mencionados e alguns próprios do mercado internacional, os preços médios das fontes de energia têm sofrido variações nos últimos 15 anos. O petróleo, por exemplo (Figura 2), registrou um custo de 25 USD/barril em 1991, passando por um máximo de 138 USD em 2008 e um mínimo de 10 USD no ano 2009, até chegar ao valor de 25 USD em janeiro de 2016 e 40 USD em abril do mesmo ano (IEA, 2016; WB, 2015). Esta variabilidade representa uma ameaça para a economia mundial e tem influenciado de forma negativa economias emergentes como a colombiana, afetando a valorização da moeda e a inversão pública (REVISTA SEMANA, 2015; PERIÓDICO EL ECONOMISTA, 2016).

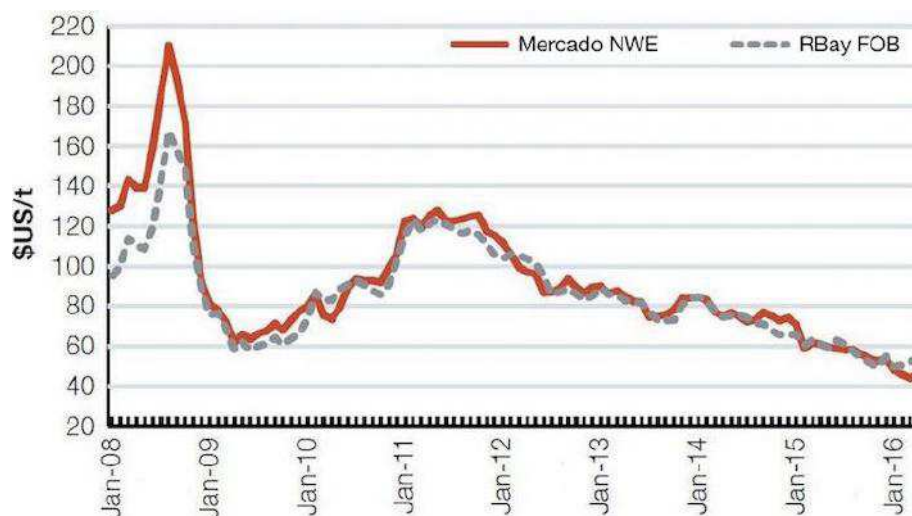
Figura 2: Dinâmica mundial do preço do petróleo nos últimos 25 anos



Fonte: Adaptado de IEA (2016)

O mercado do carvão mineral, nomeado o combustível da industrialização, e considerado indicador de saúde econômica, registrou preço mínimo de 31,65 USD/t em 2002 e tem apresentado tendência de lenta queda no preço desde 2008, ano no qual o carvão tipo "steam" exibiu o máximo preço de acordo com o mercado da Europa noroeste (NWE) alcançando 210 USD/t, até 2016 (50 USD/t) (Figura 3) (IHS, 2014; BP, 2015).

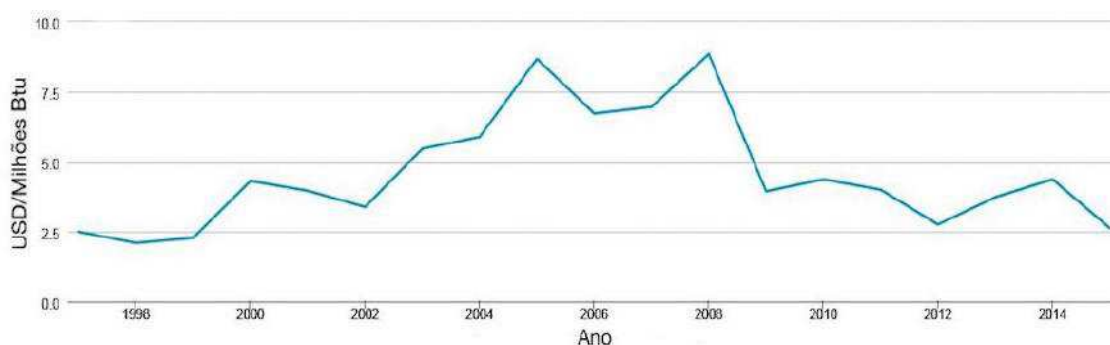
Figura 3: Dinâmica mundial do preço do carvão tipo "steam" nos últimos 10 anos



Fonte: Adaptado de IHS (2014)

De forma similar ao petróleo e ao carvão, o preço do gás natural depende do mercado, recebendo classificações através de índices, como o "Henry Hub" para o continente americano. No entanto, diferentemente das outras fontes, o preço está quantificado por unidades definidas pela capacidade de energia que produz-se (EIA, 2016). A Figura 4 mostra a evolução dos custos do gás natural nas últimas duas décadas, sendo que em 2008 o preço mais alto atingido coincide com os valores máximos registrados para o petróleo e para o carvão.

Figura 4: Dinâmica mundial do preço de gás natural nos últimos 20 anos



Fonte: Adaptado de EIA (2016)

A partir de 2007 o consumo global anual de petróleo superou a produção e em 2013 a taxa de crescimento de consumo ultrapassou a taxa de produção, deixando como consequência o declive das reservas, estimando ao final de 2014 que as reservas totais de petróleo durarão 52,5 anos (RÜHL, 2014; BP, 2015). O panorama para países latino-

americanos como Brasil e Colômbia não é alentador, já que as reservas estão prognosticadas para perdurar 18,9 e 6,8 anos respectivamente (BP, 2015). O gás natural apresenta o mesmo cenário do petróleo, a previsão das reservas será de 54,1 anos, no entanto as quantidades produzidas até 2014 satisfizeram o consumo mundial (BP, 2015). O carvão mineral é o único recurso dos três que permanecerá por mais de 100 anos, não obstante classifica-se como uma fonte irregular no mercado devido ao fato de que entre os anos 2004 e 2010 o consumo era mais alto que a oferta, mas entre 2011 e 2014 a relação inverteu-se, conservando a mesma tendência que o petróleo (BP, 2015).

Finalmente, revela-se outra sequela do uso das fontes não renováveis citadas; as emissões de dióxido de carbono produzidas pela combustão ao longo dos últimos quatro decênios. Em 1973 as emissões totais foram de aproximadamente 16 Gt, onde a principal contribuição foi o petróleo, com 50 %, seguido do carvão mineral com 30 %, e por último, o gás natural (IEA, 2016). A relação direta das emissões de gases do efeito estufa com o incremento da temperatura e a mudança climática mundial deu-se a conhecer graças aos relatórios técnicos, com uma estrita base científica, publicados pelo Painel Intergovernamental da Mudança Climática, assim, hoje em dia não há dúvida que o uso do petróleo, carvão e gás contribuem com as problemáticas ambientais vinculadas ao Aquecimento Global (IPCC, 2013; IPCC, 2014b).

2.2 Biomassa

Em meados dos anos 1800, o uso de forma direta da biomassa representava 85% do consumo mundial de energia e, praticamente, era a única forma usada pelo homem, mas, seu uso na forma primitiva era frequentemente predatória, causava desmatamento e degradação do solo e, portanto, desaconselhável, por essa razão tornou-se o combustível dos mais pobres e subdesenvolvidos (GOLDEMBERG, 2009). No entanto, durante o fim do século 18, a Revolução Industrial iniciou o uso das máquinas a vapor, maximizando a importância do carvão e deixando de lado o uso para aquecimento residencial (UNDP, 2000).

A biomassa é uma fonte energética originada por processos bioquímicos espontâneos ou provocados que ocorrem em materiais orgânicos próprios do reino vegetal, animal e algas; atuando como potenciais acumuladores de energia (LUQUE; CAMPELO; CLARK, 2011; VASSILEV; VASSILEVA, 2016). A palavra biomassa, em termos energéticos, é aplicada a qualquer recurso biológico dos quais se possa obter energia; o aproveitamento pode se fazer de modo direto, quando usa-se a matéria orgânica na sua forma natural, como a madeira para lenha, e de forma indireta, quando o material orgânico sofre algum tipo de processo como, a produção de biodiesel a partir de plantas oleaginosas (TILLMAN, 1978; KNOTHE; KRAHL; GERPEN, 2005). A principal característica da biomassa vegetal, é a utilização da energia solar mediante o processo de fotossíntese, a qual permite desenvolver a matriz

vegetal com alta produtividade e alta diversidade estrutural e de espécies; estabelecendo grandes perspectivas de crescimento da demanda desse tipo de culturas (LEÓN, 2007; MONTEIRO et al., 2008).

A biomassa pode ser classificada em dois grandes grupos: a partir de cultivos energéticos e residual, o primeiro relacionado com culturas agro-industriais como oleaginosas e alcoolificas (BRAVO, 2007). A biomassa residual faz referência aos subprodutos provenientes de atividades agropecuárias, podem ser exemplos desta categoria os resíduos animais, agrícolas, florestais, domésticos e industriais (IDAE, 2007).

2.3 Bioetanol

A panorâmica da matriz energética descrita na seção 2.1 conduziu a uma revolução energética, dando origem à consolidação da Bioenergia, a qual obtém-se da biomassa mediante sua conversão em formas úteis de energia como os biocombustíveis (KAMMEN, 2004). Os biocombustíveis têm sido a melhor opção para substituir os combustíveis fósseis; no caso da substituição da gasolina, o bioetanol é a alternativa mais adequada visto que oferece características similares às da gasolina (Tabela 1) (FAO, 2008; THANGAVELU; AHMED; ANI, 2016).

Tabela 1: Propriedades químicas e físicas do etanol, metanol e gasolina.

Propriedade	Unidade	Etanol	Metanol	Gasolina
Massa Molecular	g/mol	46,068	32,042	(Média) 114
Densidade relativa (20°C)	–	0,7893	0,7914	0,739
Ponto de ebulição	K	351,4	337,6	300 - 518
Entalpia de vaporização	kJ/kg	918,64	1168,15	314,01
Poder calorífico (Baixo - Alto)	GJ/m ³	20,62 - 23,69	16,16 - 18,11	30,94 - 34,00
Pressão de cálculo em tanque	kPa	103,42	103,42	103,42
Viscosidade (25°C)	mPa.s	1,074	0,544	0,56
Ponto de fulgor	K	287	284	228
Limites de inflamabilidade	%	3,3 - 19	6,7 - 36	1,3 - 7,6
Autoignição	K	636	733	523 - 733
Bico de temperatura de chama	K	2193	2143	2303
Octanagem	–	100 - 129	–	87 - 100

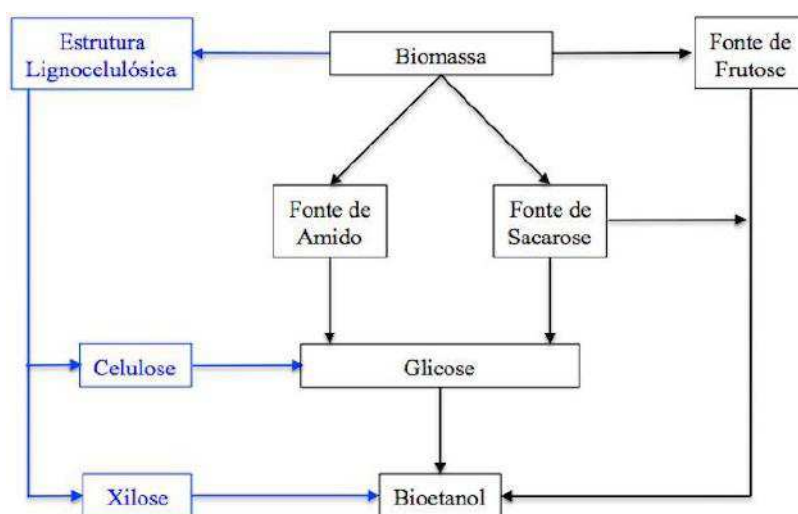
Fonte: Adaptado de Arshadi e Grundberg (2011), Balat (2011), Lide, Haynes e Bruno (2014), PETROBRAS (2014).

A principal utilização do bioetanol tem sido para o transporte terrestre, sob a denominação de combustível ou aditivo de motores de combustão interna (BAEYENS et al., 2015). O Brasil é considerado o pioneiro no uso de bioetanol em motores, nessa nação o etanol é comercializado de duas formas: fazendo parte de misturas com gasolina, em porcentual mínimo de 27% de etanol anidro, e como combustível hidratado para ser usado diretamente nos veículos (IEA, 2015). Em países como Colômbia e Estados Unidos

o bioetanol está sendo usado em misturas com gasolina em proporções entre 8% - 10% e 10% - 85% respectivamente (COLOMBIA, 2011; BAEYENS et al., 2015).

Para obter bioetanol, pode se partir de qualquer fonte que apresente carboidratos de origem vegetal (Figura 5); se eles são sacarinos, amiláceos ou apresentam frutose, o bioetanol produzido é conhecido como de primeira geração, 1G, e se os carboidratos estão em macromoléculas ou polímeros com estrutura química complexa, o bioetanol é designado como de segunda geração, 2G (JANSEN, 2013). Ademais das duas categorias, há outro tipo de biomassa renovável que é possível usar para obter bioetanol (de terceira geração, 3G), dito material são as algas; escolhidas por sua alta taxa de crescimento e por ter estrutura química ausente de lignina, o qual faz que o processo de sacarificação seja mais simples e favorável (LEE; LEE, 2016).

Figura 5: Diferentes fontes de carboidratos usadas para a produção de bioetanol de primeira e segunda geração



Fonte: Elaboração própria

Os resíduos agroindustriais são fontes para obter bioetanol 2G, desejáveis pela abundância e baixo custo, mas apresentando complexidade nas rotas de remoção ou separação da lignina e hemiceluloses da estrutura química e de sacarificação da celulose; permitindo a liberação de carboidratos menores como a glicose (JUTAKANOKI et al., 2012). A frutose pode ser encontrada em frutas, no mel, em alguns cereais e plantas; talvez, o processo que melhor corresponde ao segundo grupo é aquele de fazer vinho, conhecido como o mais antigo para a obtenção de etanol sem usar pré-tratamento (ARGOTE-V. et al., 2015; ATKINS; JONES, 2011).

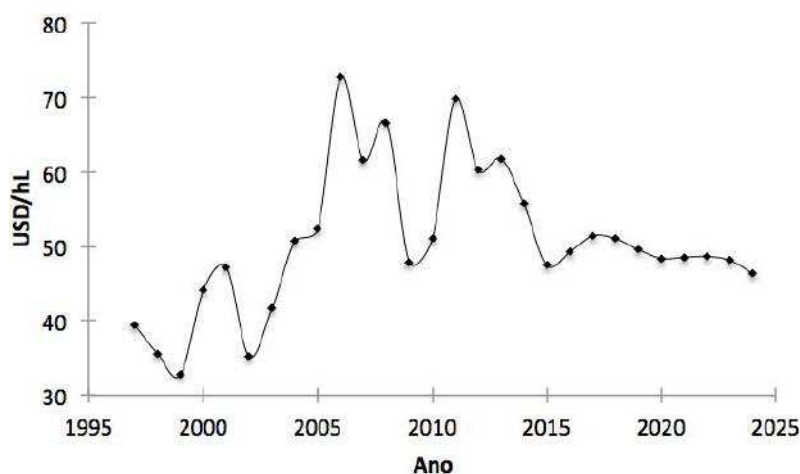
As fontes que contêm sacarose são as mais abundantes e apresentam o processo mais simples para obter bioetanol 1G, alguns exemplos são a cana-de-açúcar, o sorgo sacarino e a beterraba sacarina (SILVA et al., 2012). Os tubérculos e o milho são espécies

que contêm dentro da sua estrutura amido, o qual também tem sido usado industrialmente para produzir bioetanol 1G habitualmente através de sacarificação enzimática (MOJOVIĆ et al., 2009).

A geração global de bioetanol em 2008 foi de 84,12 bilhões de litros, em 2013 de 108 GL e estima-se que para o 2024 a produção seja de 134,5 GL; exibindo uma taxa de incremento de 3,5% entre os anos 2012 e 2013 e de 2,2% anual projetado entre 2014 e 2024, demonstrando sem dúvida que a produção deste biocombustível líquido está em crescimento e continuará assim pelos próximos 10 anos (OECD-FAO, 2015b). Os casos com maior sucesso na produção industrial de bioetanol 1G são os Estados Unidos e o Brasil, os quais têm mantido uma participação mundial nos últimos 5 anos ao redor de 58,8% (a partir de milho) e 26,7% (a partir de cana-de-açúcar) respectivamente (MME, 2015b; USDE, 2016a; USDE, 2016b).

Em conjunção com a queda nos preços do petróleo cru, os preços do bioetanol no mercado mundial também estão projetados para decrescer a partir de 2017 até 2024 (Figura 6), ainda assim, os preços não alcançarão os mínimos registrados em 1999 e 2002 (32,7 e 35,2USD/hL respectivamente). Adicionalmente, é importante mencionar que um dos custos máximo para o biocombustível (66,5 USD/L) fixou-se no mesmo ano em que o petróleo atingiu o seu pico (OECD-FAO, 2015b).

Figura 6: Dinâmica do preço mundial do Bioetanol



Fonte: Adaptado de OECD-FAO (2015a)

Em termos de emissões de gases do efeito estufa, os biocombustíveis possuem a vantagem, com respeito aos de origem mineral, de reduzir a produção desses gases que modificam o forçamento radiativo³ alterando a temperatura do globo terrestre, inclusive, o

³ O forçamento radiativo é um fenômeno de balanço entre a radiação solar de onda curta que entra à atmosfera, raios ultravioletas, e a radiação terrestre emitida de onda larga saliente, raios infravermelhos (GAO, 2011).

balanço do processo global desde a produção até combustão dos biocombustíveis pode ser considerado como carbono neutro (RUTZ; JANSSEN, 2007). Na América Latina, o Brasil é um país referência por inserir dentro da sua matriz energética o bioetanol, o qual tem outorgado resultados bem-sucedidos; como contar com parâmetros de emissões de dióxido de carbono equivalente ($\text{CO}_2\text{-eq}$)⁴ menores que a média mundial e países desenvolvidos. Assim, em termos de $\text{tCO}_2\text{-eq/toe}$ de energia consumida, a média do Brasil ficou em 1,59 para o ano de 2014, enquanto que nos países da OECD foi de 2,31 e no mundo 2,37 para 2012 (MME, 2015b).

Outros índices associados com o uso de bioetanol e biodiesel no Brasil marcaram que a influência dos GEE, em termos de $\text{CO}_2\text{-eq}$, sobre a economia foi 32% menor que a economia europeia, 53% menor que a economia americana e 73% menor que a economia chinesa. Além disso, cada brasileiro, produzindo e consumindo energia em 2014, emitiu em média 2,4 $\text{tCO}_2\text{-eq}$, ou seja, cerca de 7 vezes menos que um americano e 3 vezes menos que emite um europeu ou um chinês (MME, 2015a).

Além do enquadramento feito para o bioetanol, é imprescindível mencionar que ele possui a vantagem de ser gerado a partir de biomassa, a qual é considerada limpa, renovável, abundante e disponível. Não obstante, o bioetanol 1G tem duas aparentes inconveniências: exercer pressão sobre espécies destinadas para alimento e não contar com um fornecimento uniforme da matéria-prima devido ao ciclo natural de crescimento das espécies (número de safras anuais), assim, alguns dos processos de produção podem se converter em ambiental, técnica e socialmente não sustentáveis (BALAT, 2011; JANSSEN; RUTZ, 2011; SARKAR et al., 2012; MME, 2016). Em resposta à presumível ameaça, o bioetanol 2G surgiu como decorrência, ele não só liberou o benefício de espécies comprometidas com a segurança alimentar, senão que aproveita as grandes quantidades e propriedades que os subprodutos lignocelulósicos de cadeias produtivas estabelecidas têm (NAIK et al., 2010).

De maneira genérica, o bioetanol 2G pode ser produzido a partir de açúcares fermentáveis resultantes dos processos de hidrólise da celulose e hemiceluloses, macromoléculas que compõem em maior proporção a estrutura da parede celular vegetal (MENON; RAO, 2012). As matéria-primas mais atrativas para a obtenção do bioálcool são os subprodutos ou resíduos agroindustriais, devido a sua abundância e baixo custo, deste modo, têm sido reconhecidas diversas fontes potenciais para servir de precursores para bioetanol 2G, entre eles a extensa literatura reporta vários trabalhos científicos sobre a utilização da palha de arroz, palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros (BUSSAMRA; FREITAS; COSTA, 2015; GUPTA; VERMA, 2015; KIM et al., 2016; SINGH; SRIVASTAVA; SHUKLA, 2016).

⁴ Medida internacional que expressa a quantidade de gases efeito estufa emitidos em termos equivalentes de dióxido de carbono (IPCC, 2006).

Independentemente da fonte iniciadora, os processos que recentemente têm se estabelecido para a manufatura de bioetanol 2G tomam um esquema genérico de produção, que inclui as etapas de preparação do material, pré-tratamento, hidrólise (sacarificação), fermentação de hidrolisados (hexoses ou pentoses) e purificação (ARSHADI; GRUNDBERG, 2011). A primeira fase consiste em adequar o material através de lavagem e secagem a fim de retirar algumas impurezas e armazenar a matéria-prima, a seguir está o pré-tratamento, que deixa de ser um passo simples, já que nele pretende-se separar os compostos que constituem a estrutura lignocelulósica, diminuir a cristalinidade da celulose e incrementar a área superficial através de métodos mecânicos como a moagem ou ultrassom, térmicos (explosão a vapor), químicos; onde intervêm ácidos, bases, solventes, ozônio ou oxidantes, físico-químicos como a explosão de fibra com amoníaco ou explosão com dióxido de carbono ou biológicos (RIAÑO et al., 2010; PANDEY et al., 2015; WI et al., 2015).

A hidrólise ou sacarificação, é o terceiro procedimento que tem por objetivo desdobrar as moléculas maiores separadas no pré-tratamento em substâncias mais acessíveis para a sua posterior transformação; a liberação de hexoses e pentoses (monossacarídeos que fazem parte dos açúcares redutores totais ou fermentáveis) pode se levar a cabo sob ação de ácidos (diluídos ou concentrados), álcalis, enzimas, líquidos iônicos e rotas termoquímicas (SUN; CHENG, 2002; FENG; CHEN, 2008; MONTEIRO, 2010; KUPIAINEN; AHOLA; TANSKANEN, 2012; ALRUMMAN, 2016).

No entanto, um dos maiores problemas do sistema de produção de bioetanol 2G é a formação de subprodutos durante o pré-tratamento e a hidrólise, os quais podem causar sérias interferências nos procedimentos e influenciar negativamente a fermentação alcoólica. Os inibidores mais estudados devido a sua alta toxicidade em micro-organismos são o furfural, hidroximetil furfural e compostos fenólicos, produtos das reações de desdobramento das hemiceluloses, celulose e lignina respectivamente (BANERJEE; BHATNAGAR; VISWANATHAN, 1981; LASER et al., 2002; GÍRIO et al., 2010; CHANDEL; SINGH; SILVA, 2011; GONÇALVES; SANTOS; MACEDO, 2015).

No mundo, existem indústrias que têm levado a produção do biocombustível 2G em larga escala; a italiana Biochemtex pertencente ao grupo Mossi & Ghisolfi foi a primeira fábrica no mundo (iniciou operações no ano de 2013) que obteve etanol sob o nome comercial ProesaTM, embora a fonte lignocelulósica e o processo usado são desconhecidos (M&G, 2013; BIOCHEMTEX, 2014). Nos Estados Unidos, a IneosBio através da gasificação de biomassa não especificada obtém gás de síntese (produto intermediário) e posteriormente o converte em bioetanol (INEOSBIO, 2015).

No Brasil, a Raízen em parceria com a Logen Corporation começaram operações em novembro de 2014. Atualmente a produção de bioetanol 2G pela empresa é de 40 ML/ano, o processo que desenvolve-se é hidrólise enzimática e a matéria-prima usada corresponde a palha e bagaço de cana-de-açúcar; a característica mais relevante desta

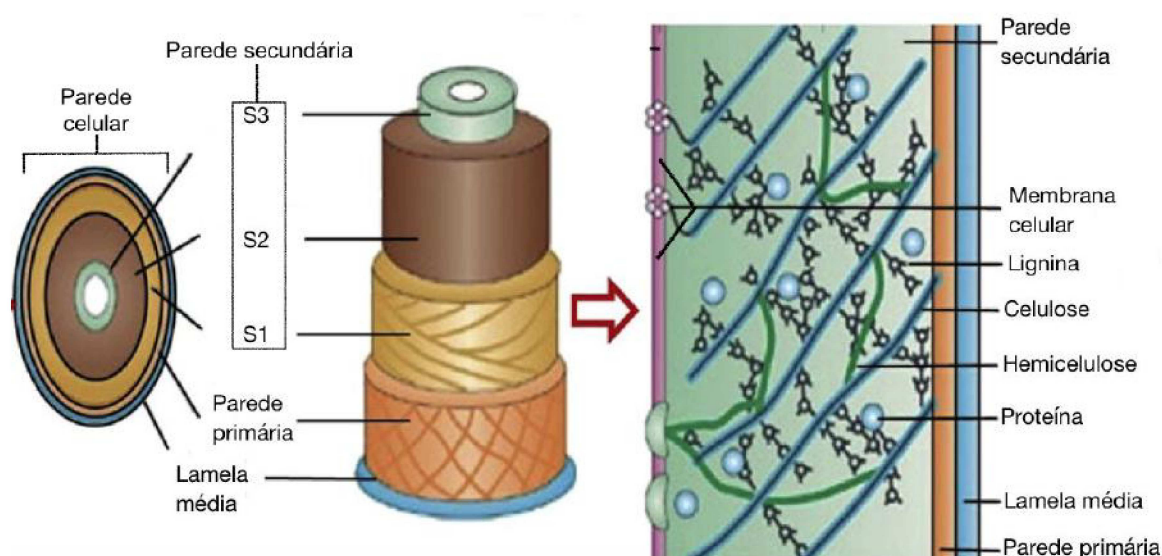
indústria constitui-se na aplicação do conceito da biorrefinaria, já que a mesma produz também bioetanol 1G e açúcar a partir de cana (RAÍZEN, 2014).

Por último, é oportuno indicar que além de produzir o biocombustível pelo caminho convencional, vêm se desenvolvendo pesquisas que estão procurando percursos que conduzam à incorporação do conceito de integralidade das etapas do processo global, a fim de minimizar o número de passos. Um exemplo disso foi combinar a hidrólise e a fermentação enzimáticas num dispositivo único; conseguindo rendimentos próximos aos evidenciados no processo de etapas separadas (ZHANG; BAEYENS; TAN, 2012). Por conseguinte, o desafio de fusão de fases deverá ser levado em consideração no andamento de novas pesquisas, até atingir a produção do bioetanol no menor número de processos (OKAMOTO et al., 2011).

2.4 Estrutura lignocelulósica

A estrutura lignocelulósica, ou lignocelulose, é o principal componente da biomassa vegetal, representa ao redor da metade ou até 90% do peso seco, das células vegetais. Os principais constituintes da lignocelulose são celulose, hemiceluloses e lignina; e em menor proporção a pectina, proteínas, cinzas, sais e minerais (BARRETO; MENEZES, 2015; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015). As três primeiras macromoléculas estão unidas por ligações covalentes e não covalentes, em uma matriz heterogênea, de composição variável dependendo do tipo, das partes e da idade do vegetal (DYK; PLETSCHE, 2012; MENON; RAO, 2012).

Figura 7: Localização e constituição da estrutura lignocelulósica



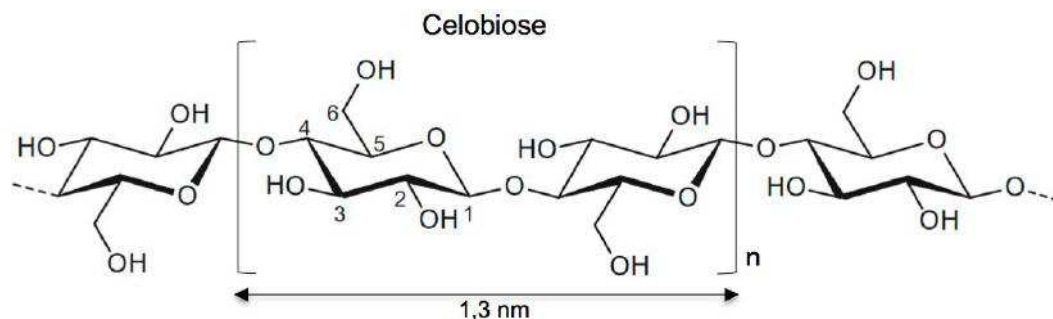
Fonte: Adaptado de Menon e Rao (2012)

A maior parte da estrutura lignocelulósica está localizada na parede da célula vegetal, a qual por sua vez, está dividida em duas: a parede celular primária e a secundária; a primária está constituída pela parede celular de superfície externa e interna e a secundária tem três camadas: a externa (S1), a do meio (S2) e a interna (S3), além disso, entre as paredes das diferentes células há um componente que atua para mantê-las juntas chamado lamela média (Figura 7) (MENON; RAO, 2012).

2.4.1 Celulose

A celulose é o componente que apresenta a maior proporção na biomassa lignocelulósica. É um homopolímero composto de unidades de celobiose (monômero formado por duas moléculas de glicose) unidas ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 8). As moléculas de celobiose estão organizadas de forma linear com forte tendência para formar pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, criando pacotes de moléculas de celulose (microfibras) que por sua vez formam fibras (PINKERT et al., 2009). A celulose está usualmente ordenada em estruturas semicristalinas, as quais são as responsáveis por evitar a solubilização em água sob condições naturais devido à alta estabilidade da ligação β -1,4 reforçada pela formação dos pontes de hidrogênio (AGBOR et al., 2011).

Figura 8: Estrutura química da celulose



Fonte: Adaptado de Heinze (2015)

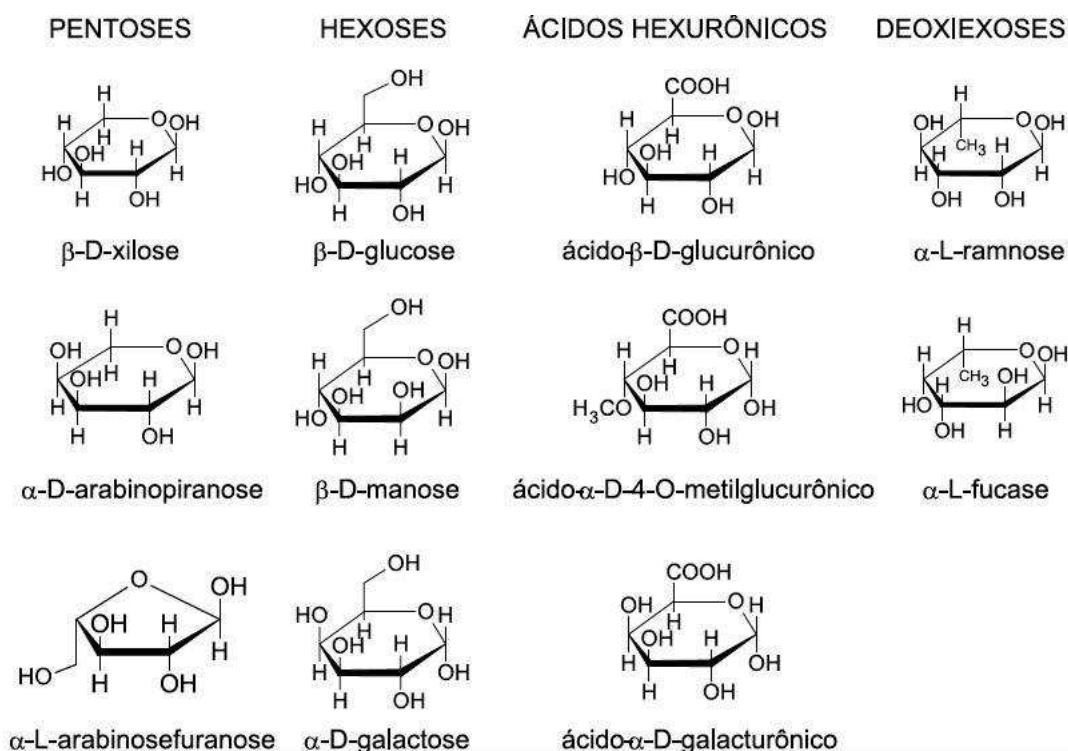
As regiões onde as microfibras estão bem arranjadas são denominadas zonas cristalinas, enquanto as regiões menos ordenadas são chamadas amorfas, assim, quanto mais cristalina a estrutura, mais difícil será degradar a celulose. Além disso, as zonas amorfas são consideradas como os pontos onde as hemiceluloses têm mais possibilidade de acoplar-se à estrutura (ZHANG et al., 2011b).

2.4.2 Hemiceluloses

As hemiceluloses são um conjunto de heteropolímeros compostos de diferentes quantidades de vários monosacarídeos (Figura 9); sendo a xilopirranose (ou simplesmente

xilose), mannose, glicose e galactose os principais componentes. Estes monossacarídeos são abundantes na cadeia principal, e encontrados em menor proporção nas ramificações junto com outros radicais como a arabinopirranose e ácidos urônicos (CHEN, 2014). As hemiceluloses funcionam como armação e material de reserva formando capas independentes na parede celular, sua estabilidade térmica é menor quando comparada da celulose, provavelmente à carência da cristalinidade gerada por sua estrutura heterogênea (SPIRIDON; POPA, 2004).

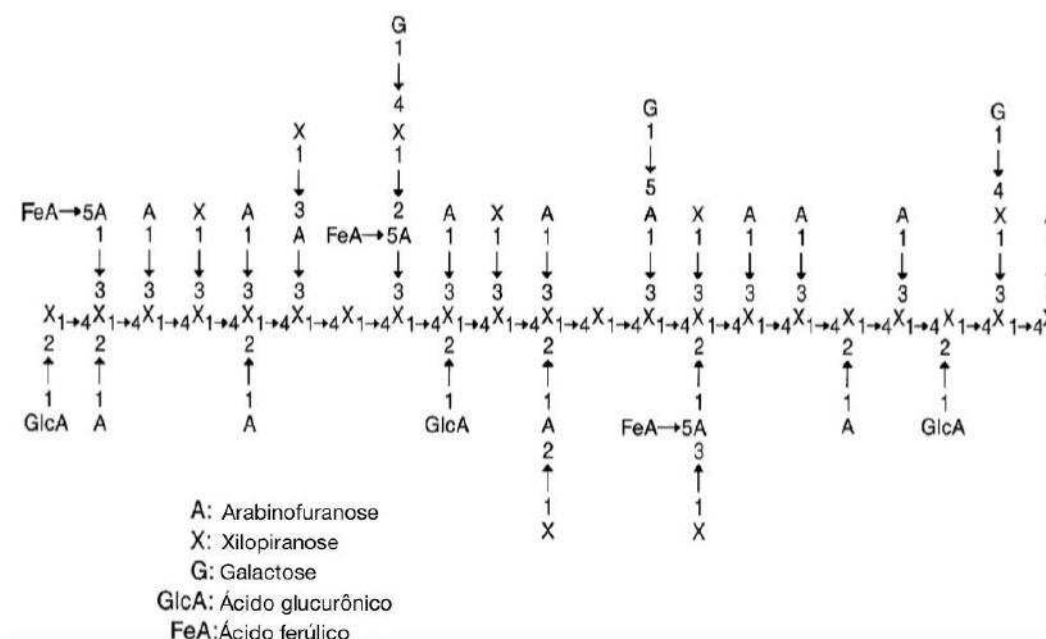
Figura 9: Estrutura química de monossacarídeos que compõem as hemiceluloses



Fonte: (MORAIS; NASCIMENTO; MELO, 2005)

A estrutura química das hemiceluloses pode ser descrita de acordo com arranjos moleculares grandes nomeados unidades das hemiceluloses, que por sua vez estão classificados conforme a prevalência de monossacarídeos presentes nas cadeias principais. A xilana é o principal componente das hemiceluloses presente em quase todas as plantas, e é formada frequentemente por unidades de 1,4- β -D-xilopirranose na cadeia central e ácido β -D-glucurônico e α -arabinofuranose nas ramificações (CHEN, 2014). Como referindo anteriormente, a estrutura da parede celular vegetal depende, dentre outros fatores, da espécie vegetal, assim, as estruturas das xilanas presentes na natureza são diferentes (SAHA, 2003). Na (Figura 10) é mostrada a estrutura da xilana presente no farelo de milho, como exemplo de um heteropolímero que compõe as hemiceluloses.

Figura 10: Estrutura química da xilana em farelo de milho



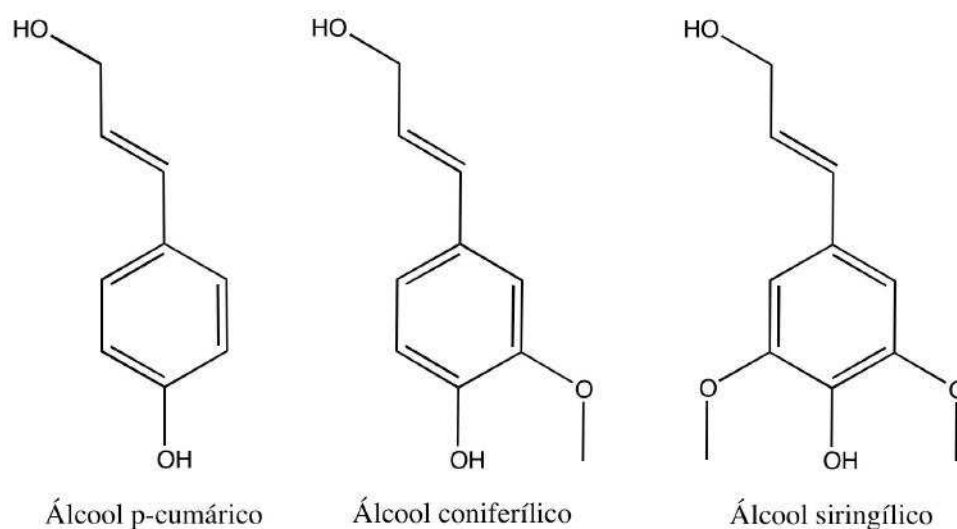
Fonte: Adaptado de Saha (2003) e Saulnier et al. (1995)

2.4.3 Lignina

A lignina é uma matriz amorfa altamente irregular, composta por macromoléculas fenólicas complexas, que por sua vez estão formadas por unidades básicas precursoras, cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 11 (GANDINI; BELGACEM, 2008). Do mesmo modo que as hemiceluloses, a estrutura da lignina varia dependendo da fonte, além disso, sua composição química é consequência do processo utilizado para sua extração (GELLERSTEDT; HENRIKSSON, 2008).

A lignina é a responsável por dar rigidez e força à parede celular das espécies vegetais, fornece hidrofobicidade à parede permitindo uma alta eficiência na condução da água dentro dos tecidos e atua como uma proteção durante os ataques microbianos dificultando a degradação sob condições biológicas (AZCÓN-BIETO; TALÓN, 2008). De acordo a sua natureza, a lignina, é o composto que gera maiores problemas na hora de hidrolisar a celulose e as hemiceluloses, por tanto, nos processos de sacarificação de matérias-primas lignocelulósicas, deve se incluir algum tipo de tratamento que permita remover ou separar a maior parte da lignina, a fim de aumentar a exposição da celulose e as hemiceluloses e contribuir com a melhora da eficiência no processo de hidrólise (PAL et al., 2016).

Figura 11: Estrutura química das unidades básicas da lignina



Fonte: Elaboração própria

Segundo (GANDINI; BELGACEM, 2008), a estrutura lignocelulósica e os teores da sua composição variam de acordo à idade, ao tipo, as condições climáticas e as características próprias do solo. A Tabela 2 descreve a composição química, em base seca, de algumas biomassas que têm sido usadas para a síntese de enzimas lignocelulolíticas e produção de bioetanol 2G.

Tabela 2: Composição lignocelulósica de diferentes resíduos vegetais.

Resíduo	Celulose, %	Hemiceluloses, %	Lignina, %
Palha de trigo	41,3	30,8	7,7
Bagaço de cana-de-açúcar	25 - 45	28 - 32	15 - 25
Bagaço de sorgo sacarino	27,3	14,5	14,3
Palha de sorgo	32 - 35	24 - 27	15 - 21
Palha de arroz	29,2 - 34,7	23,0 - 25,9	17,0 - 19,0
Casca de arroz	28,7 - 35,6	12,0 - 29,3	15,4 - 20,0
Palha de aveia	39,4	27,1	17,5
Palha de milho	39,0	19,1	15,1
Palha de cevada	36,0 - 43,0	24,0 - 33,0	6,3 - 9,8
Casca de cevada	34,0	36,0	19,0
Polpa de café	24,0	8,9	19,4
Caules de algodão	14,4	14,4	21,5
Caules de colza	40,0	14,0	17,0
Caules de girassol	33,0	18,0	23,0
Caules e folhas de rosa	38,4	8,8	9,5
Caules e folhas de crisântemo	49,6	7,5	17,5

Fonte: (MENON; RAO, 2012; MANAVALAN; MANAVALAN; HEESE, 2015; QUEVEDO et al., 2015)

2.5 Floricultura

O mercado mundial da produção de flores cortadas ganhou muita importância depois da primeira guerra mundial, como resultado disso, novas tecnologias foram sendo implementadas no sistema de produção, armazenamento, classificação e mercado das flores, e por consequência houve aumento da oferta (OZKAN et al., 1999). No ano de 2013, as exportações mundiais de flores cortadas, folhagem, plantas vivas e bulbosas totalizaram USD 20,6 bilhões, quase o dobro do registrado em 2003 (USD 12 bilhões). Os Países Baixos dominaram as exportações de flores cortadas, com uma participação no mercado mundial de 52 %, seguido da Colômbia com 15 %, Equador 9 % e Quênia 7% (RIJSWICK, 2015). Durante o mesmo ano, a produção global de plantas ornamentais, onde está incluída a floricultura, foi de aproximadamente 610.000 ha; a Índia contribuiu com 39,7 % da área plantada, China 27,8 % e os Estados Unidos 4,8%, mostrando que os maiores produtores não estão entre os principais exportadores mundiais (GORDON, 2015).

Países como Brasil e México têm incrementado sua produção de flores cortadas, no entanto, não tem aumentado (RIJSWICK, 2015). A floricultura brasileira estabeleceu-se como um dos blocos do agronegócio local mais recentes, movimentados e favoráveis. Comercialmente teve início nos anos 1950 pela iniciativa de imigrantes holandeses no município de Holambra, estado de São Paulo (SP), japoneses em Atibaia (SP) e alemães e poloneses em Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS) (SEBRAE, 2015b).

O mercado brasileiro de espécies ornamentais tem crescido nos últimos dez anos. Em 2010 o valor transacionado foi de USD 2,2 bilhões, representando 15 % de aumento anual, dos quais 32 % pertenceram ao setor de flores de corte (CAETANO et al., 2010). Durante os anos 2008 a 2011 as quantidades ofertadas e os valores de vendas anuais aumentaram em média 9 % e ao redor de 13,5 % respectivamente e espera-se que a taxa no faturamento mantenha 8 % de crescimento para os próximos anos (SEBRAE, 2015b). Em 2013 haviam 13.468 hectares de superfície cultivada dedicadas à floricultura (67% a céu aberto, 28% estufas e 5% telhados) e contava-se com 7800 produtores dedicados a essa lavoura com a região Sudeste como a mais participativa (65,9%), na qual o estado do Rio de Janeiro aportou 6587 hectares (JUNQUEIRA; SILVA, 2014).

Um aspecto especial da floricultura brasileira é sua produção não sazonal; as atividades de plantio e coleta são executadas durante o ano inteiro, garantindo uma produção mensal regular. A geração de resíduos vegetais acompanha o crescimento da floricultura e eles estão compostos em sua maioria por caules e folhas e em pouquíssima proporção por flores estragadas. A produção de ditos resíduos é de aproximadamente 1 tonelada por hectare de flor coletada, os quais comumente são dispostos em aterros sanitários, outros são queimados e alguns usados como substrato para compostagem (CORRÊA, 2006; SÁNCHEZ., 2005).

2.5.1 *Alstroemeria* sp.

Dentro da floricultura mundial, existe uma classe de flores, chamadas bulbosas⁵, que são comercializadas principalmente para paisagismo e jardinagem, as quais exibem grande diversidade nas suas morfologias, crescimento e desenvolvimento biológico e respostas fisiológicas a fatores ambientais (BENSCHOP et al., 2010). No Brasil, as bulbosas mais cultivadas e comercializadas são: alstroeméria (*Alstroemeria* sp.), amarílis (*Hyppastrum* sp.), copo-de-leite (*Zantedeschia* sp.), gladiolo (*Gladiolus grandiflorus*), hemerocale (*Hemerocallis* sp.) e lírio (*Lilium* sp.) (CAETANO et al., 2010).

A alstroeméria (Figura 12) é procedente da América do Sul, está presente no Chile, Peru e Brasil, no entanto, foi a Inglaterra e a Holanda que começaram com a produção de flores de corte em estufas, gerando híbridos com a característica de manter a floração durante todo o ano (JEU et al., 1992; BENSCHOP et al., 2010). No Brasil e Chile existem perto de 40 e 45 espécies de alstroemérias respectivamente, cujos caules podem chegar a atingir até 1 m de altura, sendo que o plantio é feito normalmente em maio, junho ou agosto, quando a temperatura do solo está em torno de 16 °C para favorecer a brotação. A densidade usual é de 3 a 4 plantas/m² de estufa e a produtividade média anual é 200 a 400 caules/m² (CAETANO et al., 2010).

Figura 12: Alstroeméria



Fonte: (COOPERATIVA VEILING HOLAMBRA, 2010)

⁵ As bulbosas são plantas herbáceas e perenes que possuem órgãos subterrâneos para reservar nutrientes.

2.6 Fungos de decomposição branca

A biodegradação completa de materiais lignocelulósicos não depende apenas da natureza do material e das condições ambientais, o processo está intimamente ligado à capacidade degradante de diferentes populações microbianas no caso de hidrólise enzimática (WALDROP; BALSER; FIRESTONE, 2000). A decomposição natural da madeira é basicamente derivada da ação de bactérias e fungos, sendo os últimos os responsáveis pela decomposição da parede celular vegetal lignificada. A habilidade dos fungos para decompor o complexo lignocelulósico deve-se à capacidade de penetração das hifas e a seus sistemas enzimáticos. O sistema hidrolítico, o qual produz hidrolases (celulases e hemicelulases) responsáveis da degradação de polisacarídeos (celulose e hemiceluloses) e o sistema ligninolítico (ligninases), o qual degrada lignina (MÄKELÄ; DONOFRIO; VRIES, 2014).

Os basidiomicetes filamentosos são reconhecidos como os organismos mais efetivos na biodegradação da biomassa vegetal; dentre eles, os fungos de decomposição branca são aqueles que produzem o conjunto completo de enzimas para descompor a celulose, hemiceluloses e lignina de forma simultânea e em alguns casos de forma seletiva sobre a lignina e hemiceluloses mantendo a celulose praticamente intacta (SINGH; GUPTA; ANTHWAL, 2009).

Os basidiomicetes de decomposição branca dependendo da afinidade pelo substrato degradam progressivamente as camadas da parede celular vegetal iniciando pela lignina até atingir as hemiceluloses e as fibras de celulose, alguns exemplos destes fungos são: *Trametes versicolor*, *T. gibbosa*, *T. hirsuta*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, etc (BALDRIAN; VALÁŠKOVÁ, 2008; SINGH; GUPTA; ANTHWAL, 2009; WAN; LI, 2012).

2.6.1 *Pleurotus ostreatus*

O *P. ostreatus* é um basidiomiceto de decomposição branca do qual existem registros de cultivo na Ásia desde o ano 1900. E segundo Miles e Chang (1997) assume-se que os substratos mais usados até os anos 1990 para o crescimento foram serragem, palha de arroz, casca de semente de algodão e sabugo de milho. De acordo com a classificação científica, o *P. ostreatus* é um organismo Eukariota que pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, Classe Agaricomycetes (anteriormente Homobasidiomycetes), Subclasse Agaricomycetidae, Ordem Agaricales, Família Pleurotaceae, Género *Pleurotus* e Espécie *ostreatus* (FRANCE; CAÑUMIR; CORTEZ, 2000; IMA, 2016). O *P. ostreatus* é um cogumelo especial, devido que em sua forma frutificada (Figura 13) é comestível e em sua etapa micelial (Figura 14) tem a habilidade de degradar compostos lignocelulósicos de forma simultânea (FITZPATRICK; MEDINA, 2011).

Figura 13: Corpo de frutificação do fungo *Pleurotus ostreatus*

Fonte: (ISU, 2008)

Figura 14: Etapa micelial do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO6

Fonte: Elaboração própria

A importância de utilizar este fungo é sua aplicação sobre resíduos lignocelulósicos, já que ele é capaz de produzir enzimas que degradam celulose, hemiceluloses e lignina. Outra das aplicações, é que o micélio evidência uma composição nutricional (base seca) de proteína crua 25%, carboidratos totais 58%, fibra 11,5%, gordura 1,6% e algumas vitaminas que fornecem um valor energético de 265 kcal/100 g. Além disso, a mistura de substrato e micélio após da síntese dessas enzimas, pode ser aproveitado para transformá-lo em material digestível para ruminantes com um alto potencial em nutrição animal

(FRANCE; CAÑUMIR; CORTEZ, 2000).

2.7 Enzimas lignocelulolíticas

As enzimas lignocelulolíticas podem ser sintetizadas durante o crescimento de alguns fungos a partir do uso de componentes lignocelulósicos (substrato). Estas enzimas, são as responsáveis de degradar os principais compostos da parede celular vegetal. As principais enzimas fúngicas extracelulares são as celulases, hemicelulases e ligninases, as quais atuam sobre a celulose, hemiceluloses e lignina respectivamente (MENON; RAO, 2012).

2.7.1 Ligninases

O sistema enzimático que participa no processo de oxidação que mineraliza a lignina até dióxido de carbono e água consiste especialmente de lignina peroxidase (LiP ou EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP ou 1.11.1.13) e lacase (EC 1.10.3.2). A LiP é uma metaloproteína⁶ capaz de capturar elétrons de estruturas aromáticas não fenólicas e compostos similares para dar origem a radicais catiônicos, os quais participam em várias oxidações que incluem clivagem da ligação C $_{\alpha}$ -C $_{\beta}$ em cadeias laterais propílicas, hidroxilação de grupos metilênicos benzílicos, oxidação de álcoois benzílicos a aldeídos e cetonas, oxidação fenólica e abertura de anéis aromáticos não fenólicos (AGUIAR; FERRAZ, 2011). A MnP também é catalogada como metaloproteína, cuja principal função é oxidar o cátion Mn²⁺ ao cátion altamente reativo Mn³⁺, o qual atua como mediador de reações de oxirredução que ataca as estruturas fenólicas da lignina para obter radicais livres instáveis que tendem a degradar-se espontaneamente (HOFRICHTER, 2002). As duas enzimas anteriores têm a característica comum de serem conhecidas como fenoxidases que dependem do peróxido de hidrogênio (HAMMEL; CULLEN, 2008). A lacase é uma oxidase polifenólica multicúprica azul que não precisa de H₂O₂ para oxidar, ela catalisa oxidações monoelétrônicas de moléculas fenílicas a radicais reativos, reduzindo o Cu²⁺ a Cu¹⁺, que por sua vez reduz O₂ a H₂O (NILADEVI, 2009).

2.7.2 Hemicelulases

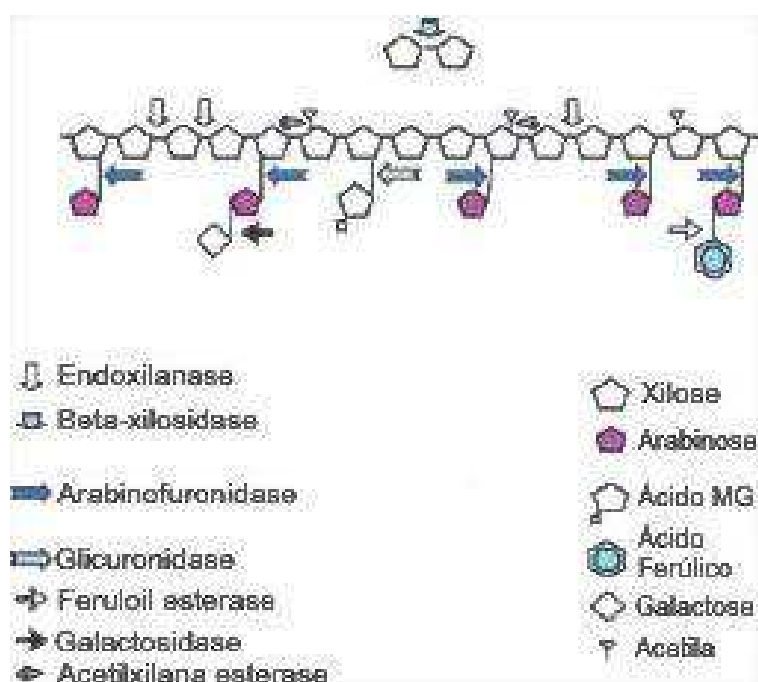
Devido à alta heterogeneidade da estrutura hemicelulósica, o desdobramento biológico é feito por vários grupos de enzimas de acordo com os componentes presentes. A Figura 15 representa o processo de liberação de monossacarídeos que é efetuado geralmente pela endoxilânase, β -xilosidase, arabinofuronidase, galactosidase, as quais são as

⁶ Proteínas que contêm um ou mais íons metálicos na sua estrutura, seja diretamente ligados à cadeia polipeptídica ou inseridos numa molécula não proteica ligada covalentemente à cadeia polipeptídica (ATKINS; JONES, 2011).

hemicelulases mais relevantes dentro do processo de hidrólise (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

Tendo em conta que aproximadamente 70 % das hemiceluloses é xilana, as principais enzimas participantes na degradação desse composto são a xilanase e β -xilosidase. A endoxilanase (EC 3.2.1.8) atua sobre a cadeia principal do carboidrato, hidrolisando as ligações para dar lugar a oligossacarídeos como a xilobiose (duas moléculas de xilose) e a β -xilosidase (EC 3.2.1.37) atua sobre os compostos liberados pela endoxilanase para produzir xilose (PÉREZ et al., 2002; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

Figura 15: Ação das hemicelulases sobre xilana



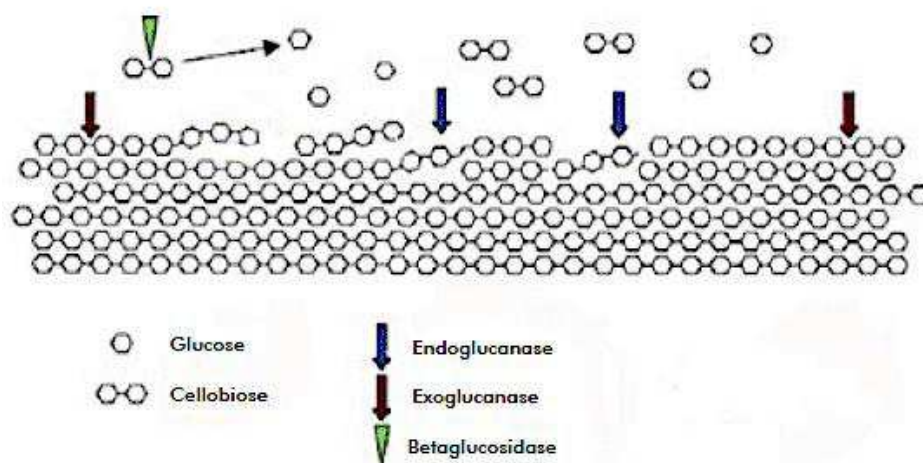
Fonte: Adaptado de Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol (2011)

2.7.3 Celulases

As celulases são enzimas que pertencem ao sistema hidrolítico responsável pela despolimerização da celulose. A degradação desse composto exige a participação de três categorias de enzimas caracterizadas por clivar ligações glicosídicas β -1 \rightarrow 4. A endoglicanase (EC 3.2.1.4) ou Carboximetilcelulase (CMCases) hidrolisa aleatoriamente as partes amorfas da molécula gerando novos extremos de cadeias redutoras e não redutoras expondo esses terminais livres para a atuação da exoglicanase. A exoglicanase (3.2.1.91) ou Celobiohidrolase (CBH) ou Avicelase ataca as pontas da cadeia de celulose e os extremos liberados pelas endoglicanases para produzir celobiose. A CBH podem ser classificadas em dois tipos; a CBH I que atua sobre as extremidades redutoras e a CBH II que hidrolisa extremidades

não redutores. Por último, a β -glicosidase (EC 3.2.1.21) é a responsável por hidrolisar a celobiose solúvel para obter glicose, tendo em conta que a glicose causa efeito inibitório sobre esta enzima (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011). A Figura 16 representa a forma de atuação das celulasas.

Figura 16: Ação das celulasas sobre celulose



Fonte: Adaptado de Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol (2011)

2.7.4 Síntese de enzimas por meio de fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido é um processo que envolve um substrato sólido misturado com água que não apresenta superfície líquida livre no sistema, para propiciar e suportar o crescimento e o metabolismo do micro-organismo. A matriz sólida pode cumprir com o papel de servir diretamente como fonte nutritiva ou de oferecer suporte ao sistema e fornecer os nutrientes em solução para o desenvolvimento do micro-organismo. Outra característica da FES é que o sistema assemelha-se às condições naturais dos micro-organismos (especialmente fungos), permitindo uma proximidade com o substrato para obter produtos com valor agregado como enzimas. As vantagens da FES comparada com a fermentação submersa fazem referência a que o sistema é menos favorável para bactérias, usa menores volumes, facilita aeração e não precisa de agitação. (PANDEY, 2003).

As principais aplicações da fermentação em estado sólido (FES) em bioprocessos são a biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, destoxificação biológica de resíduos agroindustriais, biorrefinaria, biopolpação e produção de metabólitos secundários como alcalóides, enzimas, antibióticos e ácidos orgânicos (SINGHANIA et al., 2009; CASTRO; SATO, 2015). Nos últimos anos, o mecanismo utilizado para produzir diferentes enzimas com uma ampla faixa de aplicações biotecnológicas através de FES tem aumentado (YOON et al., 2014).

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA

3.1 Substrato

Os caules e as folhas de *Alstroemeria sp.* foram obtidos da empresa UAI Flores, localizada a 910 m de altitude a 15 km ao norte da cidade de Andradas, no estado de Minas Gerais. Os resíduos foram secos naturalmente ao sol e submetidos a processo de moagem e peneiramento até alcançar um tamanho de partícula menor que 1,4 mm (MARTÍNEZ et al., 2015; WAN; LI, 2012). A caracterização do substrato foi feita determinando teor de umidade (TAPPI¹ T264 OM-88), cinzas (TAPPI T211 OM-93), lignina Klason (TAPPI T13M-54), holocelulose e celulose pelos métodos de clorito ácido e hidróxido de potássio, respectivamente (BROWNING, 1967). O tamanho de partícula pelo método de peneiramento, conteúdo de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) com análise elementar e teores de cobre (Cu), ferro (Fe), chumbo (Pb), zinco (Zn) e manganês (Mn) por espectrômetria de absorção atômica de chama (MILNE; BRENNAN; GLENN, 1990).

3.1.1 Umidade

Em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado, foi disposta uma massa de aproximadamente $2 \pm 0,01$ g de amostra e o sistema foi colocado em estufa a 105 ± 3 °C por 2 h, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Logo, o sistema foi colocado na estufa por mais 1 h à mesma temperatura e foram repetidos os procedimentos de resfriamento e pesagem até alcançar massa constante (a variação das pesagens não excederam 0,02 g). O teor de umidade foi calculado como a diferença entre as massas inicial e final da amostra.

3.1.2 Cinzas

Em um cadinho de porcelana previamente seco e tarado, foi disposta uma massa de aproximadamente $1 \pm 0,005$ g de amostra seca e o sistema foi colocado em mufla a 800°C por 2 h e em seguida resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. O teor de cinzas foi determinado como a diferença entre as massas inicial e final da amostra.

¹ Métodos padrão desenvolvidos pela Associação Técnica da Indústria de Polpa e Papel (TAPPI) para caracterizar matérias-primas (TAPPI, 2017)

3.1.3 Lignina Klason insolúvel

Em um almofariz foi disposta uma massa de aproximadamente $1 \pm 0,01$ g de amostra seca e foram adicionados 15,0 mL de solução de ácido sulfúrico 72% ($\rho_{20^{\circ}C} = 1,6338$ g/mL). A amostra foi macerada exaustivamente e deixada em repouso por 2 h a temperatura ambiente (contadas a partir da adição do ácido à amostra). Após esse tempo, a mistura foi transferida para um balão redondo de 1 L, diluída com água destilada até atingir uma solução de ácido sulfúrico de 3% (560 mL de água) e aquecida em refluxo por 4 h. Em seguida, filtrou-se a lignina insolúvel em funil de vidro sinterizado nº4 previamente seco e tarado, e posteriormente foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 12 h, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado (em balança com precisão de 0,001g). O conteúdo de lignina insolúvel foi calculado como a relação entre a massa de lignina insolúvel obtida e a massa inicial de amostra seca.

3.1.4 Lignina Klason solúvel

A amostra foi tomada do filtrado da etapa anterior, diluída com água destilada até atingir uma solução ácida de 0,05 mol/L e quantificada por espectroscopia ultravioleta. O branco para fazer as leituras correspondeu a uma solução de ácido sulfúrico 0,05 mol/L e as medidas de absorbância do filtrado foram feitas nos comprimentos de onda de 215 (A_{215}) e 280 nm (A_{280}). A concentração em g/L (C_{LKS}) de lignina Klason solúvel foi calculada pela Equação 3.1

$$C_{LKS} = [(4,53 \cdot A_{215}) - A_{280}] \cdot 300 \quad (3.1)$$

3.1.5 Holocelulose

Em um erlenmeyer foi disposta uma massa de aproximadamente $5 \pm 0,01$ g de amostra seca e 100 mL de água destilada. O conjunto foi colocado em banho-maria a 75 °C e foram adicionados 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio, nesta ordem, tampando o erlenmeyer para não perder o gás produzido na reação. Após 1 hora, adicionou-se novamente 2,0 mL de ácido acético e 3,0 g de clorito de sódio e este processo foi repetido por mais duas vezes. A mistura foi resfriada a 10 °C, filtrada em funil de vidro sinterizado nº2, previamente seco e tarado, e lavada com água destilada a 5°C até que o resíduo fibroso apresentasse coloração esbranquiçada e o pH do eluído fosse igual ao da água utilizada na lavagem. Por último, o funil com o resíduo fibroso foi seco em estufa a 105 ± 3 °C por 6 h, e posteriormente resfriado em dessecador e pesado. O conteúdo de holocelulose foi calculado como a relação entre a massa de holocelulose obtida e a massa inicial de amostra seca.

3.1.6 Celulose

Em um erlenmeyer de 250 mL transferiram-se $3,0 \pm 0,01$ g de holocelulose seca obtida na subseção 3.1.5, adicionaram-se 100 mL de solução de hidróxido de potássio 5% e fez-se uma atmosfera inerte pelo borbulhamento de gás nitrogênio durante 5 min para evitar a oxidação da celulose. O erlenmeyer foi vedado e mantido em agitação constante por 2 h. A mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado nº2, lavada com 50 mL de solução de hidróxido de potássio 5% e com 100 mL de água destilada. O resíduo fibroso retido no funil foi transferido novamente para o erlenmeyer de 250 mL e o mesmo procedimento de extração foi repetido utilizando solução de hidróxido de potássio 24 %. Para lavagem do resíduo fibroso retido no funil, utilizaram-se 25 mL de solução de hidróxido de potássio 24%, 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético 10% e 100 mL de água destilada, respectivamente. O resíduo fibroso foi lavado com água destilada até que o filtrado apresentasse pH neutro. O resíduo foi então lavado com 50 mL de acetona, seco a 105 ± 3 °C por 6 horas, e pesado. O conteúdo de celulose foi determinado como a relação entre a massa de celulose obtido e a massa inicial de amostra seca.

3.1.7 Hemiceluloses

O conteúdo de hemiceluloses foi determinado como a diferença entre os teores de holocelulose e celulose em relação à massa inicial de amostra seca.

3.1.8 Análise elementar

A análise foi realizada para determinar os teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre utilizando o analisador Analyzer 2400-CHNS/O da Perkin Elmer. Seu funcionamento está baseado na combustão em atmosfera de oxigênio puro das amostras, e os gases produzidos são quantificados em um detetor de condutividade térmica (SKOOG; HOLLER; WEST, 2014).

3.1.9 Metais

Para a análise quantitativa, nos resíduos vegetais, dos teores de cobre, ferro, chumbo, zinco e manganês foi necessária fazer uma abertura nítrico-perclórica da amostra. Em um tubo de digestão foram pesados $0,5 \pm 0,001$ g de material seco e adicionados 6 mL de uma solução de ácido nítrico e ácido perclórico em uma proporção 2:1 (v/v) respectivamente. O tubo foi disposto em um bloco digestor, a temperatura foi aumentada gradualmente até atingir 160 °C e manteve-se nessa condição até que o volume do sistema fosse a metade do inicial (aproximadamente 45 min). Em seguida, a temperatura foi aumentada a 210 °C, e manteve-se nesse estado até obter fumaças brancas (ácido perclórico) e o extrato incolor (aproximadamente 20 min), então esfriou-se e o extrato foi transferido para um

balão volumétrico de 50 mL com porções de água destilada até completar o volume do balão (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A amostra digerida foi analisada usando um espectrômetro de absorção atômica de chama AAnalyst 200 da Perkin Elmer.

3.2 Linhagem fúngica

O Basidiomiceto de podridão branca *Pleurotus ostreatus* PLO6 foi gentilmente cedido em grãos de sorgo pela Profa. Dra. Maria Catarina Megumi Kasuya do laboratório de Associações Micorrízicas, Departamento de Microbiologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa. O crescimento do fungo foi feito no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia. Para o cultivo do micro-organismo foram realizados repiques periódicos em meio de cultura Ágar Batata Dextrose (PDA), pH 5,5 e temperatura de 28 °C até atingir as características morfológicas (textura, crescimento, densidade e pigmentação) descritas na literatura (ASLAM; ASGHER, 2011; KARP et al., 2012; GUADARRAMA-MENDOZA et al., 2014; HOA; WANG, 2015).

3.3 Obtenção de açúcares redutores totais

A fim de avaliar a produção de açúcares redutores totais (ART) e enzimas hemi(celulolíticas) de forma simultânea por meio de FES realizou-se um estudo univariado em função do tempo. A faixa de análise foi entre 0 e 14 dias fazendo quantificações em intervalos de 24 h. Os experimentos foram executados em duplicata a 28 °C em erlenmeyers de 250 mL pela técnica de (FES), a quantidade de substrato foi fixada em 5 g umidificadas com 20 mL de solução nutriente (pH 5,5) e utilizando como inóculo 5 discos miceliais (8 mm de diâmetro cada) por frasco de fermentação. Antes da inoculação o sistema foi esterilizado em autoclave (121 °C e 1 atm) durante 30 minutos (PATEL; GUPTE; GUPTE, 2009). A solução nutriente foi composta por 0,3 g/L de $Mg(SO_4) \cdot 7H_2O$, 0,00156 g/L de $Mn(SO_4) \cdot H_2O$, 0,002 g/L de $CoCl_2$, 0,0431 g/L $Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$, 0,005 g/L de $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$, 0,0014 g/L de $Zn(SO_4) \cdot 7H_2O$, 0,3 g/L de $CaCl_2$, 1,5 g/L de KH_2PO_4 , 4 g/L de extrato de levedura, 0,001 g/L de tiamina e 0,2 g/L de tartarato de amônio (ASLAM; ASGHER, 2011; PÉREZ; PIÑEROS-CASTRO; LOZANO, 2011; KARP et al., 2015; LIGUORI et al., 2015).

Para a dosagem de ART e das enzimas, em cada experimento, a cada um dos frascos fermentados, foram adicionados 50 mL de água destilada e homogeneizados por 1 hora a 200 rpm a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram filtradas em tecido tipo vual, centrifugadas a 2000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi filtrado novamente em papel filtro. Finalmente, os ART foram quantificados pelo método do ácido 3,5- dinitrosalissílico (DNS) (MILLER, 1959).

3.4 Atividade enzimática

De modo paralelo à quantificação de ART nas fermentações propostas, no estudo preliminar e na triagem, realizou-se a dosagem das atividades de celulasas e hemicelulasas produzidas pelo fungo filamentoso *P. ostreatus* nos extratos enzimáticos brutos obtidos.

3.4.1 Atividade da β -glicosidase (EC 3.2.1.21) e β -xilosidase (EC 3.2.1.37)

Ambas atividades foram determinadas com 250 μ L de tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5), 250 μ L de p-nitrofenil β -Dglicopiranosídeo (PNPG) (no caso da β -glicosidase) ou p-nitrofenil β -Dxilopiranosídeo (PNPX) 4 mM (para β -xilosidase) e 50 μ L de extrato enzimático bruto (o mesmo sobrenadante obtido para análise de ART). A mistura foi incubada em banho maria a 40 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida com 2 mL de Na₂CO₃ 2 M e o p-nitrofenol (pNP) liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de atividade enzimática, U, foi definida como a quantidade de enzima necessária para clivar 1 μ mol de pNP por minuto de reação (TEIXEIRA; WENDLING, 2014). O controle da reação foi composto por 250 μ L de tampão e 300 μ L de PNPG ou PNPX (segundo a atividade a quantificar) e o branco correspondeu a 250 μ L de tampão e 300 μ L de água destilada (SANTOS et al., 2015).

3.4.2 Atividade da exoglicanase (avicelase ou EC 3.2.1.91), endoglicanase (CMCase ou EC 3.2.1.3) e endoxilanase (EC 3.2.1.8)

As atividades foram determinadas com 90 μ L dos substratos (todos Sigma) avicel (no caso da exoglicanase), carboximetilcelulose (para endoglicanase) ou xilana (para endoxilanase) 1,0% em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 4,5) e 10 μ L de extrato bruto (SANTOS et al., 2015). A mistura foi aquecida em banho maria a 40 °C por 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de DNS. O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida, acrescentou-se 800 μ L de água destilada. A quantidade de glicose ou xilose liberada foi medida por espectrofotometria a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática, U, foi definida como a quantidade de enzima necessária para clivar 1 μ mol de glicose ou xilose por minuto de reação (TEIXEIRA; WENDLING, 2014). O controle da reação foi composto por 90 μ L de avicel, CMC ou xilana 1,0% em tampão citrato (segundo a atividade a quantificar), 100 μ L de DNS e 10 μ L de extrato. O branco correspondeu a 100 μ L de DNS e 100 μ L de água destilada.

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo software IBM® SPSS v.21, onde os dados incluíram ANOVA de uma via para testar a significância e prova de Shapiro-Wilk para

conferir normalidade. Em todos os casos considerou-se estatisticamente significativo quando o p-valor foi menor que 5%.

3.6 Influência da temperatura, concentração de substrato e tempo na síntese de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais

A capacidade do *P. ostreatus* PLO6 para sintetizar celulasas, hemicelulasas e açúcares fermentáveis a partir de resíduos de *Alstroemeria sp.* foi avaliada (triagem) com duas temperaturas diferentes (T): 24 e 32 °C, duas concentrações de substrato (CS): 20 e 30% (m/m) e dois tempos de fermentação (t): 8 e 15 dias (Tabela 3). Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado em triplicata, onde as variáveis de resposta foram a concentração de ART (C_{ART}) em g/L e as atividades holocelulolíticas usando os níveis definidos na Tabela 4.

Tabela 3: Variáveis e suas condições empregadas no planejamento experimental

Experimento	Temperatura, °C	Concentração substrato, %	tempo, dia
2.1	24	20	8
2.2	32	20	8
2.3	24	30	8
2.4	32	30	8
2.5	24	20	15
2.6	32	20	15
2.7	24	30	15
2.8	32	30	15

Fonte: Elaboração própria

Tabela 4: Níveis dos fatores empregados no planejamento experimental

Fator	Nível Baixo, (-1)	Nível Alto, (+1)
Temperatura (T), °C	24	32
Concentração de substrato (CS), %	20	30
Tempo (t), dias	8	15

Fonte: Elaboração própria

O modelo estatístico dos efeitos dos fatores sobre a variável da resposta é descrita pela Equação 3.2, na qual y_{ijkl} representa a variável de resposta (C_{ART} e as diferentes atividades enzimáticas holocelulolíticas), μ , T_i , CS_j , t_k , $T \cdot CS_{ij}$, $T \cdot t_{ik}$, $CS \cdot t_{jk}$, $T \cdot CS \cdot t_{ijk}$ e ε_{ijkl} são a média global, o efeito do nível i-ésimo do fator temperatura, o efeito do nível j-ésimo do fator concentração de substrato, o efeito do nível k-ésimo do fator tempo, as interações entre os fatores T_i , CS_j , t_k e o erro aleatório respectivamente (MONTGOMERY,

2009).

$$y_{ijkl} = \mu + T_i + CS_j + t_k + (T \cdot CS)_{ij} + (T \cdot t)_{ik} + (CS \cdot t)_{jk} + (T \cdot CS \cdot t)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl} \quad (3.2)$$

A influência das variáveis independentes sobre a produção de ART e as atividades enzimáticas foram estudadas mediante a análise de gráficos de Pareto gerados pelo software StatSoft Statistica Enterprise v.10.

3.7 Otimização estatística para produção de açúcares redutores totais

A otimização teórica da produção de ART foi realizada usando um planejamento central composto (PCC), onde foi utilizado 5 replicas no ponto central e os outros experimentos em duplicata. O software usado foi StatSoft Statistica Enterprise v.10. A matriz do planejamento é apresentada na Tabela 5.

Tabela 5: Variáveis e suas condições empregadas no planejamento central composto

Experimento	Concentração substrato, %	tempo, d %	Temperatura, °C
1	15	6	21
2	15	6	27
3	15	12	21
4	15	12	27
5	25	6	21
6	25	6	27
7	25	12	21
8	25	12	27
9	11,6	9	24
10	28,4	9	24
11	20	3,95	24
12	20	14,05	24
13	20	9	18,95
14	20	9	29,05
15 (PC)	20	9	24
16 (PC)	20	9	24
17 (PC)	20	9	24
18 (PC)	20	9	24
19 (PC)	20	9	24

Fonte: Elaboração própria

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do substrato

Encontrou-se que o conteúdo de celulose, hemiceluloses e lignina cumpre com as condições estabelecidas para resíduos agroindustriais que têm sido catalogados como potenciais matérias-primas para a obtenção de bioetanol 2G: lignina 10 - 25 %, hemiceluloses 20 - 40 % e celulose 35 - 60 % (MENON; RAO, 2012; BAEYENS et al., 2015). A Tabela 6 resume as características (porcentagem mássica em base seca) dos caules e folhas da flor *Alstroemeria sp.* e as compara com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais, revelando as diferenças e semelhanças que o material floral tem com referência a outros substratos.

Tabela 6: Composição química dos resíduos de *Alstroemeria sp.* determinados neste estudo e de outros resíduos agroindustriais da literatura

Propriedade %	Resíduo de Alstroeméria	Resíduo de Crisântemo	Resíduo de Rosa	Bagaço de cana	Palha de arroz
Umidade	10,1 ± 0,27	–	–	–	–
Lignina	15,2 ± 0,24	17,5	9,5	15 - 25	27 - 32
Celulose	36,1 ± 0,14	49,6	38,4	25 - 45	37 - 41
Hemiceluloses	14,7 ± 0,14	7,5	8,8	28 - 32	13 - 15
Cinza	7,5 ± 0,14	–	–	–	11 - 14
Referência		(QUEVEDO et al., 2015)	(MENON; RAO, 2012)	(BALAT, 2011)	

Fonte: Elaboração própria

Os resíduos da flor analisada apresentaram um alto conteúdo de hemiceluloses em comparação com os resíduos de crisântemos e rosas, conferindo que cada espécie vegetal apresenta diferente composição química apesar de serem subprodutos de família similar (QUEVEDO et al., 2015). No entanto, a composição lignocelulósica dos resíduos de alstroeméria é adequada para produzir por meio do fungo *P. ostreatus* o complexo enzimático completo para degradar a lignina e transformar a celulose e as hemiceluloses em hexoses e pentoses (BALDRIAN et al., 2005).

Por outro lado, encontrou-se que os caules e as folhas da planta contêm em base seca 42,7% de carbono, 5,4% de hidrogênio, 1,1% de nitrogênio, 1,3% de enxofre e que, com base no teor de cinzas (7,5%) estima-se que o conteúdo de oxigênio equivale a 42%. O teor de nitrogênio está dentro da faixa (0,6 a 1,4%) e portanto é considerado como adequado para o desenvolvimento das atividades de *P. ostreatus*, valores fora desses limites interferem negativamente ao fungo. (CUEVA; MONZÓN, 2014; KOUTROTSIOS et al., 2014).

A relação C/N do substrato é de 38,8, a qual é considerada como um valor adequado para a etapa de colonização e posterior produção de enzimas e sacarificação em processos com fungos da gênero *Pleurotus*. Uma relação C/N menor que 50 eleva os rendimentos no cultivo dos Basidiomicetos mencionados (RIZKI; TAMAI, 2011). Além disso, os resíduos de alstroeméria contêm concentrações (mg/kg) de micronutrientes minerais (Tabela 7) como cobre, ferro, zinco, chumbo e manganês, que de acordo com a literatura, permitem o crescimento e degradação de resíduos lignocelulósicos (CUEVA; MONZÓN, 2014). De acordo com as quantidades encontradas de manganês e cobre no substrato selecionado, pode se destacar que a degradação do complexo lignocelulósico foi desenvolvida, devido a que uma concentração mais alta de manganês com referência ao cobre potencializa o processo (BALDRIAN et al., 2005).

Tabela 7: Composição de alguns metais nos resíduos de *Alstroemeria sp.* determinados neste estudo e de outros resíduos agroindustriais da literatura

Metal	Resíduo de Alstroeméria	Bagaço de cana	Palha de cevada	Palha de trigo	Casca de arroz
Cobre	20,1 ± 0,8	23,66	6,47	12,55	6,66
Ferro	256,8 ± 3,9	188,67	461,44	416,89	135,00
Zinco	133,4 ± 1,0	69,66	22,11	17,88	10,66
Chumbo	0,0 ± 0,0	—	—	1,3*	—
Manganês	105,2 ± 5,3	123,0	59,0	63,4	98,0
Referência	—	(PÉREZ et al., 2002)			

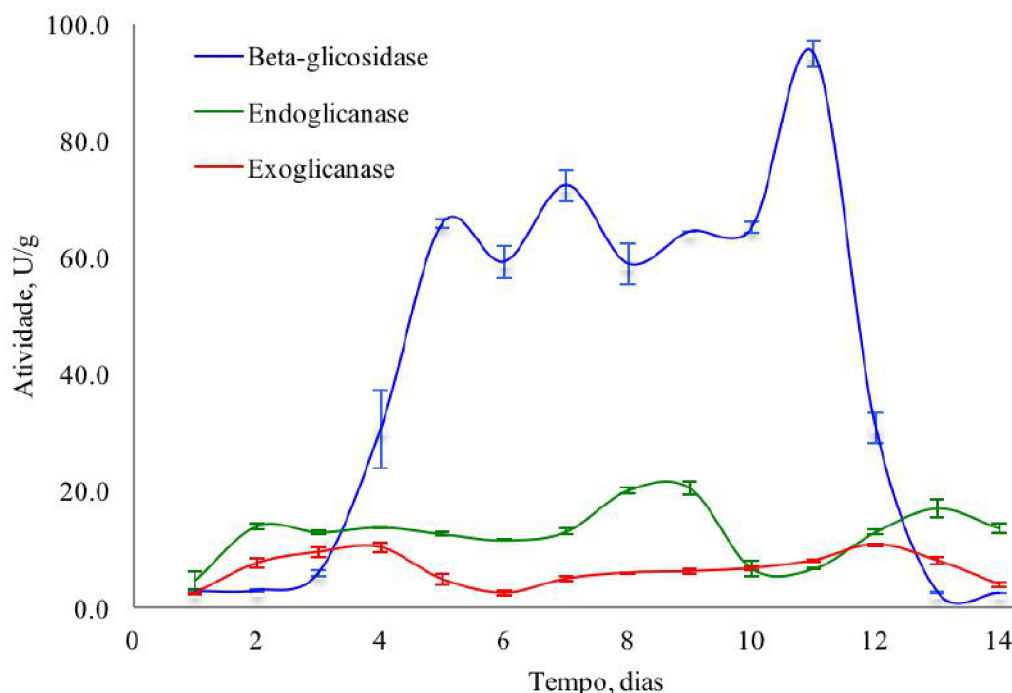
Fonte: Elaboração própria. *(BALDRIAN et al., 2005)

4.2 Atividades enzimáticas

4.2.1 Celulases

Os fungos de podridão branca são caracterizados por transformar a celulose devido à produção de enzimas celulolíticas requeridas para a despolimerização da celulose (WAN; LI, 2012; RYTIOJA et al., 2014). A Figura 17 mostra que o *P. ostreatus* PLO6 foi capaz de produzir as enzimas celulolíticas 1,4- β -glicosidase (Celobiase), exo 1,4- β -glicanase (CBH ou avicelase) e endo 1,4- β -glicanase (CM-celulase ou CMCase), tendo como substrato os resíduos florais.

Figura 17: Atividade enzimática da endoglicanase (verde), exoglicanase (vermelho) e β -glicosidase (azul) sintetizadas por *P. ostreatus* PLO6 durante 14 dias



Fonte: Elaboração própria

Os resultados revelam que durante os três primeiros dias, as primeiras enzimas que foram produzidas pelo *P. ostreatus* PLO6 foram as glicanases e com valores superiores aos exibidos pela β -glicosidase (Figura 17). Este comportamento está associado com a ação da endoglicanase, que geralmente inicia atacando aleatoriamente as partes amorfas da celulose, gerando novos extremos de cadeias redutoras e não redutoras, para que logo a exoglicanase atue sobre tais cadeias de oligossacarídeos liberando moléculas de celobiose (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013).

Com relação à β -glicosidase, observou-se que nos primeiros 4 dias e nos últimos 3 dias do processo a atividade da enzima foi baixa em relação aos outros dias de fermentação. Este resultado possivelmente ocorreu devido à baixa quantidade de celobiose disponível nos períodos de tempo mencionados (MORETTI et al., 2012). Não obstante, durante os dias 5 e 11 notou-se uma considerável atividade da β -glicosidase, isto, relacionado com a ação contínua das glicanases liberando celobiose para posteriormente ser desdobrada pela β -glicosidase e obter glicose quantificada nos açúcares redutores totais (SHEEHAN; HIMMEL, 1999).

Os picos máximos de atividade da endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase, foram atingidos nos dias 9 (20,5 U/g), 4 (10,3 U/g) e 11 (94,9 U/g) respectivamente, distinguindo que os valores dos picos da endoglicanase e exoglicanase foram produzidos

antes do máximo da β -glicosidase, o qual está diretamente relacionado com o tipo de ação das celulasas (DASHTBAN; SCHRAFT; QIN, 2009). Esses valores foram superiores ao encontrado por o estudo realizado por Khalil et al. (2011), que usou outra linhagem de *P. ostreatus*, o Jacquin ex Fr.) utilizando palha de arroz como substrato, exibindo picos máximos de atividade para endoglicanase, exoglicanase e β -glicosidase de 7,08 U/g, 7,35 U/g e 3,6 U/g, respectivamente, após 10 dias de fermentação.

Além disso, a produção máxima de β -glicosidase atingida neste trabalho foi produzida em menor tempo e quase cinco vezes maior ao máximo reportado por Moretti et al. (2012), onde 20 U/g da enzima foram produzidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* M.7.7. empregando farelo de trigo como substrato em um tempo de 14 dias de FES. Por último, é importante destacar que a produção de avicelase, importante por hidrolisar a celulose cristalina não é comumente sintetizada por fungos, assim, a presença desta enzima é considerada um ponto positivo deste estudo.

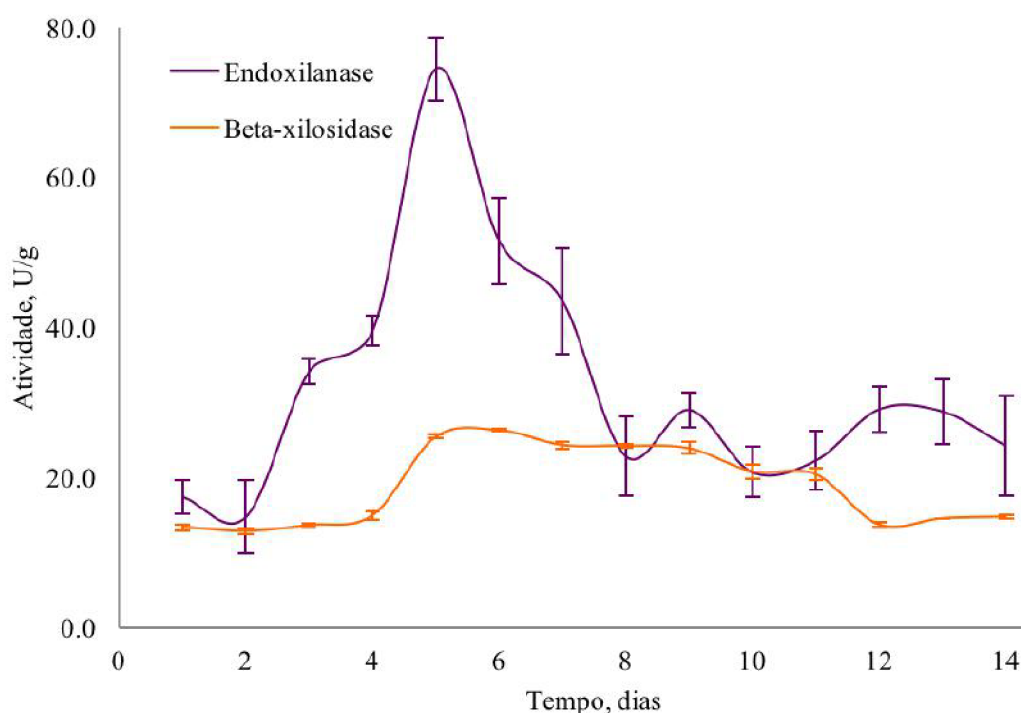
4.2.2 Hemicelulasas

Outra característica importante para a prospecção de fungos do gênero *Pleurotus* é a capacidade para sintetizar enzimas que degradam hemiceluloses, em especial a xilana, um dos principais componentes na estrutura das hemiceluloses presente em resíduos lignocelulósicos (EBRINGEROVA; HEINZE, 2000; BALDRIAN et al., 2005). A Figura 18 mostra que o *P. ostreatus* PLO6 foi capaz de sintetizar endoxilanase e β -xilosidase tendo como substrato os resíduos florais.

A síntese de β -xilosidase por *P. ostreatus* PLO6 foi moderada, exibindo uma produção praticamente constante de 24 U/g durante os dias 5 e 11 de fermentação, o pico máximo de atividade (26,3 U/g) foi identificado no dia 6 (Figura 18). O máximo encontrado neste estudo foi o triplo da atividade alcançada no 5º dia (9,7 U/g) usando o *P. ostreatus* linhagem IE8 através de condições similares de FES e a partir de bagaço de cana (SÁNCHEZ-SANTILLÁN; MENESES; TORRES-SALADO, 2015). A máxima atividade deste trabalho foi menor que o encontrado por Luz et al. (2012), que utilizou a mesma linhagem fúngica (PLO6) usando serragem com 20% de farelo de arroz como substrato sob FES em sacolas de polipropileno, o qual exibiu no dia 15 uma atividade enzimática de 65 U/g.

O valor mais alto de produção para a endoxilanase foi obtido no 5º dia de FES (74,5 U/g), resultado semelhante ao reportado por Lima (2013), que encontrou uma atividade de 78,7 U/g usando o *P. ostreatus* (linhagem CCIBT-2347) a partir de bagaço de cana-de-açúcar. O valor de atividade enzimática obtido para endoxilanase neste trabalho foi superior ao apresentado pelo fungo *Aspergillus sydowii* (19 U/g) após 4º dia de FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo (relação 1:1) como substrato (SANTOS et al., 2015).

Figura 18: Atividade enzimática da endoxilanase (roxo) e β -xilosidase (laranja) sintetizadas por *P. ostreatus* PLO6 durante 14 dias



Fonte: Elaboração própria

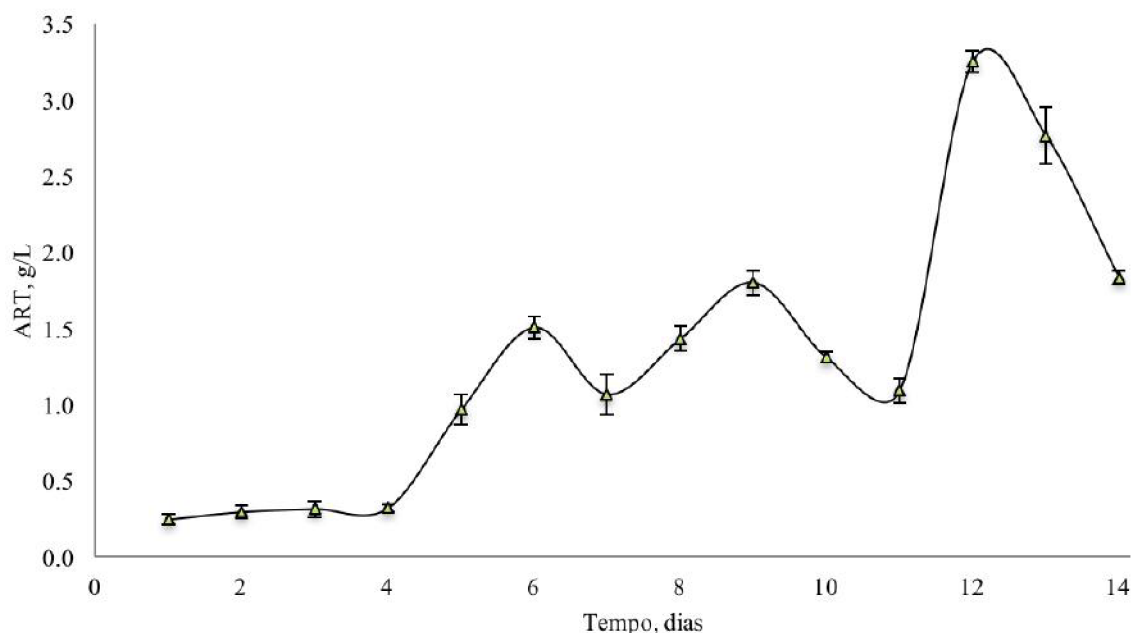
Além do exposto anteriormente, a Figura 18 mostra que durante todo o período de fermentação (exceto o dia 8) a produção enzimática de endoxilanase foi maior em relação aos valores da β -xilosidase. Este comportamento foi encontrado também, na produção de hemicelulases a partir de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato (relação mássica 1:1) sob FES usando o fungo *Aspergillus sydowii* SBCM7 (SANTOS et al., 2015).

4.3 Açúcares redutores totais

A Figura 19 mostra a produção de ART mediante ação das enzimas hidrolíticas sintetizadas pelo fungo *P. ostreatus* PLO6, a partir do crescimento em folhas e caules de *Alstroemeria* sp. como substrato, usando a técnica de FES.

A produção máxima de ART foi de 3,3 g/L atingida no 12º dia de fermentação, exatamente 24 horas após a obtenção do pico máximo de síntese de β -glicosidase, constatando a relação direta que esses parâmetros têm, a qual determina que a glicose, quantificada nos ART, foi liberada depois da atuação da β -glicosidase sobre a celobiose solúvel (SHEEHAN; HIMMEL, 1999; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013). Um valor idêntico de ART (3,3 g/L) foi obtido após o processo convencional de produção de açúcares

Figura 19: Produção de ART por meio do crescimento do *P. ostreatus* PLO6 em resíduos de alstroeméria durante 14 dias



Fonte: Elaboração própria

fermentescíveis a partir de material lignocelulósico (produção de enzimas e hidrólise em etapas separadas) em um tempo total de 8 dias, utilizando um coquetel enzimático bruto produzido pelo crescimento dos fungos *Aspergillus fumigatus* SCBM6 e *Aspergillus niger* SCBM1 (misturados em igual proporção), utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como substrato (RODRIGUES, 2016).

É muito importante destacar que a produção de ART de forma simultânea à síntese de enzimas hemi(celulolíticas) usando o Basidiomiceto *P. ostreatus* PLO6 reduz o uso das etapas separadas de produção de enzimas e hidrólise usadas comumente. No entanto, a concentração de ART obtida é considerada baixa se comparada com os 30 g/L de ART obtidos em um tempo total de 9 dias pelo coquetel enzimático dos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamori* RUT 30, utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com explosão a vapor (GONÇALVES, 2010).

Por outro lado, observa-se que após a obtenção máxima de ART a produção de β -glicosidase diminuiu de forma súbita, sugerindo uma clara vinculação de efeito inibitório que a glicose tem sobre a enzima produzida e o consumo da fonte de carbono por parte do micro-organismo (CASTRO; JR, 2010).

4.4 Análise estatística

Os dados correspondentes às atividades enzimáticas e à concentração de ART (Apêndice A) foram tratados utilizando o software IBM-SPSS v.21, onde incluíram ANOVA de uma via e foram testados para conferir normalidade por meio da prova de Shapiro-Wilk. Considerando a análise de variância dos ensaios, todos os resultados apresentaram diferenças significativas no fator tempo para a produção de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais com p-valores menores que 0,05 (representado com Sig. no Apêndice B). Além disso, através do teste de Shapiro-Wilk, as distribuições dos dados das variáveis de resposta podem ser consideradas normais (p-valores ou Sig. maiores a 0,05), exceto a endoxilanase, a qual apresentou a maior variabilidade nas duplicatas em cada experimento (Apêndice C).

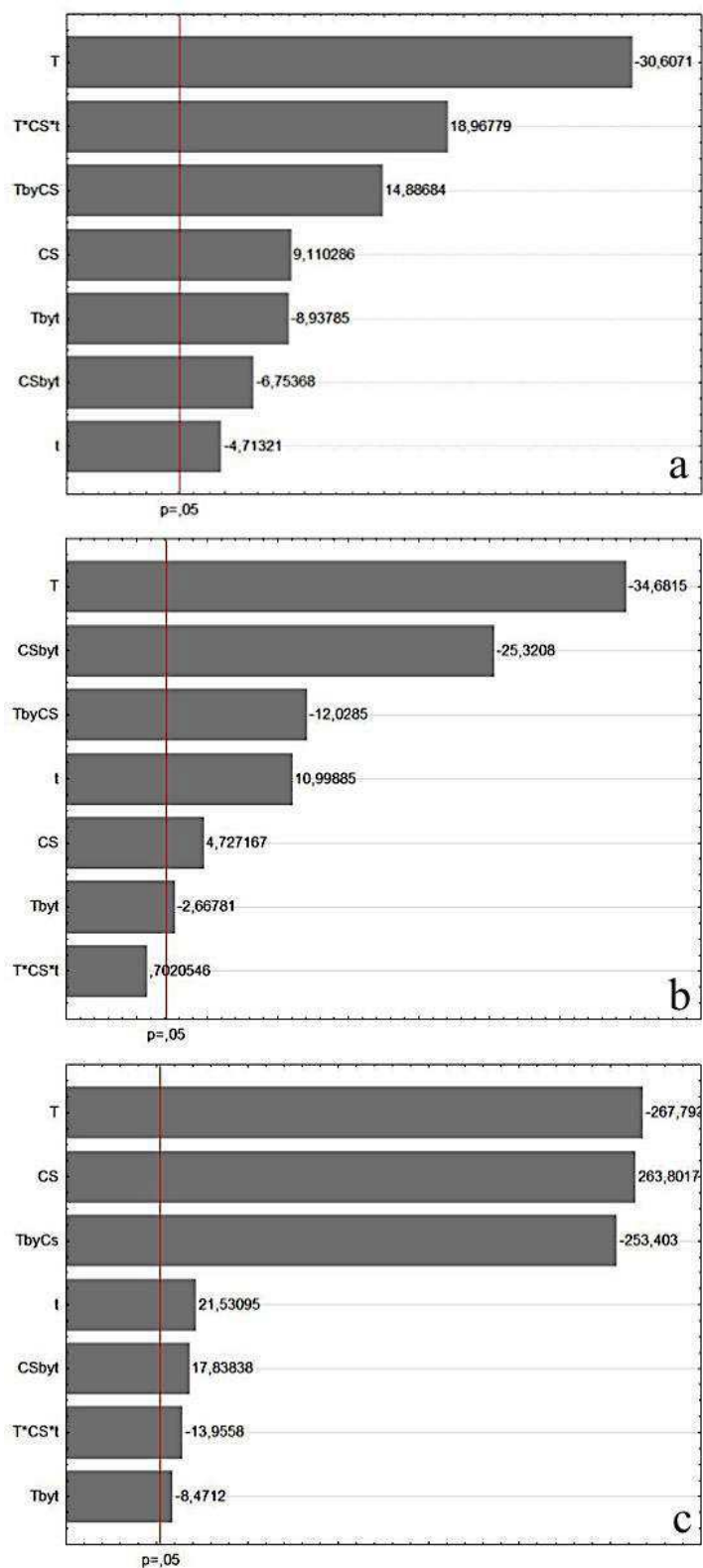
4.5 Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção enzimática celulolítica

Nesta seção foram avaliados os efeitos dos fatores: temperatura (T, 24 e 32 °C), tempo (t, 8 e 15 dias) e concentração de substrato (CS, 20 e 30%), sobre as variáveis de resposta endoglicanase (Figura 20a), exoglicanase (Figura 20b) e β -glicosidase (Figura 20c). A significância dos efeitos dos fatores foi avaliada ao nível de significância de $p=0,05$ (linha vertical na Figura 20), assim, quando o p-valor dos efeitos dos fatores foi menor que o nível de significância; os efeitos dos fatores foram significativos, o qual pode ser observado nos gráficos de Pareto, tendo em conta que a significância dos fatores aumenta no sentido de esquerda a direita na Figura 20.

Observa-se que a variável independente com maior influência nas atividades celulolíticas foi a temperatura, a qual tem um efeito positivo na produção das enzimas se o nível mantém-se no valor baixo de 24 °C (barra com maior tamanho e valor negativo na Figura 20). Esta observação está de acordo com o estudo realizado por Khalil et al. (2011), o qual estabeleceu que o crescimento e as funções do basidiomiceto *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer, durante FES usando palha de arroz pré-tratado com hidróxido de sódio, têm um pobre desenvolvimento em temperaturas acima dos 35 °C e o fungo não consegue crescer acima dos 40 °C.

A condição de temperatura neste estudo é muito semelhante às encontradas em pesquisas prévias realizadas por Yoon et al. (2014) e Nunes et al. (2015). O primeiro conseguiu produzir celulasas a partir de diferentes substratos lignocelulósicos usando fungos do gênero *Pleurotus* a uma temperatura ao redor dos 25 °C e o segundo estudo obteve os melhores rendimentos de produção para exoglicanase (0,054 U/mL) e β -glicosidase (0,5 U/mL) através do crescimento do fungo *Ganoderma lucidum* linhagem EF 35 a partir de bainhas do processamento de pupunha em condições de cultivo submerso a 25 °C.

Figura 20: Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de: a) endoglicanase; b) exoglicanase; c) β -glicosidase



Fonte: Elaboração própria

Outro fator que influenciou de forma significativa a síntese de celulases foi a concentração de substrato, a qual exibiu um efeito potencializador sobre a produção enzimática enquanto o nível foi mantido em 30% (valor positivo junto à barra de significância do fator). Uma concentração parecida foi usada em experimentos executados por Koutrotsios et al. (2014), cujo trabalho conferiu a redução do teor de celulose em nove diferentes substratos com tamanho de partícula de 2 - 3 cm (sabugo de milho, casca de arroz, serragem, bagaço de uva, torta da etapa de prensagem no processo de extração de óleo de oliva, folhas de pino, etc.) através de FES conduzida a 25 °C em sacolas de polipropileno usando o *P. ostreatus* linhagem LGAM IK1123 sob uma condição de CS de 30 a 35%

As condições de temperatura baixa e concentração de substrato de 30% obtidas neste trabalho estão de acordo com os resultados obtidos por Bari et al. (2015), o qual obteve uma redução do teor de celulose de 20% (por ação de enzimas celulolíticas) através do crescimento do fungo *P. ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer, em FES desenvolvida a 22 °C e uma CS de 30 a 35 %.

De acordo com a Figura 20a, todos os efeitos (de primeira, de segunda e terceira ordem) são significativos na produção de endoglicanase (os p-valores do fator são menores que o nível de significância de 0,05). Dentro desta análise, é claro observar que mantendo o fator CS no nível alto de 30% (valor positivo no gráfico de Pareto) e o tempo no nível baixo de 8 d (valor negativo no gráfico de Pareto), a produção de endoglicanase é influenciada de forma positiva. Além disso, pode se constatar que o segundo efeito que mais interfere sobre a atividade enzimática corresponde à interação dos três fatores avaliados, enquanto os efeitos de primeira ordem foram mantidos como T: 24 °C, t: 8 dias e CS: 30%.

O outro efeito que maximiza a síntese desta enzima corresponde à combinação dos fatores T no nível baixo de 24 °C e CS no nível alto de 30%. Estes resultados, ajustam-se ao estabelecido por Kurt e Buyukalaca (2010), os quais estudaram a produção de endoglicanase usando FES em sacolas de polipropileno, através do crescimento de *P. ostreatus* linhagem HK 35 sobre palha de arroz (com um tamanho de partícula entre 3 e 5 cm) misturada com farelo de trigo em relação 2:1 em uma concentração do 30%, uma temperatura de incubação de 25 °C para obter uma máxima produção de 1,7 U/g no dia 5 de fermentação.

Por outro lado, as interações de segunda ordem que deram valores negativos (Figura 20a) respondem teoricamente a um efeito antagônico sobre a variável de resposta quando os níveis dos efeitos de primeira ordem são mantidos da maneira original. A este tipo de conduta pertencem os efeitos de segunda ordem dos fatores T e t, e, CS e t, ambos nos níveis alto e baixo respectivamente; comportamento talvez atribuído à pouca significância exibida pelo fator tempo, o qual pode ser resultado da seleção de uma faixa estreita para avaliar a produção da endoglicanase.

Em relação à síntese de exoglicanase (Figura 20b), os efeitos de primeira e segunda ordem foram significativos (os p-valores dos efeitos são menores que o nível de significância de 0,05), diferentemente do efeito de terceira ordem que não apresentou significância estatística (p-valor do efeito maior que o nível de significância de 0,05). A produção de exoglicanase foi aumentada quando a T fixou-se no seu nível baixo e o t e a CS no seus níveis altos (T: 24 °C, t: 15 dias e CS: 30%). No entanto, as influências de segunda ordem dos fatores em todas as formas possíveis de combinação indicam um efeito negativo sobre a variável de resposta, o qual está diretamente associado com a pouca significância que apresentou o efeito do fator CS (dos efeitos de primeira ordem, a barra que representa a CS tem menor tamanho). Para corrigir este resultado poderia se avaliar níveis que estabeleçam uma faixa mais ampla da variável CS a fim de aumentar sua significância na produção de exoglicanase.

Por último, de acordo com a Figura 20c todos os efeitos dos fatores e das suas interações são significativos na obtenção da enzima β -glicosidase (os p-valores dos efeitos são menores que o nível de significância de 0,05). Através desta figura, pode se observar que os efeitos de primeira ordem com maior efeito positivo sobre a variável de resposta são atribuídos aos fatores T e CS nos níveis baixo (24 °C) e alto (30%) respectivamente. No entanto, pode ser constatado que o terceiro efeito que mais afeta à atividade enzimática corresponde à interação dos fatores T e CS, a qual apresentou uma relação destrutiva na maximização da variável de resposta. Este comportamento é atribuído ao uso de uma ampla faixa de algum dos dois fatores avaliados (T e CS). O outro efeito que maximiza a síntese da β -glicosidase corresponde a manter o tempo de fermentação no nível alto, o que quer dizer que um tempo de 15 dias é mais favorável para produzir a enzima. Além disso, o efeito combinado dos fatores CS e t nos níveis altos (30% e 15 d) predizem um aumento sobre a variável de resposta.

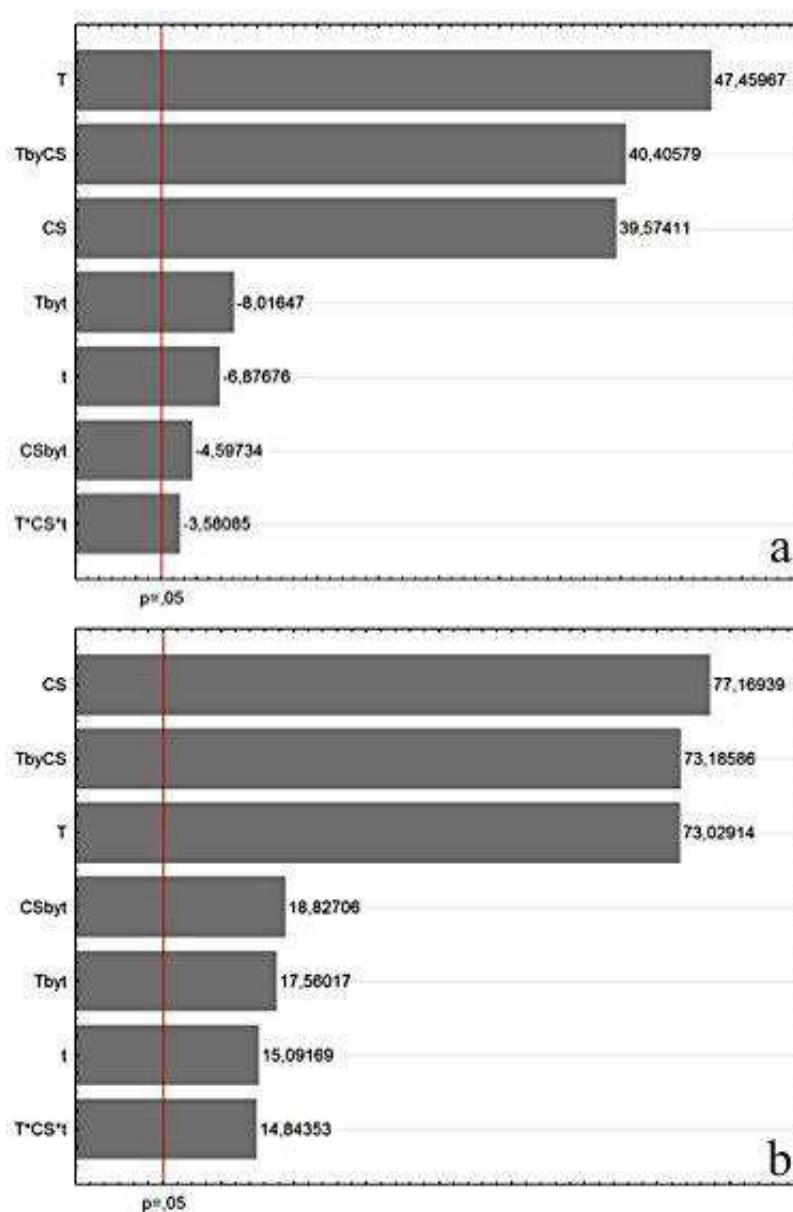
Considerando as análises estatísticas obtidas através dos gráficos de Pareto, as máximas atividades enzimáticas foram atingidas na configuração T = 24 °C, CS = 30% e t = 8 d para endoglicanase (18,6 U/g) e exoglicanase (11,0 U/g), e T = 24 °C, CS = 30% e t = 15 d para a β -glicosidase (18,5 U/g).

4.6 Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção enzimática hemicelulolítica

A Figura 21 representa as influências dos fatores: temperatura (T, 24 e 32 °C), tempo (t, 8 e 15 d) e concentração de substrato (CS, 20 e 30 %), sobre a produção de endoxilanase (Figura 21a) e β -xilosidase (Figura 21b). Observou-se que os fatores com maior influência para a produzir enzimas hemicelulolíticas foram a T e a CS, os quais exibiram um efeito de primeira ordem que potencializou a síntese desse tipo de enzimas

quando os níveis foram mantidos nos respectivos valores altos (T: 32°C e CS: 30%). Além disso, pode se afirmar que o segundo efeito com maior significância sobre as atividades das hemicelulases corresponde a interação dos fatores T e CS, os quais aumentam os valores das variáveis de resposta enquanto os efeitos de primeira ordem são mantidos nos respectivos níveis altos.

Figura 21: Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de: a) endoxilanase; b) β -xilosidase



Fonte: Elaboração própria

A configuração da CS é semelhante à encontrada por Iandolo et al. (2011), que obteve uma máxima atividade da endoxilanase (76,9% U/g) a partir de resíduos de

maça (tamanho de partícula entre 0,8 e 2 mm) através do crescimento do fungo *P. ostreatus* (Jacq.:Fr. tipo: Florida) linhagem ATCC MYA-2306 usando a metodologia de FES conduzida com uma CS de 29%. No trabalho de Liguori et al. (2015), reportou-se que a máxima atividade de endoxilanase (51,32 U/mL) foi atingida no nono dia usando o *P. ostreatus* da mesma linhagem que o autor anterior usando celulose micro-cristalina como substrato.

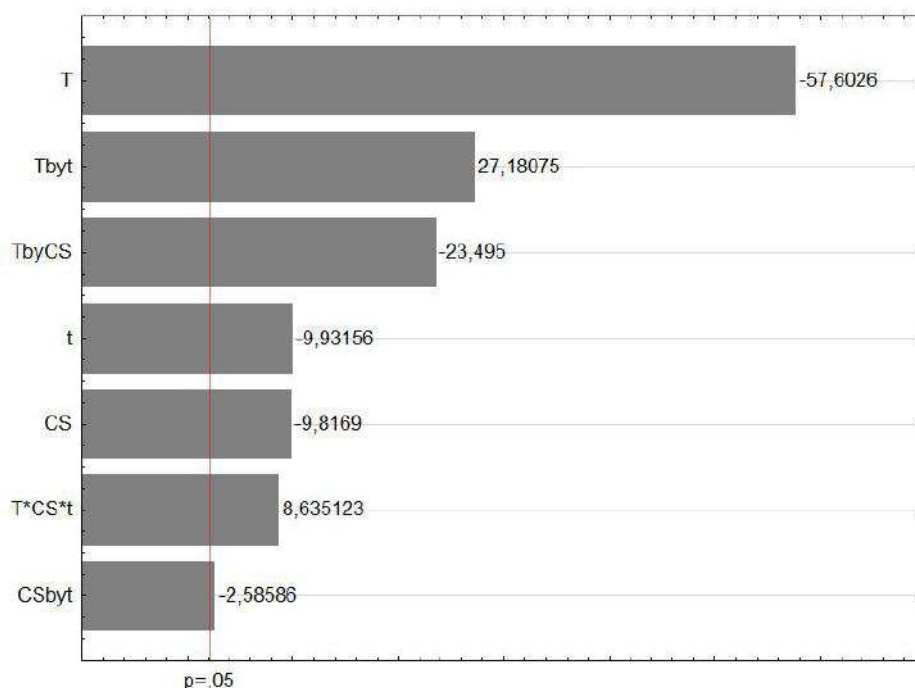
Outro fator que influenciou de forma significativa a obtenção das hemicelulases, mas em menor proporção que os relatados anteriormente, foi o tempo, o qual exibiu um efeito potencializador sobre a endoxilanase, enquanto seu nível foi mantido no valor baixo de 8 dias de fermentação. No entanto, o efeito do fator tempo sobre a β -xilosidase foi considerado positivo enquanto seu nível atingiu o valor alto de 15 dias. Esta tendência obtida têm muita relação com estudos prévios realizados por Sánchez-Santillán, Meneses e Torres-Salado (2015), os quais encontraram uma produção máxima de endoxilanase após 7 dias de fermentação em sacolas de polipropileno usando bagaço de cana-de-açúcar como substrato de crescimento para o fungo *P. ostreatus* linhagem IE8. A combinação de temperatura e tempo foram parecidas às condições de obtenção de endoxilanase estudadas por Terrasan et al. (2013), que usou o fungo termófilo *Penicillium janczewskii* sobre aveia em condição de cultivo submerso a 30 °C e 8 dias.

Considerando as análises estatísticas obtidas através dos gráficos de Pareto, as máximas atividades enzimáticas foram atingidas na configuração $T = 32^{\circ}\text{C}$, $\text{CS} = 30\%$ e $t = 8 \text{ d}$ no caso da endoxilanase (77,1 U/g) e $T = 32^{\circ}\text{C}$, $\text{CS} = 30\%$ e $t = 15 \text{ d}$ para a β -xilosidase (67,3 U/g).

4.7 Efeitos da temperatura, tempo e concentração de substrato na produção de açúcares redutores totais

Os efeitos dos fatores temperatura, tempo e concentração de substrato para a produção de açúcares redutores totais são exibidos na Figura 22. Observa-se que todos os efeitos sobre a variável de resposta deram significância estatística, dos quais a temperatura foi o fator com maior influência quando o nível foi mantido no seu valor baixo de 24 °C. Cada um dos outros efeitos correspondentes ao t e à CS (de primeira ordem) deram uma significância muito similar entre eles, mas, bastante menor comparada com a T . O segundo efeito com maior significância corresponde a combinação dos fatores T e t , os quais aumentaram a obtenção de açúcares redutores enquanto os níveis foram mantidos de acordo com a influência estabelecida pelos efeitos principais (T : 24 °C e t : 8 d).

Figura 22: Gráfico de Pareto para os efeitos pesquisados a 95% de intervalo de confiança dos fatores temperatura (T), tempo (t) e concentração de substrato (CS) na produção de açúcares redutores totais



Fonte: Elaboração própria

Com relação aos efeitos da terceira ordem, é necessário manter a T, o t e a CS nos seus níveis baixos, para permitir um aumento na concentração de açúcares redutores totais. Por último, as interações de segunda ordem entre T e CS, e, t e CS, tiveram um efeito adverso sobre a variável de resposta, este comportamento é explicado em grande parte pela escassa significância mostrada pela variável CS causada pela estreita faixa selecionada para sua avaliação. Considerando as análises estatísticas obtidas através dos gráficos de Pareto, a produção de ART mais alta foi atingida na configuração T = 24 °C, CS = 20% e t = 8 d (4,5 g/L = 27 mg/g).

A produção de ART obtida neste trabalho foi maior que a encontrada por Khalil et al. (2011), que conseguiu 20 mg/g de ART a partir de palha de arroz pré-tratada com uma solução de hidróxido de sódio (1%) usando o fungo *P. ostreatus* linhagem Jacquín ex Fr. sob condições de FES a 25 °C e 20% de CS. Por outro lado, Mena-Espino et al. (2011) obtiveram 42,41 g /L de ART utilizando como substrato resíduos pré-tratados (via ácida) da indústria bananeira após 48 h de hidrólise com extrato enzimático produzido pelo fungo *P. ostreatus*.

Os dados utilizados para avaliar os efeitos dos fatores sobre a produção paralela de ART e enzimas hemi(celulolítica) estão disponíveis no (Apêndice D). Estes dados

foram processados pelo software StatSoft Statistica Enterprise v.10, onde incluíram análise ANOVA apresentado no Apêndice E. Nele, os efeitos dos fatores sobre as variáveis de resposta que foram significativos têm p-valores menores que 0,05 e pode se observar que os coeficientes de correlações para todos os casos deram maior que 0,99, o qual suporta a análise feita dos efeitos da temperatura, concentração de substrato e tempo de fermentação.

4.8 Otimização teórica na produção de açúcares redutores totais

A última fase desta pesquisa foi o desenvolvimento da otimização realizada com os fatores concentração de substrato (CS), temperatura (T) e tempo(t) sobre a produção de açúcares redutores totais (ART). Considerando os resultados obtidos na seção 4.7, relacionados com a significância dos efeitos de todos os fatores, a otimização da produção de ART teve que ser realizada com as três variáveis independentes mencionadas.

Os valores das concentrações de ART obtidos para desenvolver e analisar esta metodologia estão contidos no Apêndice F. Devido ao fato que só é possível visualizar uma superfície de resposta com dois fatores e uma variável dependente, a análise foi feita fixando um fator por vez, assim, a Figura 23a mostra o ponto máximo teórico encontrado para os fatores CS e t quando a temperatura é fixada, a Figura 23b mostra o ponto máximo teórico encontrado para os fatores CS e T quando o tempo é fixado e a Figura 23c mostra o ponto máximo teórico encontrado para os fatores T e t quando a CS é fixada.

A análise da otimização para a variável de resposta, corresponde à Equação 4.1, que resulta da soma das equações de cada modelo matemático gerado pelo programa StatSoft Statistica Enterprise v.10.

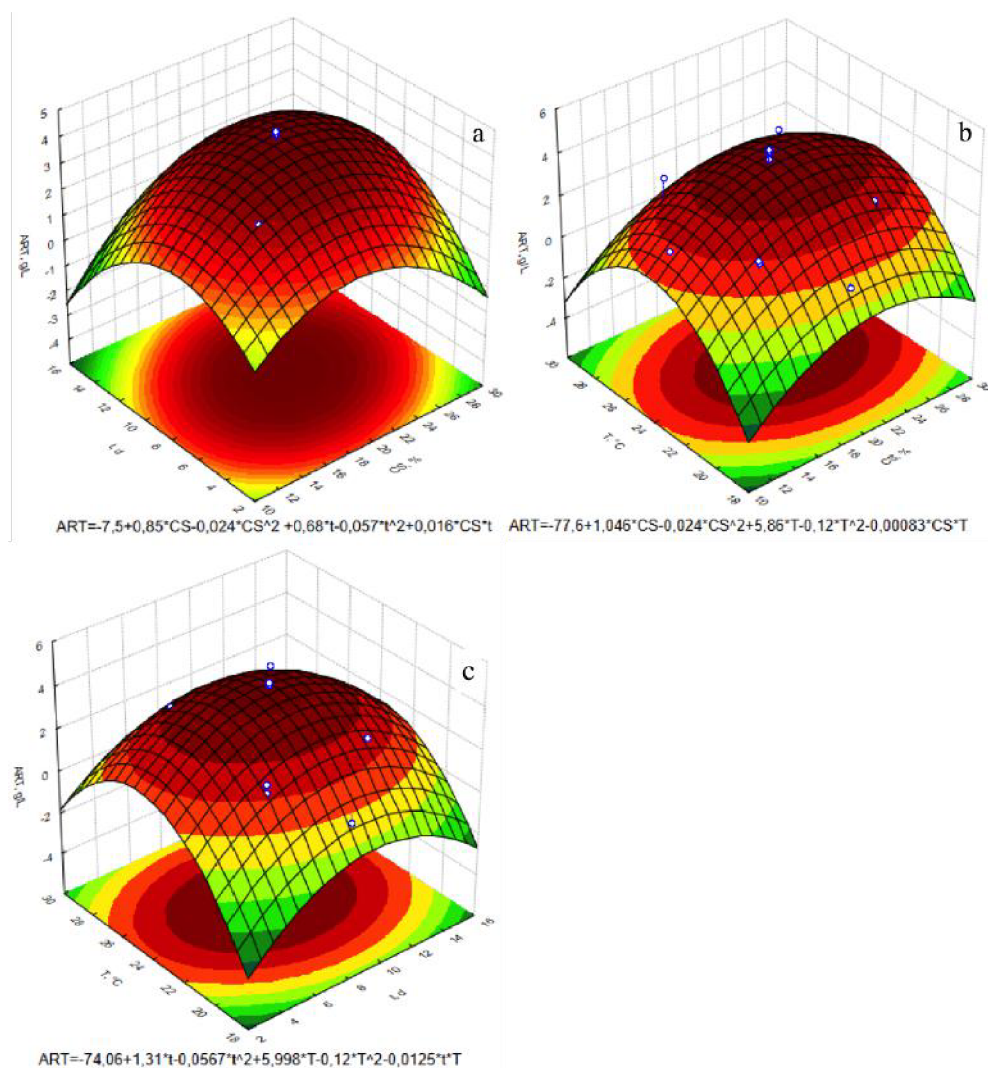
$$\begin{aligned} ART = & -159,43 + 1,895 \cdot CS - 1,984 \cdot t + 11,85 \cdot T - 0,05 \cdot CS^2 - 0,114 \cdot t^2 \\ & + 5,88 \cdot T^2 + 0,016 \cdot CS \cdot t - 0,00083 \cdot CS \cdot T - 0,0125 \cdot t \cdot T \end{aligned} \quad (4.1)$$

Assim o valor máximo predito foi de 4,35 g/L de ART a 24,22 °C, CS = 20,75% e t = 8,94 d, valor que está muito próximo ao valor real encontrado no ponto central (4,36 g/L) sob as condições de 24 °C, tempo de fermentação de 9 dias e uma CS de 20% e ao valor real encontrado na triagem (4,45 g/L) sob a mesma configuração dos fatores (T= 24 °C, CS= 20% e t= 9d).

A concentração máxima de ART obtida neste estudo foi superior às encontradas em pesquisas anteriores; aproximadamente o dobro ao reportado por Silva (2015), que obteve 2,4 g/L de ART usando como biomassa precursora o capim colônia (*panicum paximum*) pré-tratado com ácido sulfúrico e irradiado com micro-ondas. A concentração máxima de ART obtida, é 4 vezes o valor obtido por Mello et al. (2014), que avaliou a capacidade do fungo *Paecilomyces parvisporus* na produção de enzimas celulolíticas usadas

para hidrolisar bagaço de cana-de-açúcar cru, nessa pesquisa a concentração mais alta de ART alcançada foi de 1,07 g/L após 24 h de hidrólise e 7 dias de fermentação para produzir enzimas.

Figura 23: Superfície de resposta para produção de ART sob condições de a) CS e t, b) CS e T e c) t e T



Elaboração própria

Não obstante, a concentração de ART obtida pelo modelo matemático é considerada baixa se comparada com o trabalho de Souza e Souza (2016), que conseguiu 7,73 g/L e 14,09 g/L de ART a partir de *Brachiaria brizantha* crua e pré-tratada com hidróxido de sódio auxiliado por micro-ondas como possível biomassa para obter bioetanol 2G.

CONCLUSÕES

Do ponto de vista técnico, os caules e folhas da espécie floral alstroeméria, podem ser considerados como uma biomassa alternativa para produção de bioetanol de segunda geração, devido ao fato que os teores de celulose, hemiceluloses e lignina estão dentro da faixa de composição química estabelecida na literatura.

De acordo com a composição elementar e de metais, especialmente os teores de carbono e nitrogênio, e as concentrações de manganês e cobre, respectivamente, os resíduos de alstroeméria são um adequado substrato para o correto crescimento e colonização do *P. ostreatus* PLO6 e o apropriado desenvolvimento de atividades relacionadas com a síntese de enzimas que permitem degradar materiais lignocelulósicos.

Neste trabalho, foram produzidas enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e açúcares redutores totais de forma simultânea a partir de resíduos da flor *Alstroemeria sp.* por meio do crescimento do basidiomiceto *P. ostreatus* PLO6 em fermentação em estado sólido. Sob as condições avaliadas no estudo preliminar, a enzima com o maior pico de atividade foi a β -glicosidase e a produção de açúcares foi possível usando uma única etapa.

Dentre todos os efeitos avaliados, o correspondente ao fator temperatura, exibiu a maior significância na produção de enzimas hemi(celulolíticas) e açúcares redutores totais de forma simultânea, exceto a síntese de β -xilosidase que apresentou uma maior influência gerada pelo fator concentração de substrato. Além disso, é possível minimizar a formação de inibidores por causa da degradação da hemiceluloses (furfural), devido a que a síntese de hemicelulases foi potencializada a uma temperatura maior do que a produção de celulasas e açúcares redutores totais, assim, se o sistema fosse mantido a 24 °C poderia se garantir uma menor produção de furfural.

A análise do planejamento central composto feita por meio das superfícies de resposta, indicam as melhores condições de concentração de substrato, temperatura e tempo de fermentação para obter a máxima concentração de açúcares redutores totais, além disso, o modelo matemático gerado, mostrou uma proximidade muito grande com os resultados dos experimentos feitos na triagem e no ponto central.

Os resultados obtidos corroboram a dimensão de pesquisar novas linhagens fúngicas para produzir enzimas do complexo (hemi)celulolítico, para aplicações na obtenção de açúcares fermentescíveis e obtenção de bioetanol 2G, entre outros propósitos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, Valery B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, Elsevier, [S.l.], v. 29, n. 6, p. 675–685, nov./dez. 2011. ISSN 07349750. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000607>>. Acesso em: 13 jul. 2016.
- AGUIAR, André; FERRAZ, André. Mecanismos envolvidos na biodegrada  o de materiais lignocelulósicos e aplica  es tecnológicas correlatas. **Química Nova**, Scielo, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1729 – 1738, 2011. ISSN 01004042. Disponível em: <goo.gl/45mhgK>. Acesso em: 15 set. 2016.
- ALIANÇA POLÍTICA DE COOPERA  O ENTRE OS PAISES: BRASIL, RÚSSIA, ÍNDIA, CHINA E ÁFRICA DO SUL. **Os BRICS**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://bricspolicycenter.org/homolog/sobre_os_brics>. Acesso em: 08 jun. 2016.
- ALRUMMAN, Sulaiman A. Enzymatic saccharification and fermentation of cellulosic date palm wastes to glucose and lactic acid. **Brazilian journal of microbiology**, Elsevier, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 110–119, jan./mar. 2016. ISSN 15178382. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1517838215000167>>. Acesso em: 30 jun. 2016.
- ALVIRA, Petal et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 101, n. 13, p. 4851–4861, jul. 2010. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409015983>>. Acesso em: 04 jun. 2016.
- ARGOTE-V., Fancisco Emilio et al. Evaluación de la producción de etanol a partir de melaza com cepas nativas *saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol  g  a en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, Taller Editorial de la Universidad del Cauca, Popay  n, v. 13, n. 2, p. 40 – 48, jul./dez. 2015. ISSN 16923561. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v13n2/v13n2a05.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2016.
- ARSHADI, M.; GRUNDBERG, H. Biochemical production of bioethanol. In: LUQUE, Rafael; CAMPELO, Juan; CLARK, James (Ed.). **Handbook of biofuels production**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2011. p. 199–220. ISBN 9781845696794.
- ASLAM, Sadia; ASGHER, Muhammad. Partial purification and characterization of ligninolytic enzymes produced by *pleurotus ostreatus* during solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**, Academic Journals, [S.l.], v. 10, n. 77, p. 17875–17883, dez. 2011. ISSN 16845315. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/98307/87594>>. Acesso em: 18 ago. 2015.
- ATKINS, Peter William; JONES, Loretta. **Princípios de química**: Questionando a vida moderno e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: Ed. Médica Panamericana, 2011. 924 p. ISBN 9788540700383.
- AZCÓN-BIETO, Joaquín; TALÓN, Manuel. **Fundamentos de fisiología vegetal**. 2. ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2008. ISBN 9788448151683.

BAEYENS, Jan et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, Elsevier, [S.l.], v. 47, p. 60–88, abr. 2015. ISSN 03601285. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128514000689>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

BALAT, Mustafa. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy conversion and management**, Elsevier, v. 52, n. 2, p. 858–875, fev. 2011. ISSN 01968904. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890410003791>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

BALDRIAN, Petr; VALÁŠKOVÁ, Vendula. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford University Press, Oxford, v. 32, n. 3, p. 501–521, mai. 2008. ISSN 15746976. Disponível em: <<http://femsre.oxfordjournals.org/content/femsre/32/3/501.full.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

BALDRIAN, Petr et al. Degradation of lignocellulose by *pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, Elsevier, [S.l.], v. 156, n. 5-6, p. 670–676, jun./jul. 2005. ISSN 09232508. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250805000835>>. Acesso em: 19 set. 2015.

BANERJEE, Nirupama; BHATNAGAR, Rakesh; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *saccharomyces cerevisiae*. **European journal of applied microbiology and biotechnology**, Springer, [S.l.], v. 11, n. 4, p. 226–228, dez. 1981. ISSN 14320614. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00505872>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

BARI, Ehsan et al. Comparison between degradation capabilities of the white rot fungi *pleurotus ostreatus* and *trametes versicolor* in beech wood. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Elsevier, [S.l.], v. 104, p. 231–237, out. 2015. ISSN 09648305. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830515001262>>. Acesso em: 04 out. 2016.

BARRETO, Andressa Ribas; MENEZES, Cristiano Ragagnin de. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1365–1391, mai./ago. 2015. ISSN 22361170. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/index.php/reget/article/view/16853>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

BENSCHOP, Maarten et al. The global flower bulb industry: Production, utilization, research. In: JANICK, Jules (Ed.). **Horticultural Reviews**. 1. ed. Weinheim: Wiley Online Library, 2010. v. 36, n. 1, cap. 1, p. 1–115. ISBN 9780470527238. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470527238.ch1/pdf>>. Acesso em: 30 jul. 2016.

BHIKHU, More; SHAH, Gaurav. Lignocellulosic material "an alternative future fuel source". **International Journal of Novel Research in Life Sciences**, Novelty Journals, Lucknow, v. 2, n. 4, p. 69–79, jul. 2015. ISSN 2394966X. Disponível em:

<<http://www.noveltyjournals.com/journal/IJNRLS/Issue-4-July-2015-August-2015/0>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

BIOCHEMTEX. **Cellulosic Ethanol Proesa TM**. Tortona, 2014. Disponível em: <<http://www.biochemtex.com/proesa>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

BRAVO, Elizabeth. **Agrocombustíveis, cultivos energéticos e soberania alimentar na América Latina**: Aquecendo o debate sobre agrocombustíveis. 1. ed. Curitiba, 2007. Disponível em: <<http://www.reformaagrariaemdados.org.br/sites/default/files/Agrocombust%C3%ADveis,%20cultivos%20energ%C3%A9ticos%20e%20Soberania%20Alimentar%20na%20Am%C3%A9rica%20Latina%20-%20Elizabeth%20Bravo%20-%20Express~ao%20Popular,%202007.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

BRITISH PETROLEUM. **BP Energy Outlook 2030**: January 2013. Londres, 2013. 86 p. Disponível em: <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/energy-outlook-2015/bp-energy-outlook-booklet_2013.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2016.

_____. **BP Statistical Review of World Energy June 2014**. 63. ed. Londres, 2014. Disponível em: <http://www.bp.com/content/dam/bp-country/de_de/PDFs/brochures/BP-statistical-review-of-world-energy-2014-full-report.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2016.

_____. **BP Statistical Review of World Energy June 2015**. 64. ed. Londres, 2015. Disponível em: <<https://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/energy-economics/statistical-review-2015/bp-statistical-review-of-world-energy-2015-full-report.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

BROWNING, Bertie L. **Methods of wood chemistry**. 1. ed. New York: Interscience Publishers, 1967. 384 p. ISBN 9780470113240.

BUSSAMRA, Bianca Consorti; FREITAS, Sindelia; COSTA, Aline Carvalho da. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 187, p. 173–181, jul. 2015. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415004496>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

CAETANO, Antonio Fernando Tombolato et al. Bulbosas ornamentais no brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, Campinas, v. 16, n. 2, p. 127–138, 2010. ISSN 2447536X. Disponível em: <<https://ornamentalthorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/553/419>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

CASTRO, Aline Machado de; JR, Nei Pereira. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, Scielo, v. 33, n. 1, p. 181–188, 00 2010. ISSN 01004042. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/31.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2015.

CASTRO, Ruann Janser Soares de; SATO, Hélia Harumi. Enzyme production by solid state fermentation: General aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization. **Waste and Biomass Valorization**, Springer, [S.l.], v. 6, n. 6, p. 1085–1093, dez. 2015. ISSN 1877265X. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s12649-015-9396-x>>. Acesso em: 15 out. 2016.

- CHANDEL, Anuj K; SINGH, Om V; SILVA, Silvio Silvério da. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. In: BERNARDES, Marco Aurelio Dos Santos (Ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2011. cap. 10, p. 225–246. ISBN 9789533074788. Disponível em: <<http://cdn.intechweb.org/pdfs/20063.pdf>>. Acesso em: 30 jun. 2016.
- CHEN, Hongzhang. **Biotechnology of Lignocellulose: Theory and practice**. 1. ed. New York: Springer, 2014. 510 p. ISBN 9789400768987.
- COLOMBIA. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA E DESARROLLO RURAL. **El mundo celebra el día de San Valentín con flores colombianas**. Bogotá, 2016. Disponível em: <<https://goo.gl/DOKE7n>>. Acesso em: 03 jun. 2016.
- COLOMBIA. MINISTÉRIO DE MINAS Y ENERGÍA. Decreto n° 4892, de 2011. Por el cual se establece el Uso de Alcoholes Carburantes y Biocombustibles para Vehículos Automotores. **Diario Oficial**, Bogotá, p. 4, dez. 2011. Disponível em: <<https://www.minminas.gov.co/documents/10180//23517//20659-8302.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- COOPERATIVA VEILING HOLAMBRA. **Alstroeméria de corte**. Santo Antônio de Posse, 2010. Disponível em: <<http://bit.ly/2kPGM01>>. Acesso em: 10 fev. 2017.
- CORRÊA, Paulo Roberto Landgraf. **Diagnóstico da Floricultura no Estado de Minas Gerais**. 111 f. Tese (Doutorado em Agronomia) — Departamento de Agricultura. Universidade Federal de Lavras, Lavras, fev. 2006. Disponível em: <<http://goo.gl/69T3an>>. Acesso em: 30 jul. 2016.
- CUEVA, María Bernarda Ruilova; MONZÓN, Aldo Hernández. Evaluación de residuos agrícolas para la producción del hongo pleurotus ostreatus. **Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar**, Redalyc, [S.l.], v. 48, n. 1, p. 54–59, jan./abr. 2014. ISSN 01386204. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223131337008>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- DASHTBAN, Mehdi; SCHRAFT, Heidi; QIN, Wensheng. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, Ivyspring International Publisher, Sydney, v. 5, n. 6, p. 578–595, set. 2009. ISSN 14492288. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2748470/>>. Acesso em: 30 ago. 2016.
- DYK, J. S. Van; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, Elsevier, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 1458–1480, nov./dez. 2012. ISSN 07349750. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000687>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- EBRINGEROVA, Anna; HEINZE, Thomas. Xylan and xylan derivatives—biopolymers with valuable properties, 1. naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular rapid communications**, Wiley Online Library, [S.l.], v. 21, n. 9, p. 542–556, jun. 2000. ISSN 1022-1336. Disponível em: <<http://bit.ly/2emb8Tq>>. Acesso em: 19 set. 2015.

FENG, Li; CHEN, Zhong-lan. Research progress on dissolution and functional modification of cellulose in ionic liquids. **Journal of Molecular Liquids**, Elsevier, [S.l.], v. 142, n. 1-3, p. 1–5, ago. 2008. ISSN 01677322. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732208001190>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

FITZPATRICK, David; MEDINA, Edgar Mauricio Tovar. Fungal genomics. In: KAVANAGH, Kevin (Ed.). **Fungi: Biology and applications**. 2. ed. Oxford: Wiley - Blackwell, 2011. p. 67–93. ISBN 9780470977095.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food and Agriculture 2008: Biofuels: Prospects, risks and opportunities**. 1. ed. Rome, 2008. 128 p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100e/i0100e.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

FRANCE, Andre; CAÑUMIR, Juan Antonio V.; CORTEZ, Mónica A. **Producción de Hongos Ostras**. Chillán, 2000. 32 p. Disponível em: <<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR25631.pdf>>. Acesso em: 29 ago. 2016.

GANDINI, Alessandro; BELGACEM, Mohamed Naceur. The state of the art. In: GANDINI, Alessandro; BELGACEM, Mohamed Naceur (Ed.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 1–16. ISBN 9780080453163. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453163000016>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

GELLERSTEDT, Göran; HENRIKSSON, Gunnar. Lignins: Major sources, structure and properties. In: GANDINI, Alessandro; BELGACEM, Mohamed Naceur (Ed.). **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 201–224. ISBN 9780080453163. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080453163000090>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

GÍRIO, Francisco M et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 101, n. 13, p. 4775–4800, jul. 2010. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410001744>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

GOLDEMBERG, José. Biomassa e energia. **Química Nova**, Scielo, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 582–587, mar. 2009. ISSN 16787064. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422009000300004&script=sci_arttext>. Acesso em: 08 jul. 2016.

GONÇALVES, Aline Zorzetto Lopes. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos por fermentação em estado sólido utilizando resíduos sólidos agroindustriais, visando potencial aplicação na produção animal**. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, jul. 2010. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/103955>>. Acesso em: 01 set. 2016.

GONÇALVES, Fabiano Avelino; SANTOS, Everaldo Silvino dos; MACEDO, Gorete Ribeiro de. Alcoholic fermentation of *saccharomyces cerevisiae*, *pichia stipitis* and *zymomonas mobilis* in the presence of inhibitory compounds and

- seawater. **Journal of basic microbiology**, Wiley Online Library, Weinheim, v. 55, n. 6, p. 695–708, mar. 2015. ISSN 1521-4028. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.201400589/full>>. Acesso em: 30 jun. 2016.
- GORDON, Hanks. **A review of production statistics for the cut-flower and foliage sector 2015**. Kenilworth, 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/WHGAma>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- GUADARRAMA-MENDOZA, P.C. et al. Morphology and mycelial growth rate of pleurotus spp. strains from the mexican mixtec region. **Brazilian Journal of Microbiology**, scielo, São Paulo, v. 45, n. 3, p. 861–872, set. 2014. ISSN 15178382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v45n3/16.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- GUPTA, Anubhuti; VERMA, Jay Prakash. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, [S.l.], v. 41, p. 550–567, jan. 2015. ISSN 13640321. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032114007084>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- GUTIÉRREZ-ROJAS, Ivonne; MORENO-SARMIENTO, Nubia; MONTOYA, Dolly. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. **Revista Iberoamericana de Micología**, Elsevier, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 1–12, mar. 2015. ISSN 11301406. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140614000138>>. Acesso em: 02 jun. 2016.
- HAMMEL, Kenneth E; CULLEN, Dan. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis. **Current Opinion in Plant Biology**, Elsevier, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 349–355, jun. 2008. ISSN 13695266. Physiology and Metabolism - Edited by Markus Pauly and Kenneth Keegstra. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369526608000319>>. Acesso em: 15 set. 2016.
- HEINZE, Thomas. Cellulose: Structure and properties. In: ROJAS, J. Orlando (Ed.). **Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, nanocelluloses and advanced materials**. 1. ed. Cham: Springer International Publishing, 2015, (271). cap. 1, p. 1–52. ISBN 9783319260150. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F12_2015_319>. Acesso em: 15 jul. 2016.
- HOA, Ha Thi; WANG, Chun-Li. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (pleurotus ostreatus and pleurotus cystidiosus). **Mycobiology**, The Korean Society of Mycology, [S.l.], v. 43, n. 1, p. 14–23, mar. 2015. ISSN 20929323. Disponível em: <<http://synapse.koreamed.org/Synapse/Data/PDFData/0184MB/mb-43-14.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- HOAREAU, William et al. Sugar cane bagasse and curaua lignins oxidized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. **Polymer Degradation and Stability**, Elsevier, [S.l.], v. 86, n. 3, p. 567–576, dez. 2004. ISSN 01413910. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014139100400237X>>. Acesso em: 03 out. 2016.

- HOFRICHTER, Martin. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (mnp). **Enzyme and Microbial Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 454–466, abr. 2002. ISSN 01410229. Recent Advances in Lignin Biodegradation. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901005282>>. Acesso em: 15 set. 2016.
- HUMBIRD, David et al. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. 1. ed. Golden, 2011. 137 p. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/fy11osti/47764.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- IANDOLO, Donata et al. Fungal solid state fermentation on agro-industrial wastes for acid wastewater decolorization in a continuous flow packed-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 102, n. 16, p. 7603–7607, ago. 2011. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411006894>>. Acesso em: 05 out. 2016.
- INEOSBIO. **Bioethanol**: Summary. Vero Beach, 2015. Disponível em: <<http://www.ineos.com/businesses/ineos-bio/products>>. Acesso em: 23 jun. 2016.
- INFORMATION HANDLING SERVICES. **IHS McCloskey Coal Report**. Douglas County, 2014. 32 p. Disponível em: <https://www.ihs.com/ja/pdf/IHS-Coal-Insight_201028111113060132.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2016.
- INSTITUTO PARA LA DIVERSIFICACIÓN Y AHORRO DE ENERGÍA. **Biomasa: Cultivos energéticos**. Madrid: BESEL, 2007. 53 p. ISBN 9788496680173. Disponível em: <<http://goo.gl/OjTbAC>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **2006 IPCC Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories**. Hayama, 2006. v. 1. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol1.html>>. Acesso em: 18 jun. 2016.
- _____. **Climate change 2013**: The physical science basis. working group i contribution to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Nova York, 2013. 1522 p. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- _____. **Climate Change 2014**: Impacts, adaptation and vulnerability. part a: Global and sectoral aspects. contribution of working group ii to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge and Nova York, 2014. 1132 p. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg2/>>. Acesso em: 02 jun. 2016.
- _____. **Climate Change 2014**: Synthesis report. Geneva, 2014. 151 p. Disponível em: <<http://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/>>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **Global Renewable Energy: Ethanol blending mandate**. Paris, 2015. Disponível em: <<http://goo.gl/Hf6RDX>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- _____. **Key World Energy Statistics 2016**. Paris, 2016. 80 p. Disponível em: <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld_Statistics_2015.pdf>. Acesso em: 08 jun. 2016.

INTERNATIONAL MYCOLOGICAL ASSOCIATION. **Mycobank Database**: Fungal name search. Utrecht, 2016. Disponível em: <goo.gl/hHvQIJ>. Acesso em: 30 ago. 2016.

IOWA STATE UNIVERSITY. **Ada Hayden Herbarium**: *Pleurotus ostreatus* (jacq.: Fr.) kummer. Ames, 2008. Disponível em: <goo.gl/Sa6cnm>. Acesso em: 30 ago. 2016.

JANSEN, Roland A. First and second generation biofuels. In: VCH, Wiley (Ed.). **Second generation biofuels and biomass**: Essential guide for investors, scientists and decision makers. 1. ed. Weinheim: John Wiley & Sons, 2013. p. 21 – 29. ISBN 9783527653003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527652976.ch2/pdf>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

JANSSEN, Rainer; RUTZ, Dominik Damian. Sustainability of biofuels in latin america: risks and opportunities. **Energy Policy**, Elsevier, [S.l.], v. 39, n. 10, p. 5717–5725, out. 2011. ISSN 03014215. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301421511000589>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

JEU, M. J. de et al. Sexual reproduction biology of *alastroemeria*. In: SANIEWSKI, M.; BEIJERSBERGEB, J.C.M.; BOGATKO, W. (Ed.). **VI International Symposium on Flower Bulbs**. Skierniewice: International Society for Horticultural Science, 1992. p. 571–576. ISBN 9789066052352. Disponível em: <http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=325_80>. Acesso em: 17 ago. 2016.

JU, Yi-Hsu et al. Analysis of soluble and insoluble fractions of alkali and subcritical water treated sugarcane bagasse. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, [S.l.], v. 83, n. 2, p. 591–599, jan. 2011. ISSN 01448617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710006429>>. Acesso em: 03 out. 2016.

JUNQUEIRA, Antonio Hélio; SILVA, Márcia Peetz da. O setor produtivo de flores e plantas ornamentais do brasil, no período de 2008 a 2013: Atualizações, balanços e perspectivas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Sociedade Brasileira de Floricultura e Plantas Ornamentais, Campinas, v. 20, n. 2, p. 115–120, 2014. ISSN 2447536X. Disponível em: <<https://ornamentalthorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/view/727/534>>. Acesso em: 30 jul. 2016.

JUTAKANOKI, Rumpa et al. Sugarcane leaves: pretreatment and ethanol fermentation by *saccharomyces cerevisiae*. **biomass and bioenergy**, Elsevier, [S.l.], v. 39, p. 283–289, abr. 2012. ISSN 09619534. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953412000190>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

KAMMEN, Daniel M. Renewable energy, taxonomic overview. In: CLEVELAND, Cutler J. (Ed.). **Encyclopedia of Energy**. New York: Elsevier, 2004. p. 385 – 412. ISBN 9780121764807. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B012176480X003089>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

KARP, Susan Grace et al. Characterization of laccase isoforms produced by *pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 114, p. 735–739, jun. 2012. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412005019>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

_____. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. **BioMed research international**, Hindawi Publishing Corporation, London, v. 2015, p. 1–8, 2015. ISSN 23146133. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/181204/abs/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

KHALIL, Md Ibrahim et al. Production of cellulase by *pleurotus ostreatus* and *pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, The Scientific and Technological Research Council of Turkey, Ankara, v. 35, n. 4, p. 333–341, ago. 2011. ISSN 13036173. Disponível em: <<http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-11-35-4/tar-35-4-1-1002-684.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

KIM, Sun Min et al. Improvement of sugar yields from corn stover using sequential hot water pretreatment and disk milling. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 216, p. 706–713, set. 2016. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241630801X>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

KNOTHE, Gerhard; KRAHL, Jürgen; GERPEN, Jon Van (Ed.). **The Biodiesel Handbook**. 2. ed. Urbana: AOCS press, 2005. 501 p. ISBN 9781893997622.

KOUTROTSIOS, Georgios et al. Bioconversion of lignocellulosic residues by *agrocye cylindracea* and *pleurotus ostreatus* mushroom fungi –assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. **Food Chemistry**, Elsevier, [S.l.], v. 161, p. 127–135, out. 2014. ISSN 03088146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881461400524X>>. Acesso em: 19 set. 2015.

KUPIAINEN, Laura; AHOLA, Juha; TANSKANEN, Juha. Hydrolysis of organosolv wheat pulp in formic acid at high temperature for glucose production. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 116, p. 29–35, jul. 2012. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412006141>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

KURT, Sebnem; BUYUKALACA, Saadet. Yield performances and changes in enzyme activities of *pleurotus* spp.(*p. ostreatus* and *p. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 101, n. 9, p. 3164–3169, mai. 2010. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409016393>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

LASER, Mark et al. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 81, n. 1, p. 33–44, jan. 2002. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401001031>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

LEE, Ok Kyung; LEE, Eun Yeol. Sustainable production of bioethanol from renewable brown algae biomass. **Biomass and Bioenergy**, Elsevier, [S.l.], v. 92, p. 70–75, set. 2016. ISSN 09619534. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953416300903>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

LEÓN, Tomás. Agrobiocombustibles y ambiente: La nueva reconfiguración del campo colombiano. **Gestión y Ambiente**, Universidad Nacional de Colombia, v. 10, n. 3, p. 53–60, dez. 2007. ISSN 0124177X. Disponível em: <<http://goo.gl/paQ9JK>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Elsevier, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 1–11, set. 2012. ISSN 20010370. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037014600957>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

LIDE, David; HAYNES, W.; BRUNO, Thomas. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 95. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2014. 2666 p. ISBN 139781482208689.

LIGUORI, Rossana et al. Optimization of arundo donax saccharification by (hemi) cellulolytic enzymes from pleurotus ostreatus. **BioMed research international**, Hindawi Publishing Corporation, London, v. 2015, p. 1–14, 2015. ISSN 23146133. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/951871/abs/>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

LIMA, Fernanda Valadares De. **Produção e uso de enzimas derivadas do fungo Pleurotus ostreatus na hidrólise de bagaço de cana pré-tratado por processo quimiotermomecânico**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Biotecnologia Industrial) — Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, dez. 2013. Disponível em: <<http://bit.ly/2kjlxpj>>. Acesso em: 19 set. 2015.

LIMAYEM, Alya; RICKE, Steven C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, Elsevier, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 449–467, fev. 2012. ISSN 03601285. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360128512000172>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

LIZARAZU RAMIRO E ALIAGA LORDEMANN, Javier. Escenarios de emisión de gases de efecto invernadero co2 en el sector energético en bolivia. **Revista Latinoamericana de Desarrollo Económico**, Universidade Católica Boliviana "San Pablo", Obrajes, n. 19, p. 77 – 98, mai. 2013. ISSN 20744706. Disponível em: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2074-47062013000100004&nrm=iso>. Acesso em: 01 mai. 2016.

LUQUE, Rafael; CAMPELO, Juan; CLARK, James. Introduction: An overview of biofuels and production technologies. In: LUQUE, Rafael; CAMPELO, Juan; CLARK, James (Ed.). **Handbook of biofuels production**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2011. cap. 1, p. 3–12. ISBN 9781845696794.

LUZ, José Maria Rodrigues Da et al. Lignocellulolytic enzyme production of pleurotus ostreatus growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, scielo, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 1508–1515, 12 2012. ISSN 15178382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v43n4/35.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MÄKELÄ, Miia R.; DONOFRIO, Nicole; VRIES, Ronald P. de. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Elsevier, [S.l.], v. 72, p. 2–9, nov. 2014.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087184514001534>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

MALAVOLTA, Eurípedes; VITTI, Godofredo Cesar; OLIVEIRA, Sebastião Alberto de. **Avaliação do estado nutricional das plantas**: Princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1997. 319 p. ISBN 9788531800196.

MANAVALAN, Tamilvendan; MANAVALAN, Arulmani; HEESE, Klaus. Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. **Current Microbiology**, Springer, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 485–498, abr. 2015. ISSN 14320991. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00284-014-0743-0>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

MARTÍNEZ, Daniel Alfredo et al. Evaluación del crecimiento micelial de pleurotus ostreatus y agrocybe aegerita sobre orujos de pera/mycelial growth evaluation of pleurotus ostreatus and agrocybe aegerita on pear pomaces. **Anales de Biología**, ProQuest, [S.l.], n. 37, p. 1–10, 2015. ISSN 11383399. Disponível em: <<http://goo.gl/JWyE5M>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

MELLO, Andreza Lopes de et al. Avaliação de celulasas de isolados fungícos para produção de etanol lignocelulósico. In: UNIVERSIDADE DE RIO VERDE. **VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde**. Rio Verde: Universidade de Rio Verde, 2014. ISSN 21790574. Disponível em: <<http://www.eventosfesurv.com.br/fckfiles/files/CICURV%202014.pdf>>. Acesso em: 28 nov. 2016.

MENA-ESPINO, Xenia et al. Saccharification with phanerochaete chrysosporium and pleurotus ostreatus enzymatic extracts of pretreated banana waste. **African Journal of Biotechnology**, Academic Journals, [S.l.], v. 10, n. 19, p. 3824–3834, fev. 2011. ISSN 16845315. Disponível em: <<http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/93536/82961>>. Acesso em: 15 out. 2016.

MENON, Vishnu; RAO, Mala. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, Elsevier, [S.l.], v. 38, n. 4, p. 522–550, ago. 2012. ISSN 03601285. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036012851200007X>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

MILES, Philip G.; CHANG, Shu-Ting. **Mushroom Biology**: Concise basics and current developments. 1. ed. Singapore: World Scientific, 1997. 194 p. ISBN 9810228775.

MILLER, Gail Lorenz. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030>>. Acesso em: 20 ago. 2015.

MILNE, T. A.; BRENNAN, A. H.; GLENN, Barbara H. **Sourcebook of methods of analysis for biomass and biomass conversion processes**. 1. ed. London and New York: Elsevier, 1990. 343 p. ISBN 1851665277. Disponível em: <<http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/3548.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2015.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Balanco Energético Nacional 2014**: Relatório síntese ano base 2013. Brasília, 2014. 53 p. Disponível em: <<https://goo.gl/c5HLq9>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

_____. **Balanco Energético Nacional 2015**: Relatório síntese ano base 2014. Brasília, 2015. 61 p. Disponível em: <<http://bit.ly/2fqM1kz>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

_____. **Resenha Energética Brasileira**: Exercício d 2014. Brasília, 2015. 32 p. Disponível em: <<http://goo.gl/CikJo6>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

_____. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**. Brasília, 2016. 22 p. Disponível em: <<http://goo.gl/iWm51S>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

MOJOVIĆ, Ljiljana et al. Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, National Library of Serbia, Belgrado, v. 15, n. 4, p. 211–226, jan./mar. 2009. ISSN 14519372. Disponível em: <<http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1451-9372/2009/1451-93720904211M.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

MONTEIRO, Cristina. **Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe**. San José, 2010. Disponível em: <<http://goo.gl/VXYLKA>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

MONTEIRO, Marcos Roberto et al. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. **Talanta**, [S.l.], v. 77, n. 2, p. 593–605, 12 2008. ISSN 00399140. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914008005055>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009. 684 p. ISBN 9780470128664.

MORAIS, Sérgio Antônio Lemos DE; NASCIMENTO, Evandro Afonso do; MELO, Dárley Carrijo de. Análise da madeira de pinus oocarpa parte i: Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Árvore**, Scielo, Viçosa, v. 29, n. 03, p. 461–470, mai./jun. 2005. ISSN 18069088. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rarv/v29n3/a14v29n3.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2016.

MORETTI, Marcia M. S. et al. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, scielo, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 1062–1071, set. 2012. ISSN 15178382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v43n3/32.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.

MORIN, Edgar. **La Vía para el futuro de la humanidad**. 1. ed. Barcelona: Espasa Libros, 2011. 297 p. ISBN 9788449325939.

MOSSI AND GHISOLFI GROUP. **News**: The world's first plant for the production of second generation biofuels has been opened in northern italy. Tortona, 2013. Disponível em: <<http://www.gruppomg.com/en/about/group-profile>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

NACIONES UNIDAS. **La situación demográfica en el mundo en 2014**. Nueva York, 2014. 2 p. Disponível em: <<http://goo.gl/eh1rxF>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

NAIK, SN et al. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 578–597, fev. 2010. ISSN 13640321. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109002342>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

NARANJO, Cuauhtémoc De Dios et al. Aislamiento y caracterización de celulosas obtenidas de fibras de agave salmiana aplicando dos métodos de extracción ácido-álcali. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 31–43, fev. 2016. ISSN 20079230. Disponível em: <<http://bit.ly/2knEley>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION. **Global Climate Change, Vital Signs of the Planet. Ice Land**. Washington, 2014. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/vital-signs/land-ice/>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

_____. **Global Climate Change, Vital Signs of the Planet. Carbon Dioxide**. Washington, 2016. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/vital-signs/carbon-dioxide/>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

_____. **Global Climate Change, Vital Signs of the Planet. Sea Level**. Washington, 2016. Disponível em: <<http://climate.nasa.gov/vital-signs/sea-level/>>. Acesso em: 01 jun. 2016.

NILADEVI, K.N. Ligninolytic enzymes. In: NIGAM, Poonam Singh nee'; PANDEY, Ashok (Ed.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 397–414. ISBN 9781402099427. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-9942-7_22>. Acesso em: 15 set. 2016.

NUNES, Hayssa Carolini Alamar et al. Obtenção de celulases por fungos cultivados em sistema submerso com resíduos de pupunha. **Revista de Estudos Ambientais**, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, v. 1, n. 1, p. 16–26, jan./jun. 2015. ISSN 19831501. Disponível em: <<http://proxy.furb.br/ojs/index.php/rea/article/view/4785>>. Acesso em: 15 out. 2016.

OKAMOTO, Kenji et al. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *trametes hirsuta*. **Enzyme and Microbial Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 48, n. 3, p. 273–277, mar. 2011. ISSN 01410229. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022910002607>>. Acesso em: 11 jul. 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION & DEVELOPMENT AND FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **OECD Agriculture Statistics (database)**: Biofuel - oecd-fao agricultural outlook 2015 - 2024. Paris: OECD iLibrary, 2015. Disponível em: <http://stats.oecd.org/BrandedView.aspx?oecd_bv_id=agr-data-en&doi=data-00736-en>. Acesso em: 17 jun. 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION & DEVELOPMENT AND FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Oecd-fao agricultural outlook 2015 - 2024*. In: **Biofuels**. Paris: OECD Publishing, 2015. cap. 3. Commodity snapshots, p. 126 – 142. ISBN 9789264232037. Disponível em:

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Oilcrops/Documents/OECD_Reports/OECD_biofuels2015_2024.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2016.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.

Members and Partners. Paris, 2016. Disponível em: <<http://www.oecd.org/about/membersandpartners/>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

OZKAN, B. et al. Production structure and main marketing problems of export oriented cut flower industry in turkey. In: TÜZEL, Y. et al. (Ed.). **International Symposium Greenhouse Management for Better Yield & Quality in Mild Winter Climates.** Antalya: International Society for Horticultural Science, 1999. p. 481–488. ISSN 24066168. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/491/491_76.htm>. Acesso em: 27 jul. 2016.

PAL, Siddhartha et al. Effect of mixed acid catalysis on pretreatment and enzymatic digestibility of sugar cane bagasse. **Energy & Fuels**, American Chemical Society, Washington, v. 30, n. 9, p. 7310–7318, set. 2016. ISSN 08870624. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.6b01011>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier, [S.l.], v. 13, n. 2–3, p. 81–84, mar. 2003. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X02001213>>. Acesso em: 15 out. 2016.

PANDEY, Ashok et al. (Ed.). **Pretreatment of biomass: Processes and technologies.** 1. ed. Amsterdam and Oxford: Elsevier, 2015. 258 p. ISBN 9780128000809. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780128000809>>. Acesso em: 29 jun. 2016.

PATEL, Hardik; GUPTE, Akshaya; GUPTE, Shilpa. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate pleurotus ostreatus hp-1 under solid state fermentation. **BioResources**, North Carolina State University, Raleigh, v. 4, n. 1, p. 268–284, fev. 2009. ISSN 19302126. Disponível em: <<http://bit.ly/29R1JkW>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Springer International Publishing, [S.l.], v. 5, n. 2, p. 53–63, abr. 2002. ISSN 11396709. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10123-002-0062-3>>. Acesso em: 05 set. 2016.

PÉREZ, Lilia Carolina Rojas; PIÑEROS-CASTRO, Yineth; LOZANO, Mario Enrique Velásquez. Producción de azúcares fermentables a partir de fibra prensada de palma de aceite pretratada biológicamente por pleurotus ostreatus y phanerochaete chrysosporium. **Revista ION**, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, v. 24, n. 2, p. 29–35, 2011. ISSN 0120100X. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/rion/v24n2/v24n2a05.pdf>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

PERIÓDICO EL ECONOMISTA. Petróleo, barril de pólvora para la economía global. **El Economista**, El economista S. A., México, DF, jun. 2016. Disponível em: <<http://bit.ly/1ZZ6QHD>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

PETRÓLEO BRASILEIRO. **Fatos e Dados**: Entenda 10 questões sobre a nossa gasolina. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/fatos-e-dados/entenda-dez-questoes-sobre-a-nossa-gasolina.htm>>. Acesso em: 29 jun. 2016.

PINKERT, André et al. Ionic liquids and their interaction with cellulose. **Chemical Reviews**, American Chemical Society, Washington, v. 109, n. 12, p. 6712–6728, set. 2009. ISSN 00092665. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cr9001947>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

QUEVEDO, Balkys et al. Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using pleurotus ostreatus. **Universitas Scientiarum**, Scielo, Bogotá, v. 20, n. 1, p. 117 – 127, 04 2015. ISSN 01227483. Disponível em: <<http://goo.gl/mmXyZW>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

QUIROZ-CASTAÑEDA, Rosa E.; FOLCH-MALLOL, Jorge L. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. **Biotecnología Aplicada**, Scielo, La Habana, v. 28, n. 4, p. 205 – 215, set./dez. 2011. ISSN 10272852. Disponível em: <<http://scielo.sld.cu/pdf/bta/v28n4/bta01411.pdf>>. Acesso em: 30 ago. 2016.

QUIROZ-CASTAÑEDA, Rosa Estela; FOLCH-MALLOL, Jorge Luis. Hydrolysis of biomass mediated by cellulases for the production of sugars. In: CHANDEL, Anuj K; SILVA, Silvio Silvério Da (Ed.). **Sustainable degradation of lignocellulosic biomass - Techniques, applications and commercialization**. 1. ed. Rijeka: InTech, 2013. cap. 6, p. 119–155. ISBN 9789535111191. Disponível em: <<http://bit.ly/2cl0tvX>>. Acesso em: 19 set. 2015.

RABELO, Sarita Cândida. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração**. 414 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) — Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, abr. 2010. Disponível em: <<http://pct.capes.gov.br/teses/2010/33003017034P8/TES.PDF>>. Acesso em: 04 jun. 2016.

RADHIKA, R; JEBAPRIYA, G Roseline; GNANADOSS, J Joel. Production of cellulase and laccase using pleurotus sp. under submerged and solid-state fermentation. **International Journal of Current Science**, New Liberty Group, [S.l.], v. 6, p. 7–13, abr. 2013. ISSN 22501770. Disponível em: <<http://www.currentsciencejournal.info/downloadarticle.php?artid=334>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

RAÍZEN. **Tecnologia em energia renovável**: Etanol de segunda geração. Piracicaba, 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/v1LUQo>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

REVISTA SEMANA. Relación dólar y petróleo. **Revista Semana**, Publicaciones Semana S. A., Bogotá, jul. 2015. Disponível em: <<http://bit.ly/1Ugi8Dg>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

RIANO, A. M. Sánchez et al. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. **Dialnet**, Universidad de la Rioja, Tumbaga, v. 1, n. 5, p. 61–91, 2010. ISSN 19094841. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3628225>>. Acesso em: 05 jun. 2016.

- RIJSWICK, Cindy Van. **World Floriculture Map 2015**. 475. ed. Utrecht, 2015. Disponível em: <https://www.rabobank.com/en/images/World_Floriculture_Map_2015_vanRijswick_Jan2015.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2016.
- RIZKI, Maharani; TAMAI, Yutaka. Effects of different nitrogen rich substrates and their combination to the yield performance of oyster mushroom (*pleurotus ostreatus*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Netherlands, [S.l.], v. 27, n. 7, p. 1695–1702, jul. 2011. ISSN 15730972. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11274-010-0624-z>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- RODRIGUES, P.F.F. et al. Estudos de prétratamentos de casca de arroz e de macaxeira, como biomassas lignocelulósicas, visando sua conversão em etanol. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE QUÍMICA. **55º Congresso Brasileiro de Química. Recursos Renováveis: Inovação e tecnologia**. Goiania: Associação Brasileira de Química, 2015. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2015/trabalhos/11/8071-14446.html>>. Acesso em: 04 jun. 2016.
- RODRIGUES, Patrícia de Oliveira. **Ação sinérgica de celulases e hemicelulases fúngicas na hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento alcalino**. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Biocombustíveis) — Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Química, Uberlândia, fev. 2016.
- RODRÍGUEZ, Davinia Salvachúa. **Producción de etanol de segunda generación a partir de paja de trigo**: Hongos, enzimas fúngicas y aplicaciones. 196 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) — Faculdade de Ciências Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, mai. 2013. Disponível em: <<http://eprints.ucm.es/22855/>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- RÜHL, Christof. **BP Statistical Review of World Energy Junio de 2014**: La energía en 2013: haciendo balance. Londres, 2014. 15 p. Disponível em: <<http://on.bp.com/2eJmocg>>. Acesso em: 08 jun. 2016.
- RUTZ, Dominik; JANSSEN, Rainer. **BioFuel Technology Handbook**. 1. ed. München, 2007. 149 p. Disponível em: <http://www.co2star.eu/publications/BioFuel_Technology_Handbook_1vs_WIP.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2016.
- RYTIOJA, Johanna et al. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from basidiomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, American Society for Microbiology, Washington, v. 78, n. 4, p. 614–649, dez. 2014. ISSN 10922172. Disponível em: <<http://mmbr.asm.org/content/78/4/614.full>>. Acesso em: 19 set. 2015.
- SAHA, Badal C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Springer, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 279–291, mai. 2003. ISSN 14765535. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-003-0049-x>>. Acesso em: 18 jul. 2016.
- SALVACHÚA, Davinia et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 102, n. 16, p. 7500–7506, ago. 2011. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852411006870>>. Acesso em: 04 out. 2016.

SÁNCHEZ., Alba Nora Bernal. **Diagnóstico del manejo de residuos de clavel generados en la industria floricultura de la sabana de Bogotá y la factibilidad técnica-ambiental para su aprovechamiento como compostaje mecanizado y biogas**. 114 f. Dissertação (Especialização em Engenharia Ambiental) — Universidad Industrial de Santander, Bogotá, nov. 2005. Disponível em: <<http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/7559/2/118708.pdf>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

SANCHEZ, Sergio; DEMAINE, Arnold L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, American Chemical Society, Washington, v. 15, n. 1, p. 224–230, jan. 2011. ISSN 1083-6160. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/op100302x>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

SÁNCHEZ-SANTILLÁN, Paulino; MENESES, Marcos Mayo; TORRES-SALADO, Nicolás. Production of lignocellulolytic enzymes with *Pleurotus ostreatus* by solid fermentation and its effect on the chemical composition of sugarcane bagasse. **Life Science Journal**, Acta Zhengzhou University Overseas, New York, v. 12, n. 2s, p. 37–41, fev. 2015. ISSN 2372613X. Disponível em: <http://www.lifesciencesite.com/ljsj/life1202s15/006_A00376life1202s15_LifeSI26_37_41.pdf>. Acesso em: 19 set. 2015.

SANTOS, Bruna Silveira Lamanes Dos et al. Thermotolerant and mesophilic fungi from sugarcane bagasse and their prospecting for biomass-degrading enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, scielo, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 903–910, jul./set. 2015. ISSN 1517-8382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v46n3/1678-4405-bjm-46-20140393.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2015.

SARKAR, Nibedita et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, Elsevier, [S.l.], v. 37, n. 1, p. 19–27, jan. 2012. ISSN 09601481. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096014811100382X>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

SAULNIER, Luc et al. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, [S.l.], v. 26, n. 4, p. 279–287, 1995. ISSN 01448617. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144861795000208>>. Acesso em: 18 jul. 2016.

SECRETARÍA DE ENERGÍA. **Balance Nacional de Energía 2014**. México, DF, 2015. Disponível em: <<https://goo.gl/mgTHN4>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Caracterização da Floricultura Brasileira**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/wp-content/uploads/2015/12/2013_12_03_RT_Outubro_Agronegocio_Floricultura_pdf.pdf>. Acesso em: 03 jun. 2016.

_____. **Flores e Plantas Ornamentais do Brasil**. 1. ed. Brasília, 2015. v. 2. Disponível em: <<http://goo.gl/52Yz0y>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

_____. _____. 1. ed. Brasília, 2015. v. 1. Disponível em: <<http://goo.gl/W8zwCG>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

SHEEHAN, John; HIMMEL, Michael. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the us department of energy's research and development activities for bioethanol. **Biotechnology Progress**, Wiley Online Library, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 817–827, 1999. ISSN 15206033. Disponível em: <<http://bit.ly/2dcgUI0>>. Acesso em: 19 set. 2015.

SILVA, Alexandre Ferreira da et al. **Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol Sistema BRS1G–Tecnologia Qualidade Embrapa**. 1. ed. Sete Lagoas: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2012. 120 p. ISSN 15184277. Disponível em: <<https://goo.gl/KqmCrE>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

SILVA, Taís Lima Da. **Uso da radiação de micro-ondas no pré-tratamento ácido para incremento da hidrólise enzimática de capim colômbio (*panicum paximum*)**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) — Instituto Federal Goiano, Rio Verde, 2015.

SINGH, Poonam nee' Nigam; GUPTA, Nutan; ANTHWAL, Ashish. Pre-treatment of agro-industrial residues. In: NEE'NIGAM, Poonam Singh; PANDEY, Ashok (Ed.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. v. 1, p. 13–33. ISBN 9781402099427. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7_2>. Acesso em: 18 ago. 2016.

SINGH, Renu; SRIVASTAVA, Monika; SHUKLA, Ashish. Environmental sustainability of bioethanol production from rice straw in india: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, [S.l.], v. 54, p. 202–216, fev. 2016. ISSN 13640321. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115010801>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

SINGHANIA, Reeta Rani et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Elsevier, [S.l.], v. 44, n. 1, p. 13–18, abr. 2009. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X08003331>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; WEST, Donald M. **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. São Paulo: Trilha, 2014. 955 p. ISBN 9788522116607.

SOUZA, Carlos Frederico Castro de; SOUZA, Geraldo Pereira neto de. Uso de pré-tratamentos e coquetéis enzimáticos para etanol celulósico a partir de bagaço de cana-de-açúcar. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. **I Workshop do Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis e II Workshop do Núcleo de Biorrefinaria da Rede Mineira de Química**. Uberlândia: Rede Mineira de Química, 2016.

SPIRIDON, Iuliana; POPA, Valentin I. Hemicelluloses. In: DUMITRIU, Severian (Ed.). **Polysaccharides: Structure and properties**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. cap. 1, p. 1–168. ISBN 9780824754808.

STEWART, Derek; MCDOUGALL, Gordon J.; BATY, Annette. Fourier-transform infrared microspectroscopy of anatomically different cells of flax (*linum usitatissimum*) stems during development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, ACS Publications, Washington, v. 43, n. 7, p. 1853–1858, jul. 1995. ISSN 00218561. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00055a019>>. Acesso em: 03 out. 2016.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, Elsevier, [S.l.], v. 83, n. 1, p. 1–11, mai. 2002. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852401002127>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY. **Publications & Standards**: Tappi standards & methods. Peachtree Corners, 2017. Disponível em: <<https://www.tappi.org>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

TEIXEIRA, Bruno Ribeiro; WENDLING, Beno. **Solos nos biomas brasileiros**: Sustentabilidade e mudanças climáticas. 1. ed. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2014. 337 p. ISBN 9788570783585.

TEJADO, A. et al. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol–formaldehyde resin synthesis. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 98, n. 8, p. 1655–1663, mai. 2007. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406002513>>. Acesso em: 03 out. 2016.

TERRASAN, César R. F. et al. Xylanase and β -xylosidase from *penicillium janczewskii*: Production, physico-chemical properties, and application of the crude extract to pulp biobleaching. **BioResources**, North Carolina State University, Raleigh, v. 8, n. 1, p. 1292–1305, 2013. ISSN 19302126. Disponível em: <<http://bit.ly/2e7vLnJ>>. Acesso em: 15 out. 2016.

THANGAVELU, Saravana Kannan; AHMED, Abu Saleh; ANI, Farid Nasir. Review on bioethanol as alternative fuel for spark ignition engines. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Elsevier, [S.l.], v. 56, p. 820–835, abr. 2016. ISSN 13640321. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032115013568>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

THE WORLD BANK. **O Banco Mundial eleva a previsão do preço do petróleo em 2016 e diminui as projeções de preços da agricultura**. Washington, 2015. Disponível em: <<http://bit.ly/2geIeqV>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

_____. **Population growth (anual %)**. Washington, 2016. Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/SP.POP.GROW/countries/1W?display=graph>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

TILLMAN, David A. **Wood as an energy resource**. 1. ed. New York: Academic Press, 1978. ISBN 0126912602. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780126912609>>. Acesso em: 06 jul. 2016.

UNITED NATIONS DEVELOPMENT PROGRAMME. **World Energy Assessment**: Energy and the challenge of sustainability. New York, 2000. 508 p. Disponível em: <<http://goo.gl/KKH9Ok>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

UNITED STATES ENERGY INFORMATION ADMINISTRATION. **Natural Gas**: Henry hub natural gas spot price. Washington, 2016. Disponível em: <<https://www.eia.gov/dnav/ng/hist/rngwhhdA.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2016.

UNITED STATES GOVERNMENT ACCOUNTABILITY OFFICE. **Climate engineering**: Technical status, future directions, and potencial responses. Washington, 2011. 121 p. Disponível em: <<http://www.gao.gov/assets/330/322208.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

U.S. DEPARTAMENT OF ENERGY. **Alternative Fuels Data Center**: Fuels and infrastructure. Washington, 2016. Disponível em: <<http://www.afdc.energy.gov/data/10331>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

_____. **Alternative Fuels Data Center**: Ethanol feedstock. Washington, 2016. Disponível em: <http://www.afdc.energy.gov/fuels/ethanol_feedstocks.html>. Acesso em: 16 jun. 2016.

VASSILEV, Stanislav V.; VASSILEVA, Christina G. Composition, properties and challenges of algae biomass for biofuel application: An overview. **Fuel**, Elsevier, [S.l.], v. 181, p. 1–33, out. 2016. ISSN 00162361. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001623611630271X>>. Acesso em: 06 jul. 2016.

WALDROP, M. P.; BALSER, T. C.; FIRESTONE, M. K. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elsevier, [S.l.], v. 32, n. 13, p. 1837–1846, nov. 2000. ISSN 00380717. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071700001577>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

WAN, Caixia; LI, Yebo. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances**, Elsevier, [S.l.], v. 30, n. 6, p. 1447–1457, nov./dez. 2012. ISSN 07349750. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000699>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

WI, Seung Gon et al. Lignocellulose conversion for biofuel: a new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. **Biotechnology for biofuels**, BioMed Central, [S.l.], v. 8, n. 228, p. 1–11, dez. 2015. ISSN 17546834. Disponível em: <<http://goo.gl/4avfxv>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

YOON, Li Wan et al. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. **Biomass and Bioenergy**, Elsevier, [S.l.], v. 67, p. 319–338, ago. 2014. ISSN 09619534. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953414002839>>. Acesso em: 03 jun. 2016.

ZHANG, H. L.; BAEYENS, J.; TAN, T. W. Mixing phenomena in a large-scale fermenter of starch to bio-ethanol. **Energy**, Elsevier, [S.l.], v. 48, n. 1, p. 380–391, dez. 2012. ISSN 03605442. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544212003945>>. Acesso em: 04 jul. 2016.

ZHANG, Jingzhi et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Bioresource Technology**, Elsevier, [S.l.], v. 102, n. 6, p. 4585–4589, mar. 2011. ISSN 09608524. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241002078X>>. Acesso em: 03 out. 2016.

ZHANG, Mingjia et al. Enzymatic saccharification of pretreated corn stover in a fed-batch membrane bioreactor. **BioEnergy Research**, Springer, [S.l.], v. 4, n. 2, p. 134–140, dez. 2011. ISSN 19391242. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12155-010-9107-1>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

Apêndices

APÊNDICE A – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS OBTIDOS NO ESTUDO PRELIMINAR

Tabela 8: Atividades enzimáticas (hemi)celulolíticas e concentrações de açúcares redutores totais produzidas por *P. ostratus* PLO6 durante 14 dias (Preliminar)

Tempo, horas	Endo-G U/g		Exo-G U/g		β -G U/g		Endo-X U/g		β -X U/g		ART g/L	
24	5,82	3,57	2,59	2,38	2,77	2,77	18,98	15,83	13,05	13,63	0,3	0,2
48	13,66	14,39	7,08	8,18	3,05	2,78	18,24	11,29	13,14	12,51	0,3	0,3
72	13,21	12,76	9,00	10,10	5,63	6,37	35,36	32,95	13,45	13,76	0,4	0,3
96	13,70	13,90	9,74	10,92	35,3	25,87	38,17	40,97	14,51	15,34	0,3	0,3
120	12,47	12,88	4,18	5,57	65,36	66,38	71,53	77,41	25,25	25,65	1,0	0,9
144	11,70	11,53	2,79	2,30	61,18	57,31	55,62	47,46	26,45	26,19	1,5	1,6
168	12,72	13,41	5,24	4,71	70,43	74,25	38,50	48,53	24,68	24,01	1,0	1,2
192	19,74	20,48	6,06	5,94	56,47	61,36	26,60	19,04	24,43	24,05	1,4	1,5
216	21,33	19,66	5,98	6,51	64,47	64,47	30,61	27,40	24,45	23,32	1,9	1,7
240	7,73	5,82	6,96	6,59	64,47	65,80	23,05	18,31	21,50	20,12	1,3	1,3
264	6,88	6,63	7,98	8,31	93,37	96,49	19,44	25,06	19,83	20,98	1,0	1,2
288	13,03	12,54	11,00	10,67	32,59	29,07	31,21	26,93	13,89	13,45	3,2	3,3
312	18,15	15,94	8,55	7,57	2,65	2,53	25,73	31,88	14,45	14,56	2,9	2,6
336	14,23	13,04	4,30	3,61	2,50	2,54	28,94	19,51	14,96	14,51	1,9	1,8

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE B – ANOVA PARA AS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DO ESTUDO PRELIMINAR

Figura 24: P-valores para a prova de significância das atividades enzimáticas e as concentrações de ART no estudo preliminar

EndoG					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	959.181	13	73.783	102.791	.000
Within Groups	10.049	14	.718		
Total	969.230	27			

ExoG					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	185.271	13	14.252	47.527	.000
Within Groups	4.198	14	.300		
Total	189.469	27			

BetaG					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27170.875	13	2090.067	348.392	.000
Within Groups	83.988	14	5.999		
Total	27254.864	27			

EndoX					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6569.003	13	505.308	26.191	.000
Within Groups	270.105	14	19.293		
Total	6839.107	27			

BetaX					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	724.779	13	55.752	215.283	.000
Within Groups	3.626	14	.259		
Total	728.405	27			

ARedutor					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.646	13	1.665	229.327	.000
Within Groups	.102	14	.007		
Total	21.748	27			

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE C – PROVA DE NORMALIDADE PARA AS DISTRIBUIÇÕES DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DO ESTUDO PRELIMINAR

Figura 25: P-valores para a prova de normalidade das atividades enzimáticas e as concentrações de ART no estudo preliminar

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for EndoG	.970	28	.584

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for ExoG	.965	28	.466

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for BetaG	.938	28	.097

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for EndoX	.926	28	.048

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for BetaX	.975	28	.709

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Residual for ARedutor	.975	28	.724

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE D – ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E AÇÚCARES REDUTORES OBTIDOS NA TRIAGEM

Tabela 9: Atividades enzimáticas celulolíticas usando o *P. ostratus* PO6 (Triagem)

Experimento	Endo-glicanase U/g			Exo-glicanase U/g			β -glicosidase U/g		
2.1	14,6	12,9	14,2	4,7	4,7	4,9	3,6	3,5	3,5
2.2	9,1	10,7	9,4	2,0	1,9	2,0	3,0	3,0	3,0
2.3	18,3	19,3	18,2	11,0	10,5	11,4	16,9	16,8	16,7
2.4	12,1	12,2	13,2	4,7	4,6	4,1	3,2	3,2	3,1
2.5	20,7	21,5	20,8	10,8	9,9	10,9	3,6	3,4	3,5
2.6	3,6	3,6	3,7	6,4	6,7	7,1	3,3	3,1	3,3
2.7	13,2	13,7	13,6	9,1	9,7	8,7	18,5	18,5	18,4
2.8	12,5	12,4	11,7	2,2	2,0	2,1	3,6	3,6	3,6

Fonte: Elaboração própria

Tabela 10: Atividades enzimáticas hemicelulolíticas e produção de açúcares redutores totais usando o *P. ostratus* PO6 (Triagem)

Experimento	Endo-xilanase U/g			β -xilosidase g/L			ART U/g		
2.1	4,8	5,2	4,9	16,2	16,4	15,8	4,4	4,4	4,5
2.2	13,9	12,8	13,2	15,1	15,7	15,3	2,1	2,2	2,3
2.3	5,0	5,0	5,3	16,8	16,0	15,8	3,7	3,8	3,7
2.4	73,1	78,3	79,8	48,5	48,5	48,5	1,1	1,0	1,1
2.5	6,3	6,9	6,3	13,5	15,0	14,6	3,1	3,0	2,9
2.6	8,5	8,3	8,3	15,0	15,3	15,0	2,5	2,5	2,6
2.7	5,1	5,3	5,1	16,5	16,7	16,6	3,1	3,0	3,1
2.8	58,6	58,1	64,4	67,3	68,9	65,6	1,7	1,7	1,8

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE E – ANOVA PARA ÀS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS DA TRIAGEM

Figura 26: Significância dos efeitos dos fatores e correlação do modelo para as atividades enzimáticas e as concentrações de ART na triagem

ANOVA; Var.:Endo-G (R-sqr=,99093; Adj.:98697 (MatrizEndo-G) 2**(3-0) design; MS Residual=,3365089 DV: Endo-G					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	315,2400	1	315,2400	936,7954	0,000000
(2)CS	27,9293	1	27,9293	82,9973	0,000000
(3)t	7,4753	1	7,4753	22,2143	0,000234
1 by 2	74,5764	1	74,5764	221,6180	0,000000
1 by 3	26,8821	1	26,8821	79,8852	0,000000
2 by 3	15,3489	1	15,3489	45,6122	0,000005
1*2*3	121,0682	1	121,0682	359,7770	0,000000
Error	5,3841	16	0,3365		
Total SS	593,9044	23			

ANOVA; Var.:Exo-G (R-sqr=,99258; Adj.:98933 (MatrizExo-G_otros) 2**(3-0) design; MS Residual=,126877 DV: Exo-G					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	152,6084	1	152,6084	1202,806	0,000000
(2)CS	2,8352	1	2,8352	22,346	0,000228
(3)t	15,3489	1	15,3489	120,975	0,000000
1 by 2	18,3573	1	18,3573	144,686	0,000000
1 by 3	0,9030	1	0,9030	7,117	0,016846
2 by 3	81,3461	1	81,3461	641,141	0,000000
1*2*3	0,0625	1	0,0625	0,493	0,492733
Error	2,0300	16	0,1269		
Total SS	273,4915	23			

ANOVA; Var.:Beta-G (R-sqr=,99992; Adj.:99989 (MatrizBETA-G_otros) 2**(3-0) design; MS Residual=,0044706 DV: Beta-G					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	320,6012	1	320,6012	71713,06	0,000000
(2)CS	311,1158	1	311,1158	69591,34	0,000000
(3)t	2,0725	1	2,0725	463,58	0,000000
1 by 2	287,0712	1	287,0712	64212,97	0,000000
1 by 3	0,3208	1	0,3208	71,76	0,000000
2 by 3	1,4226	1	1,4226	318,21	0,000000
1*2*3	0,8707	1	0,8707	194,76	0,000000
Error	0,0715	16	0,0045		
Total SS	923,5464	23			

ANOVA; Var.:Endo-X (R-sqr=,99715; Adj.:9959 (MatrizEndo-x) 2**(3-0) design; MS Residual=3,141179 DV: Endo-X					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	7075,26	1	7075,256	2252,421	0,000000
(2)CS	4919,43	1	4919,433	1566,110	0,000000
(3)t	148,55	1	148,546	47,290	0,000004
1 by 2	5128,38	1	5128,377	1632,628	0,000000
1 by 3	201,86	1	201,864	64,264	0,000001
2 by 3	66,39	1	66,391	21,136	0,000297
1*2*3	40,28	1	40,278	12,822	0,002498
Error	50,26	16	3,141		
Total SS	17630,40	23			

ANOVA; Var.:Beta-X (R-sqr=,9991; Adj.:99871 (MatrizBeta-x) 2**(3-0) design; MS Residual=,4830048 DV: Beta-X					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	2575,988	1	2575,988	5333,255	0,000000
(2)CS	2876,349	1	2876,349	5955,115	0,000000
(3)t	110,009	1	110,009	227,759	0,000000
1 by 2	2587,056	1	2587,056	5356,171	0,000000
1 by 3	148,939	1	148,939	308,359	0,000000
2 by 3	171,205	1	171,205	354,458	0,000000
1*2*3	106,421	1	106,421	220,330	0,000000
Error	7,728	16	0,483		
Total SS	8583,694	23			

ANOVA; Var.:AR (R-sqr=,99679; Adj.:99531 (MatrizAR) 2**(3-0) design; MS Residual=,0050753 DV: AR					
Factor	SS	df	MS	F	p
(1)T	16,83999	1	16,83999	3318,059	0,000000
(2)CS	0,48911	1	0,48911	96,371	0,000000
(3)t	0,50060	1	0,50060	98,636	0,000000
1 by 2	2,80162	1	2,80162	552,016	0,000000
1 by 3	3,74956	1	3,74956	738,793	0,000000
2 by 3	0,03394	1	0,03394	6,687	0,019904
1*2*3	0,37844	1	0,37844	74,565	0,000000
Error	0,08120	16	0,00508		
Total SS	24,87446	23			

Fonte: Elaboração própria

APÊNDICE F – AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS OBTIDOS NO PLANEJAMENTO CENTRAL COMPOSTO

Tabela 11: Concentração de açúcares redutores totais produzidos no planejamento central composto

Experimento	Concentração substrato, %	tempo, d	Temperatura, °C	ART, g/L
1	15	6	21	2,0
2	15	6	27	3,1
3	15	12	21	2,1
4	15	12	27	1,8
5	25	6	21	2,4
6	25	6	27	2,5
7	25	12	21	2,5
8	25	12	27	3,1
9	11,6	9	24	1,9
10	28,4	9	24	2,5
11	20	3,95	24	2,5
12	20	14,05	24	2,4
13	20	9	18,95	0,6
14	20	9	29,05	1,0
15 (PC)	20	9	24	4,5
16 (PC)	20	9	24	3,9
17 (PC)	20	9	24	4,2
18 (PC)	20	9	24	4,6
19 (PC)	20	9	24	4,6

Fonte: Elaboração própria