



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



**Prospecção de biomassas lignocelulósicas para
co-produção de etanol de segunda geração e biossurfactante
empregando processos químicos e enzimáticos**

Verônica dos Santos Lopes

Uberlândia – MG

2017



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



**Prospecção de biomassas lignocelulósicas para
co-produção de etanol de segunda geração e biossurfactante
empregando processos químicos e enzimáticos**

Verônica dos Santos Lopes

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho (UFU)
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

Uberlândia – MG

2017

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

L864p
2017

Lopes, Verônica dos Santos, 1988-

Prospecção de biomassas lignocelulósicas para co-produção de etanol de segunda geração e biossurfactante empregando processos químicos e enzimáticos / Verônica dos Santos Lopes. - 2017.
108 f. : il.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.

Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

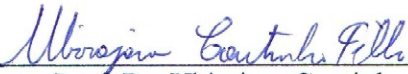
Inclui bibliografia.

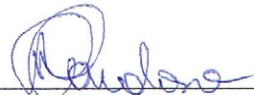
1. Engenharia química - Teses. 2. Álcool - Teses. 3. Fermentação - Teses. 4. Bagaço de cana - Teses. I. Coutinho Filho, Ubirajara. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

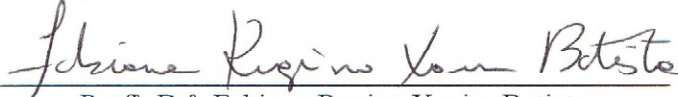
CDU: 66.0

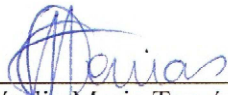
TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 13 DE FEVEREIRO DE 2017.


BANCA EXAMINADORA:

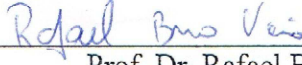

Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
Orientador (FEQ/UFU)


Prof.^a. Dr.^a. Vicelma Luiz Cardoso
Co-orientadora (FEQ/UFU)


Prof.^a. Dr.^a. Fabiana Regina Xavier Batista
(FEQ/UFU)


Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Maria Tomás Melo
(IFTM – Campus Uberlândia)


Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
(INGEB/UFU)


Prof. Dr. Rafael Bruno Vieira
(DEQ/UFPR)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus queridos pais Carlos e Elenice e a minha irmã Viviane,
que são as pessoas mais importantes da minha vida.
Sem vocês não teria chegado até aqui!

AGRADECIMENTOS

Para a conclusão deste trabalho, muitas pessoas especiais contribuíram para que mais esta etapa de minha vida se concretizasse com êxito. Por isso, gostaria de fazer um singelo agradecimento:

À Deus por ter me dado esta oportunidade e por sempre iluminar o meu caminho.

Aos meus pais pelo amor, carinho e educação a mim dedicados, pelos preciosos conselhos, por sempre me apoiarem e por tudo que fazem e fizeram por mim; a minha irmã Viviane por ser tão querida e torcer pela minha felicidade sempre. Amo muito vocês!

À minha madrinha Eunice (*in memoriam*) e a minha avó Maria (*in memoriam*), que sempre foram meu incentivo para seguir em frente e lutar pelos meus sonhos. Elas partiram durante essa jornada, mas permanecerão para sempre em meu coração.

Ao meu namorado Gilberto Junior pelo amor, dedicação, companheirismo e paciência. Obrigada por sempre acreditar em meu potencial e me ajudar em tudo que preciso.

Ao meu orientador Ubirajara Coutinho Filho, que me acompanha desde os primeiros anos de graduação, contribuindo para minha formação profissional e pessoal. É uma pessoa que tenho admiração pela sua competência, simplicidade e paciência, e por isso serei eternamente grata pela sua orientação durante todos esses anos.

À professora Vicelma Luiz Cardoso pela co-orientação, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pela paciência, confiança e dedicação, e por ser fundamental na concretização deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da FEQUI que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos alunos de iniciação científica Carina e Henrique que me acompanharam por um período curto, mas que foi de extrema importância para a execução deste trabalho. Obrigada pelo empenho e dedicação de vocês.

A todos os colegas de laboratório pela troca de experiências, solidariedade e colaboração nos experimentos, e pelos preciosos momentos de convivência durante todos esses anos.

Às minhas amigas Fernanda Leal, Marina Garcia, Taciana Soares e Tais Abrantes pela amizade sincera, carinho, ajuda e conselhos nos momentos de angústia.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e contribuírem com o enriquecimento do trabalho.

A FAPEMIG pela concessão da bolsa e aos demais órgãos de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro e suporte para participação em eventos científicos.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), que gentilmente forneceu o bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade concedida.

Às demais pessoas que colaboraram, direta e indiretamente, para a conclusão de mais esta etapa em minha vida.

A minha eterna gratidão!

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota"

Madre Teresa de Calcuta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE QUADROS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Biomassas celulósicas e derivados destinados à fermentação	3
2.2. Biorrefinarias	9
2.2.1. Produção de etanol de segunda geração	10
2.2.1.1. Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas	11
2.2.1.2. Hidrólise enzimática	14
2.2.1.3. Fermentação alcoólica	16
2.2.1.4. Histórico do E2G no Brasil	17
2.2.3. Surfactantes e Biossurfactantes	18
2.2.3.1. Tipos de biossurfactantes.....	19
2.2.3.2. Glicolipídeos.....	21
2.2.3.3. Propriedades gerais e aplicações dos biossurfactantes	23
2.2.3.4. Produção de biossurfactantes	24
2.3. Associação de redes neurais e métodos heurísticos na obtenção de condições ótimas de fermentação.....	25
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Microrganismos	28
3.2. Biomassas	30
3.3. Metodologia experimental	31
3.3.1. Fermentações.....	31

3.3.1.1. Fermentação em estado sólido (FES)	32
3.3.1.2. Fermentação submersa (FS) para produção de etanol e biossurfactante	33
3.3.2. Avaliação da produção simultânea de biossurfactante e etanol de <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. cerevisiae</i>	33
3.3.3. Avaliação da produção simultânea de biossurfactante e etanol de <i>C. glabrosa</i> e <i>S. cerevisiae</i>	36
3.3.4. Avaliação da produção de biossurfactante em FES utilizando <i>A. niger</i>	36
3.3.5. Produção de etanol e biossurfactante com casca de arroz tratada	37
3.3.6 Produção de etanol e biossurfactante com diferentes biomassas tratadas	39
3.3.7. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de ácido levulínico	40
3.3.8. Avaliação da hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica para produção de etanol	42
3.3.9. Estudo da concentração do extrato enzimático bruto para produção de etanol	42
3.3.10. Avaliação do efeito da composição do meio da fermentação em estado sólido na produção de etanol	43
3.4. Métodos analíticos	45
3.4.1. Concentração de açúcares e etanol	45
3.4.2. Tensão superficial	45
3.4.3. Índice de emulsificação	45
3.4.4. Concentração de biossurfactante	46
3.4.5. Concentração de raminose	46
3.4.6. Caracterização do bagaço após fermentação	46
3.4.7 Concentração celular	47
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Produção simultânea de etanol e biossurfactante com <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. aeruginosa</i> ...	48
4.2. Produção simultânea de biossurfactante e etanol de <i>C. glabrosa</i> e <i>S. cerevisiae</i>	54
4.3. Produção de biossurfactante em FES de <i>A. niger</i>	55

4.3.1. Avaliação da produção de biossurfactante em FES de <i>A. niger</i> e uso do extrato enzimático gerado para produção de etanol em bagaço de cana.....	58
4.4. Produção de etanol e biossurfactante com casca de arroz tratada	60
4.5. Produção de etanol e biossurfactante com diferentes biomassas tratadas	62
4.6. Produção de biossurfactante a partir de ácido levulínico.....	66
4.7. Avaliação da hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica	68
4.8. Avaliação da concentração do EEB	72
4.9. Avaliação do efeito da composição do meio da fermentação em estado sólido na produção de etanol	74
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES	77
CAPÍTULO 6 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
CAPÍTULO 8 - APÊNDICE	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose	4
Figura 2.2 – Produção de AL a partir de biomassa lignocelulósica	8
Figura 2.3 – Esquema ilustrativo de uma biorrefinaria	9
Figura 2.4 – Diagrama do processo de produção de E2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar	11
Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica.....	12
Figura 2.6 – Estruturas dos raminolipídeos dos tipos I (A) e II (B) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
Figura 2.7 – Estrutura de um soforolipídeo de <i>Torulopsis bombicola</i>	22
Figura 2.8 – Rede neural artificial	26
Figura 3.1 – Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas neste trabalho.....	28
Figura 3.2 – Imagem ilustrativa das biomassas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa, tratadas com H ₂ SO ₄ diluído	30
Figura 3.3 – Imagem ilustrativa das biomassas bagaço de cana explodido (a), farelo de arroz (b), sabugo de milho (c) e farelo de trigo (d).....	31
Figura 3.4 – Extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados com extração simples (S, item a), dupla extração (D, item b) e tripla extração (T, item c).	34
Figura 3.5 – Reatores cônicos utilizados para fermentação submersa com bagaço de cana explodido e biomassas tratadas com H ₂ SO ₄ 2% – bagaço de cana, casca de arroz, sorgo biomassa e sabugo de milho triturado, respectivamente.	39
Figura 3.6 – Método de extração de enzima utilizando as combinações de meios sólidos.....	44
Figura 4.1 – Variações de banda nos espectros FTIR de bagaço de cana explodido fermentado.	50
Figura 4.2 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para concentrações de etanol.	52

Figura 4.3 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para concentrações de raminolípídeo.....	52
Figura 4.4 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para tensão superficial.	53
Figura 4.5 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para índice de emulsificação.....	54
Figura 4.6 – Concentração de biossurfactante para as fermentações sólidas FES A, FES B, FES C e FES D.	56
Figura 4.7 – Índice de emulsificação em querosene para as fermentações sólidas FES A, FES B, FES C e FES D.	57
Figura 4.9 – Concentração de etanol para 24 e 48 horas de fermentação alcoólica utilizando os EEB obtidos em diferentes tempos de FES A, constituída por bagaço de cana explodido e farelo de arroz.....	59
Figura 4.10 – Concentração de etanol para 24 e 48 horas de fermentação alcoólica utilizando os EEB obtidos em diferentes tempos de FES B, constituída por farelo de trigo e farelo de arroz.	60
Figura 4.11 – Resultados do teste preliminar com glicose e ácido levulínico para crescimento celular e concentração de raminose.	67
Figura 4.12 – Resultados da rede neural com 10 neurônios na camada oculta.	67
Figura 4.13 – Concentração dos açúcares presentes no extrato enzimático bruto após hidrólise enzimática separada de 18 horas a 40°C.	72
Figura 4.14 – Concentração de etanol para 48 horas de fermentação alcoólica utilizando EEB sem concentrar e os EEB concentrados.	73
Figura 4.15 – Concentração de etanol empregando apenas um meio sólido.....	74
Figura 4.16 – Concentração de etanol empregando as diferentes combinações de meios sólidos.....	75
Figura 8.1 – Curva de calibração para concentração de raminose	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição de biomassas lignocelulósicas representativas	5
Tabela 2.2 – Principais produtos alimentares e resíduos/subprodutos de processamento.....	6
Tabela 3.1 – Composição do meio PDA	29
Tabela 3.2 – Composição do meio de cultura para manutenção da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Tabela 3.3 – Composição do meio de cultura para manutenção da <i>Candida glabrata</i>	30
Tabela 3.4 – Meios da FES.....	34
Tabela 3.5 – Extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados por fermentação em estado sólido (FES).....	35
Tabela 3.6 – Meios da FES.....	36
Tabela 3.7 – Descrição das condições dos ensaios com variação do pH, tempo e quantidade de casca de arroz para as fermentações submersas	38
Tabela 3.8 – Delineamento Composto Central.....	41
Tabela 3.9 – Composição dos meios sólidos na FES	43
Tabela 3.10 – Extratos enzimáticos obtidos das combinações das FES.....	44
Tabela 4.1 – Concentrações de etanol e raminolípido para fermentação com os extratos enzimáticos E1 a E3	49
Tabela 4.2 – Concentrações de etanol, raminolípido, recuperação do bagaço e poder calorífico.....	51
Tabela 4.3 – Concentrações de etanol e biossurfactante e IE para 48 horas de fermentação com <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. glabrata</i>	55
Tabela 4.4 – Produção de etanol e biossurfactante com casca de arroz	61
Tabela 4.5 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES A* de 72 horas.	63
Tabela 4.6 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES A* de 96 horas.	64
Tabela 4.7 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES B* de 72 horas.	65

Tabela 4.8 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES B* de 96 horas.	66
Tabela 4.9 – Resultados da otimização da produção de raminose.	68
Tabela 4.10 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise de 6 h a 30 °C em diferentes pH e após 48 h de fermentação alcoólica.	69
Tabela 4.11 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise em pH 4,0 a 30 °C em diferentes tempos e após 48 h de fermentação alcoólica.	70
Tabela 4.12 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise de 18 h em pH 4,0 em diferentes temperaturas e após 48 horas de fermentação alcoólica.	71
Tabela 4.13 – Comparação da hidrólise e fermentação alcoólica simultâneas com a hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.	71
Tabela 8.1 – Leitura no espectrofotômetro das absorbâncias para construção da curva de calibração de raminose.	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 – Exemplo de métodos de pré-tratamento mais utilizados	13
Quadro 2.2 – Microrganismos produtores de celulase e método de produção.....	16
Quadro 2.3 – Principais tipos de biossurfactantes e microrganismos produtores	20
Quadro 2.4 – Funções dos biossurfactantes e suas aplicações	24

RESUMO

O esgotamento do petróleo, mudanças climáticas e questões ambientais aumentaram o interesse no uso de fontes alternativas e renováveis para produção de energia e produtos que sejam menos poluentes que os produtos de origem petroquímica. A conversão da biomassa em especialidades químicas e combustíveis tem sido o foco da indústria e dos pesquisadores na última década, para que assim se possa minimizar a geração de resíduos agroindustriais, desenvolver tecnologias ambientalmente eficazes e ampliar a produção de compostos gerados a partir de rotas sustentáveis. Neste contexto, o reaproveitamento de biomassas lignocelulósicas para produção de etanol e biossurfactantes representa uma forma de reduzir a poluição ambiental e ampliar a produção de compostos gerados a partir de rotas sustentáveis. Na presente tese, avaliou-se a produção de diferentes extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados em fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus niger*. Os EEBs produzidos foram utilizados para produção simultânea de etanol e biossurfactante em co-fermentação na presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. O EEB que gerou maiores concentrações de etanol (8,4 g/L) e biossurfactante (9,1 g/L) foi obtido a partir da extração de duas FES, constituída por bagaço de cana explodido e farelo de arroz. Este EEB foi também utilizado para produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa com bagaço de cana explodido e leveduras *S. cerevisiae* e *Candida glabrata*, na qual obteve-se 5,8 g/L de etanol e 6,6 g/L de biossurfactante em 48 h de fermentação. Na sequência, investigou-se a capacidade das leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* produzirem essas duas substâncias em casca de arroz pré-tratada. Com os estudos anteriores, verificou-se que no EEB havia biossurfactante produzido durante a FES. Por isso, investigou-se esta produção com o uso de *A. niger* em FES com diferentes substratos. As maiores concentrações de biossurfactante obtidas foram de 7,6 g/L para 72 h de fermentação com substrato constituído por bagaço de cana explodido e farelo de arroz, e 10,1 g/L para 48 h de fermentação com substrato constituído por farelo de trigo e farelo de arroz. Com esta avaliação, investigou-se o uso desses EEB em fermentação submersa com diferentes biomassas pré-tratadas e com as leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* para produção de etanol e biossurfactante. Na sequência foi realizado um estudo com ácido levulínico (AL) e *P. aeruginosa* para produção de biossurfactante, e observou-se que a *P. aeruginosa* teve dificuldade em converter o AL em raminose. Em seguida, avaliou-se a produção de etanol de *S. cerevisiae* com hidrólise enzimática e fermentação alcoólica realizadas separadamente (SHF), variando pH, tempo de hidrólise e temperatura, visando aumentar a produção de etanol. As melhores condições operacionais estudadas foram 18 h de hidrólise, a 40 °C em pH 4,0, gerando uma concentração de etanol de 19,8 g/L. Usando estas condições operacionais, concentrou-se o EEB em rotaevaporador nas temperaturas de 50 e 60 °C, e redução de volume de 25 e 50%. A condição mais favorável ao processo foi concentração do EEB a 50 °C com redução de 50% do volume, com produção de 21 g/L de etanol. E por fim, avaliou-se EEB de três diferentes meios de FES e suas combinações para produção de etanol. Observou-se que as distintas combinações de meios sólidos para produção de EEB influenciaram no tempo e na concentração de etanol. O EEB, composto por dois meios sólidos de bagaço de cana e farelo de arroz, foi o ensaio que proporcionou as maiores concentrações de etanol: 17,6 e 18,5 g/L nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente.

Palavras-chave: etanol, biossurfactante, fermentação em estado sólido, bagaço de cana, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata*.

ABSTRACT

Oil depletion, climate change and environmental issues have increased the interest in the use of alternative and renewable sources for the production of energy and products that cause less pollution than petrochemical products. The conversion of biomass into specialty chemicals and fuels has been the focus of industry and researchers over the past decade, so that agro-industrial waste generation can be minimized, environmentally effective technologies developed, and the production of compounds generated from sustainable routes of biofuel increased. In this context, the re-use of lignocellulosic biomass for the production of ethanol and biosurfactants represents a way to reduce environmental pollution and increase the production of compounds generated from sustainable routes. In this doctoral thesis, the production of different crude enzyme complexes (CEC) generated in solid-state fermentation (SSF) using *Aspergillus niger* was evaluated. The CEC produced was used for the simultaneous production of ethanol and biosurfactant in co-fermentation in the presence of *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa*. The CEC that generated higher concentrations of ethanol (8.4 g/L) and biosurfactant (9.1 g/L) was obtained from the extraction using two SSF, fermented medium consisting of steam-exploded sugarcane bagasse and rice bran. This CEC was also used to produce ethanol and biosurfactant in submerged fermentation with steam-exploded sugarcane bagasse and *S. cerevisiae* e *Candida glabrata*; 5.8 g/L of ethanol and 6.6 g/L of biosurfactant were obtained in 48 hours of fermentation. Subsequently, the ability of yeasts *S. cerevisiae* and *C. glabrata* to produce these two substances in pre-treated rice husk was investigated. With previous studies, it was found that in CEC, the biosurfactant was produced during SSF. Therefore, this production was investigated with the use of *A. niger* in SSF with different substrates. The highest concentrations of biosurfactant obtained were 7.6 g/L at 72 h of fermentation, with the substrate consisting of exploded sugarcane bagasse and rice bran, and 10.1 g/L at 48 h of fermentation with substrate consisting of wheat bran and rice bran. With this evaluation, the use of these CECs in submerged fermentation with different pre-treated biomasses and the yeasts *S. cerevisiae* and *C. glabrata* for the production of ethanol and biosurfactant was investigated. A study was carried out with levulinic acid (LA) and *P. aeruginosa* for the production of biosurfactant and it was observed that *P. aeruginosa* had difficulty in converting the LA in rhamnose. Then, the ethanol production of *S. cerevisiae* was evaluated with enzymatic hydrolysis and alcoholic fermentation (SHF), varying pH, hydrolysis time and temperature, aiming to increase ethanol production. The best operating conditions studied were 18 h of hydrolysis, at 40 °C and at pH 4.0, generating an ethanol concentration of 19.8 g/L. Using these operating conditions, the CEC was concentrated in a rotary evaporator at temperatures of 50 and 60 °C, and a volume reduction of 25% and 50%. The most favourable condition was the concentration of CEC at 50 °C with a reduction of 50%, and a yield of 21.0 g/L of ethanol. Finally, CEC of three different SSF media and their combinations for ethanol production was evaluated. It was observed that the different combinations of solid media for CEC production influenced the time and concentration of ethanol. The CEC composed of the two solid media of sugarcane bagasse and rice bran was the test that resulted in the highest concentrations of ethanol: 17.6 and 18.5 g/L at 24 and 48 h, respectively.

Keywords: biosurfactant, solid state fermentation, sugarcane bagasse, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida glabrata*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O inevitável esgotamento de petróleo, as preocupações com a segurança energética, a crescente problemática referente às emissões de CO₂ e geração de resíduos têm reforçado o interesse na busca de fontes alternativas de energia e de bioprodutos. A conversão de biomassa e compostos derivados de biomassa em produtos químicos e combustíveis pode melhorar muitas questões atuais associadas ao uso de combustíveis fósseis (KHARE, PANDEY e LARROCHE, 2015; YAN et al., 2015).

Diferentes fontes de carbono podem ser usadas para obtenção de bioprodutos. As biomassas lignocelulósicas constituem a maior fonte de carboidratos naturais do planeta e são produzidas em grandes quantidades em diversas regiões ao redor do mundo. Estes materiais provêm dos resíduos agrícolas, industriais, de madeira e de plantas, como a cana-de-açúcar, o que os tornam atrativos para a produção de biocombustíveis, enzimas, biossurfactantes e crescimento microbiano (SOCCOL et al., 2010; FISCHER, 2014). Outra fonte de carbono é o ácido levulínico (AL), obtido a partir da hidrólise ácida da celulose, que se decompõe em uma variedade de produtos, sendo o AL e o ácido fórmico os produtos solúveis finais. O AL pode ser utilizado como plataforma para produção de inúmeros bioprodutos, incluindo ácido succínico, resinas, polímeros, herbicidas, produtos farmacêuticos e aromatizantes, biocombustíveis, solventes, entre outros (HABE et al., 2015; YAN et al., 2015).

O bioetanol obtido a partir de biomassa lignocelulósica é considerado como uma das alternativas mais promissoras para os combustíveis fósseis, devido à sua queima limpa, maior índice de octanagem e limites de inflamabilidade mais amplos (SUN et al., 2016).

A produção de etanol de segunda geração é, geralmente, realizada em quatro etapas principais: pré-tratamento da biomassa para abertura das fibras, hidrólise do material pré-tratado para obtenção de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares a etanol, separação e purificação (ADITIYA et al, 2016; KORADIYA et al., 2016).

As dificuldades de hidrólise da celulose e o alto custo das enzimas tornou o interesse mais extensivo em pesquisas que busquem a associação da produção de biocombustível a outros produtos de elevado valor agregado e a redução no custo da produção de enzimas. Uma das formas de reduzir o custo destas enzimas consiste na produção *in loco* com o uso da enzima na forma não purificada dita extrato enzimático bruto (EEB). Este uso é considerado

vantajoso por reduzir o custo com transporte, purificação, aditivos, entre outros (LEDUC et al., 2010; SUKUMARAN et al., 2010; ZHENG et al., 2015).

Entre os produtos de interesse que pode ser associado à produção de etanol é o biossurfactante, pois é uma substância de origem microbiana, capaz de emulsificar e reduzir a tensão superficial entre dois líquidos. Além disso, o biossurfactante é um produto nobre que possui maior estabilidade química e térmica, baixa toxicidade e maior biodegradabilidade quando comparado aos surfactantes sintéticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A produção de um biossurfactante pode ser realizada por diferentes microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, utilizando vários substratos de baixo custo incluindo açúcares, óleos, resíduos industriais e agrícolas. Esta produção é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, concentrações de fósforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BANAT, MAKKAR E CAMEOTRA, 2000; BORGES, 2011).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o uso de diferentes biomassas lignocelulósicas para co-produção de etanol de segunda geração e biossurfactante empregando processos químicos e enzimáticos. E os objetivos específicos foram:

- Estudar a co-fermentação de etanol e biossurfactante com *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa* pelo uso de diferentes extratos enzimáticos de *Aspergillus niger*;
- Avaliar a co-fermentação de etanol e biossurfactante com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida glabrata*;
- Investigar a produção de biossurfactante em fermentação sólida de *A. niger* e utilizar o extrato enzimático gerado para produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa;
- Avaliar a produção de biossurfactante de *Pseudomonas aeruginosa* em fermentação líquida, utilizando ácido levulínico como fonte de carbono;
- Estudar a hidrólise enzimática e fermentação alcoólica realizadas de forma separada com extrato enzimático concentrado;
- Produzir extratos enzimáticos em diferentes combinações de meios sólidos.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados temas pertinentes ao desenvolvimento deste trabalho com uma breve revisão da literatura. Foi realizada uma revisão atualizada com base em artigos científicos, dissertações e teses sobre as principais biomassas celulósicas e seus derivados que podem ser utilizados como fontes de carbono em fermentações. Na sequência, apresenta-se o conceito de biorrefinarias e a descrição das etapas que envolvem a produção de etanol de segunda geração e o histórico dessa produção no Brasil. E por fim, os tipos de biossurfactantes, propriedades gerais, aplicações e a produção destas substâncias são investigados.

2.1. BIOMASSAS CELULÓSICAS E DERIVADOS DESTINADOS À FERMENTAÇÃO

A biomassa é uma fonte abundante e concentrada de carbono que está disponível na Terra. A conversão da biomassa em especialidades químicas e combustíveis tem sido o foco da indústria e dos pesquisadores na última década para que assim se possa minimizar a geração de resíduos agroindustriais e desenvolver tecnologias ambientalmente eficazes (YAN et al., 2015).

As biomassas lignocelulósicas são as fontes mais abundante de carboidratos e os componentes principais são celulose, hemicelulose e lignina, como mostra a Figura 2.1. As regiões cristalinas da celulose são mais resistentes à biodegradação do que as partes amorfas, sendo que estas, que possuem baixo grau de polimerização, são mais susceptíveis às enzimas celulolíticas. Em geral, as paredes celulares das plantas são subdivididas em primárias e secundárias. A distribuição de celulose, hemicelulose e lignina varia consideravelmente entre essas camadas. A parede secundária é composta por três camadas, e a segunda camada é geralmente mais espessa que as outras, contendo a maior parte de celulose. A lamela média, que liga as células adjacentes, é composta quase inteiramente por lignina (MENON e RAO, 2012; KORADIYA et al., 2016)

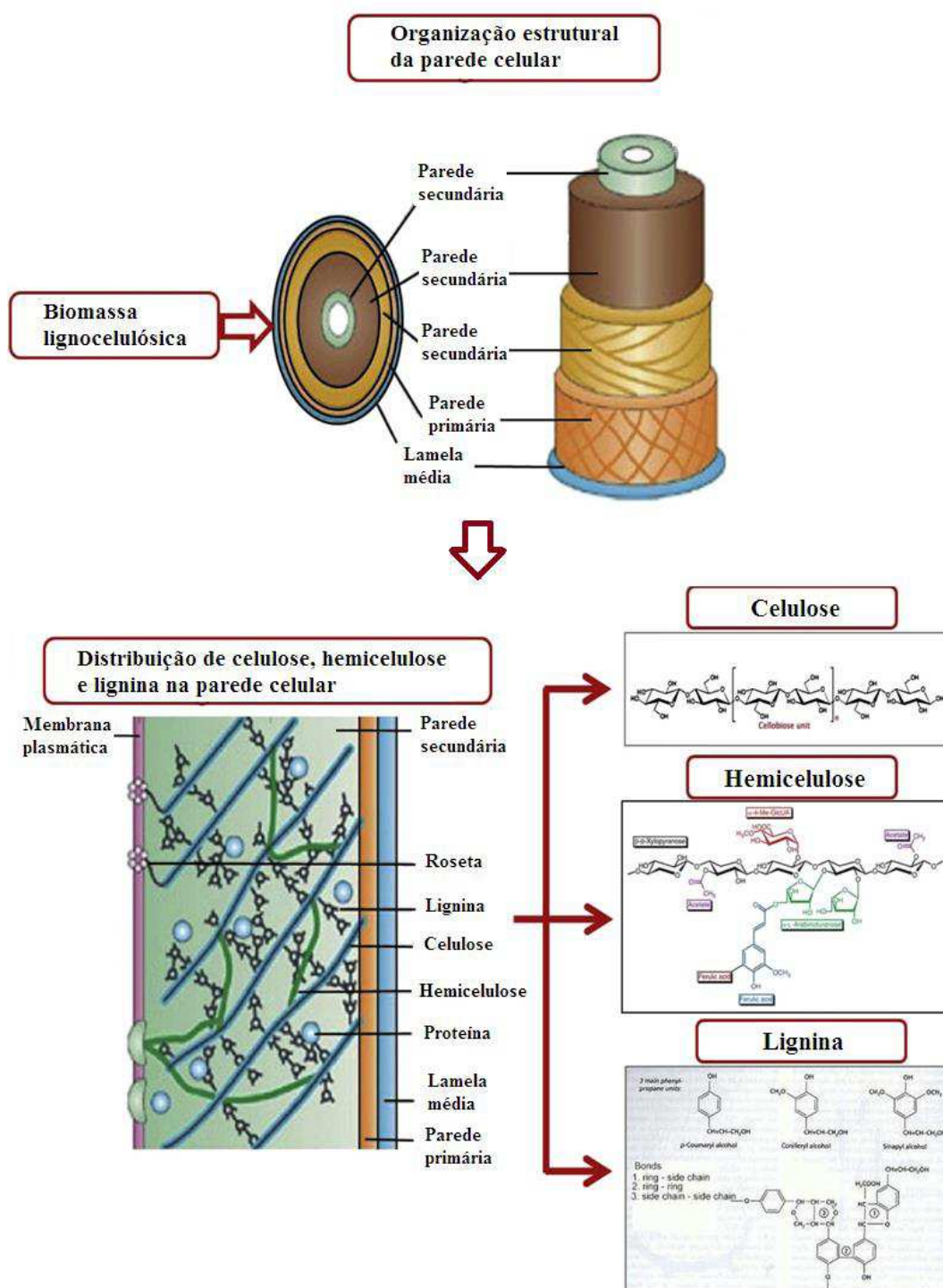


Figura 2.1 – Ilustração esquemática da estrutura da lignocelulose (adaptado de MENON e RAO, 2012).

Os materiais lignocelulósicos podem ser divididos, geralmente, em duas categorias: biomassa lenhosa, que inclui resíduos da colheita florestal e culturas lenhosas dedicadas à rotação curta, e biomassa herbácea, que inclui resíduos de culturas agrícolas como palhas,

cascas e bagaços. Sua composição em relação a celulose, hemicelulose e lignina varia para cada tipo de biomassa, como mostra a Tabela 2.1, e depende de diversos fatores como o tipo de vegetal, as condições de crescimento, a parte da planta escolhida, o tempo de colheita, entre outros (YAN, et al., 2015).

Tabela 2.1 – Composição de biomassas lignocelulósicas representativas (adaptado de MENON e RAO, 2012).

Biomassas	Composição de carboidratos (% peso seco)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sabugo de milho	32,3 – 45,6	39,8	6,7 – 13,9
Palha de milho	35,1 – 39,5	20,7 – 24,6	11,0 – 19,1
Palha de arroz	29,2 – 34,7	23,0 – 25,9	17,0 – 19,0
Casca de arroz	28,7 – 35,6	11,9 – 29,3	15,4 – 20,0
Palha de trigo	35,0 – 39,0	22,0 – 30,0	12,0 – 16,0
Farelo de trigo	10,5 – 14,8	35,5 – 39,2	8,3 – 12,5
Bagaço de cana	32,0 – 45,0	27,0 – 32,0	14,0 – 24,0
Palha de sorgo	32,0 – 35,0	24,0 – 27,0	15,0 – 21,0

Os resíduos agroindustriais são a matéria residual vegetal gerada por processamento, tais como cascas, farelos, palhas, bagaços e outras partes do material vegetal que não são destinadas a produção de alimentos. A Tabela 2.2 mostra os principais produtos alimentares e os resíduos gerados no processamento, assim como a quantidade de resíduo gerado (VOJVODIĆ et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

A rica composição química de tais materiais torna crescente o interesse na reutilização para várias finalidades dentro do conceito de biorefinaria, que visa a conversão de biomassa de resíduos em produtos de alto valor agregado. Além disso, o uso da biomassa lignocelulósica possui vantagens como disponibilidade, rentabilidade, não tem um efeito negativo sobre a produção de alimentos e ainda é renovável (VOJVODIĆ et al., 2016; KORADIYA et al., 2016).

Tabela 2.2 – Principais produtos alimentares e resíduos/subprodutos de processamento (adaptado de ZHANG et al., 2016).

Produtos alimentares	Resíduo	% aproximada de resíduo gerado*
Óleo (soja)	Farinha de soja (proteína, carboidrato)	40
Arroz	Casca de arroz (lignocelulose, cinzas)	20
Trigo	Farelo (arabinoxilano, celulose, proteína)	20
Batata	Casca de batata e outros resíduos de processamento (lignocelulose, amido)	20
Banana	Banana rejeitada (lignocelulose, pectina, amido)	30
Maçã	Maçã rejeitada (fucogalactoxiloglucano, lignocelulose, glicose, frutose)	30

*Porcentagem referente à quantidade aproveitável como alimento

A cana-de-açúcar é uma cultura econômica amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo e que gera em média 280 kg de bagaço para cada tonelada de cana processada. O bagaço de cana-de-açúcar, resíduo fibroso obtido do processamento da cana, é uma das mais abundantes biomassas lignocelulósicas, especialmente em países tropicais como o Brasil. Cerca de metade do bagaço gerado é utilizada na queima direta para gerar calor e energia para a operação das usinas. A quantidade restante é matéria-prima potencial para ser utilizada em biorrefinarias para produção de bioetanol e outros produtos químicos (SILALERTRUKSA, PONGPAT e GHEEWALA, 2017; BISWAS et al., 2014).

O bagaço de cana é constituído por celulose (32-45%), hemicelulose (27-32%) e lignina (14-24%), cinzas e quantidades menores de minerais, ceras e outros compostos. Além disso, contêm de 48 a 52% de umidade, 2 a 3% de sólidos solúveis (°Brix), 46 a 48% de sólidos insolúveis (fibra) e características físico-químicas que dependem do sistema de colheita da cana (cana queimada ou mecânica), do corte e da forma de carregamento. As condições climáticas e os diferentes estágios de desenvolvimento vegetativo também podem interferir na composição do bagaço (FISCHER, 2014; JAIN et al., 2016; BISWAS et al., 2016).

Para a produção de etanol de segunda geração, o bagaço de cana é considerado o principal material lignocelulósico, pois se encontra prontamente disponível nas destilarias e possui elevado teor de carboidratos. Esta biomassa também pode ser utilizada como substrato para o cultivo de microrganismos e conversão a produtos, como enzimas, plásticos, papel e biossurfactantes (FISCHER, 2014).

O arroz é um dos cereais mais importantes para a alimentação humana, sendo superado apenas pelo trigo. Na safra 2015/16, o Brasil produziu 10.602,9 mil toneladas de arroz, destacando-se como maior produtor mundial fora do continente Asiático. O processamento dos grãos de arroz gera grãos limpos, cascas, farelo e um pó conhecido como pó de arroz. Estes subprodutos, farelo, casca e pó, são pouco explorados como alimentos embora sejam abundantes em todo território nacional (FISCHER, 2014; CONAB, 2016).

O farelo de arroz apresenta 50% de sua composição constituída por carboidratos e pode ser utilizado como matéria-prima de baixo custo, fonte de nutrientes, suporte para microrganismos e para produção de bioetanol, enzimas, biossurfactantes, entre outros (TODHANAKASEM et al., 2015).

Outro tipo de biomassa lignocelulósica é o farelo de trigo, gerado a partir da moagem de trigo, que representa uma matéria-prima promissora de baixo custo para a produção de bioetanol. Este substrato consiste em três componentes principais: amido, hemicelulose e celulose (CRIPWELL et al., 2015). Estima-se que 150 milhões de toneladas de farelo de trigo são produzidos por ano em todo o mundo. O farelo de trigo corresponde a 20% do grão e consiste, principalmente, de amido, hemicelulose, celulose residual, proteína e lignina (NAIR et al., 2015).

O sabugo de milho, resíduo gerado após o milho ser debulhado, contém, aproximadamente, 45% de celulose, 35% de hemicelulose e 20% de lignina e é considerado um substrato bom e barato para o crescimento microbiano e produção de celulase (OLAJUYIGBE e OGUNYEW, 2016).

O sorgo é uma planta originária da África. Existem diferentes tipos de sorgo: granífero, forrageiro, para corte e pastejo, vassoura, sacarino e biomassa. O sorgo biomassa é a planta do sorgo submetido a um forte processo de melhoramento genético para ter alto potencial de biocombustão e geração de energia térmica, elétrica e etanol de segunda geração. Além disso, possui ciclo curto (cerca de 150 a 180 dias), possibilita maior flexibilidade no uso da terra, o plantio é feito por sementes e pode ser usado para produção de ração animal (EMBRAPA, 2017; UNICA, 2017).

O ácido levulínico (AL), também conhecido como ácido 4-oxopentanóico, é uma molécula derivada da celulose, de cadeia curta contendo cinco átomos de carbono e dois grupamentos funcionais: um carboxílico e um carbonílico. A principal rota de obtenção do AL é pela hidrólise ácida da celulose, convertendo a matéria lignocelulósica em açúcares monoméricos (glicose/frutose) que por desidratação, levam à formação de 5-hidroximetilfurfural (HMF). Este é, então, desidratado em meio ácido conduzindo a uma mistura equimolar de ácido levulínio e ácido fórmico, como ilustra a Figura 2.2 (YAN et al., 2015).

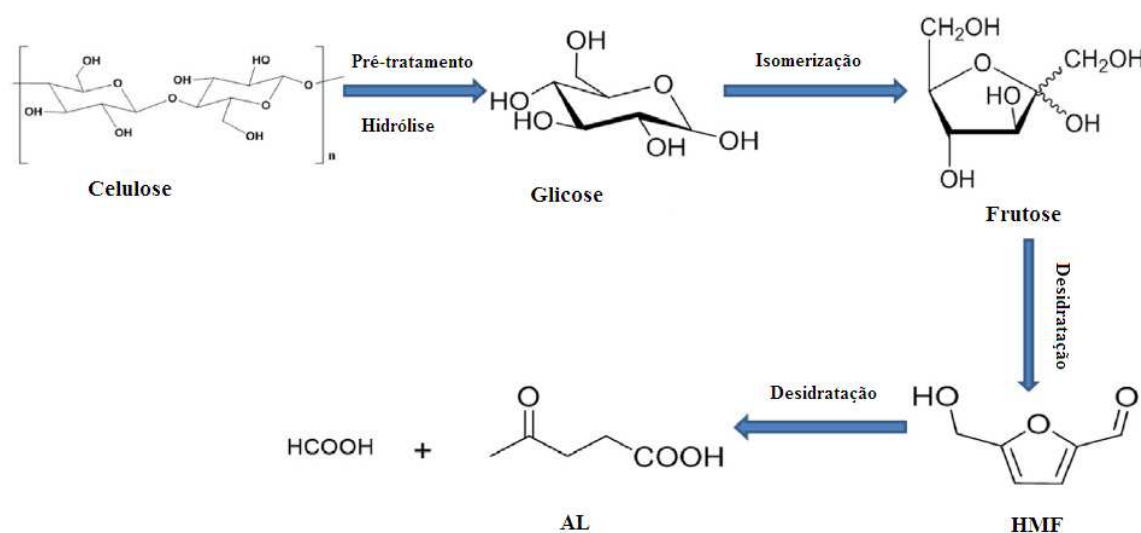


Figura 2.2 – Produção de AL a partir de biomassa lignocelulósica
(adaptado de YAN et al., 2015).

A presença no AL de uma carboxila e uma cetona, que são grupos funcionais reativos, permite a sua subsequente conversão a produtos de elevado valor agregado, tais como aditivos de combustível, polímeros, herbicidas biodegradáveis, entre outros. No entanto, há poucos relatos na literatura sobre a conversão microbiana de AL em compostos como álcoois, ácidos orgânicos e aminoácidos porque os ácidos orgânicos de cadeia curta (por exemplo, ácido acético e ácido levulínico) e compostos do tipo furfural, produzidos por hidrólise térmica de polissacarídeos catalisada por ácido, podem inibir o crescimento microbiano em determinadas concentrações (HABE et al., 2015; ELUMALAI et al., 2016).

2.2. BIORREFINARIAS

As biorrefinarias são constituídas por facilidades e instalações produtivas que geram e utilizam matéria-prima de origem vegetal e renovável, que opera de forma integrada transformando a biomassa em produtos que atendam às necessidades do consumo moderno de forma sustentável (GULDHE et al., 2017). O conceito de biorrefinaria está, portanto, ganhando interesse como uma abordagem promissora para o aumento da competitividade da indústria de cana-de-açúcar, reconhecida como um importante agronegócio em muitos países, como o Brasil (SILALERTRUKSA, PONGPAT e GHEEWALA, 2017).

A Figura 2.3 é um exemplo de biorrefinaria que pode ser implantada, na qual se tem o uso de cana-de-açúcar, como matéria-prima, para produção de açúcar e etanol de primeira geração (E1G). Com o bagaço gerado no processamento da cana, pode-se utilizá-lo para geração de energia através de sua queima na caldeira, e usar o vapor gerado para o pré-tratamento com explosão de vapor desse bagaço. Esta biomassa pré-tratada pode ser encaminhada para produção de enzimas através de fermentação em estado sólido e fermentações diversas que podem gerar diferentes produtos como biossurfactante, xilitol, entre outros.

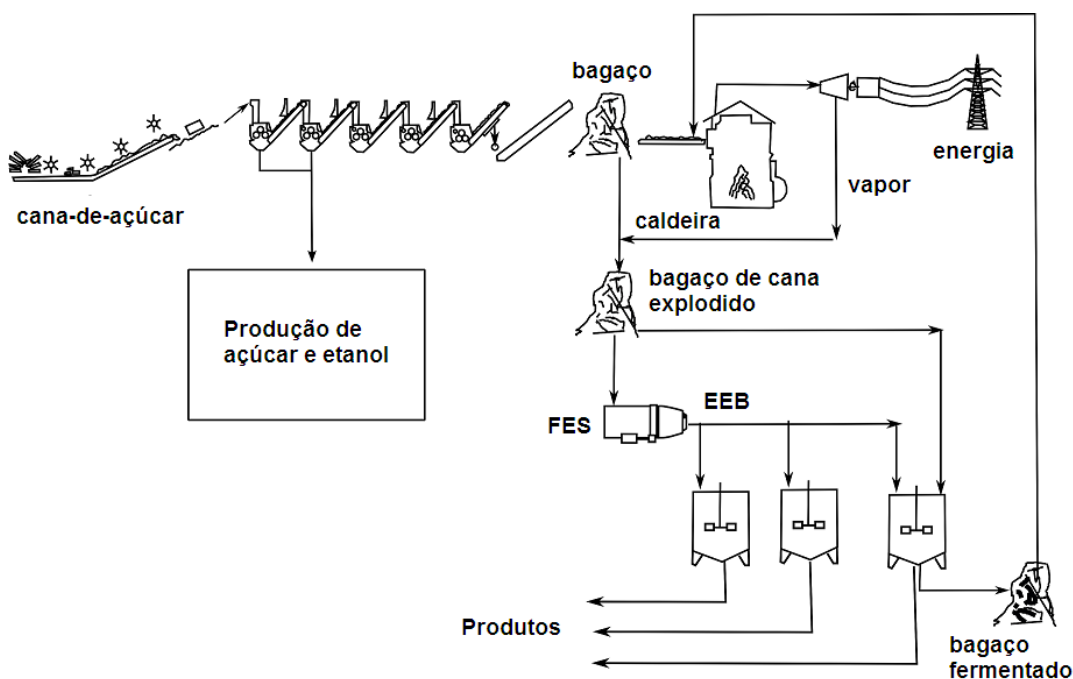


Figura 2.3 – Esquema ilustrativo de uma biorrefinaria
(LOPES et al., 2017).

2.2.1. Produção de etanol de segunda geração

A produção de etanol de segunda geração (E2G), que é realizada a partir de materiais lignocelulósicos, constitui uma alternativa economicamente vantajosa para aumentar a produção de biocombustíveis sem ampliar a área cultivada, utilizar resíduos como matéria-prima e substituir o uso de combustíveis fósseis.

A produção de etanol de primeira geração (E1G) é, geralmente, realizada em três etapas principais: obtenção de uma solução de açúcares fermentescíveis, fermentação destes açúcares em etanol e recuperação do etanol por destilação. Já a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (E2G) é composta por quatro processos, que incluem pré-tratamento da biomassa para tornar a celulose e a hemicelulose acessíveis a hidrólise; hidrólise do material pré-tratado, fermentação e recuperação do etanol por destilação (KORADIYA et al., 2016).

A rota bioquímica de produção de E2G a partir de materiais lignocelulósicos pode aproveitar parte da tecnologia e infraestrutura utilizadas para a produção de E1G, com a adição de duas etapas ao processo convencional, que são as etapas de pré-tratamento da biomassa e hidrólise desta. Além disso, a detoxificação e a fermentação de pentoses liberadas durante a etapa de pré-tratamento podem ser realizadas. A fração sólida do pré-tratamento contém a celulose que é posteriormente hidrolisada e a fração líquida contém o hidrolisado de hemicelulose. Uma vez completada a hidrólise da celulose, o hidrolisado resultante é fermentado e convertido a etanol, como ilustra a Figura 2.4 (CARDONA, QUINTERO e PAZ, 2010; MORO, 2015).

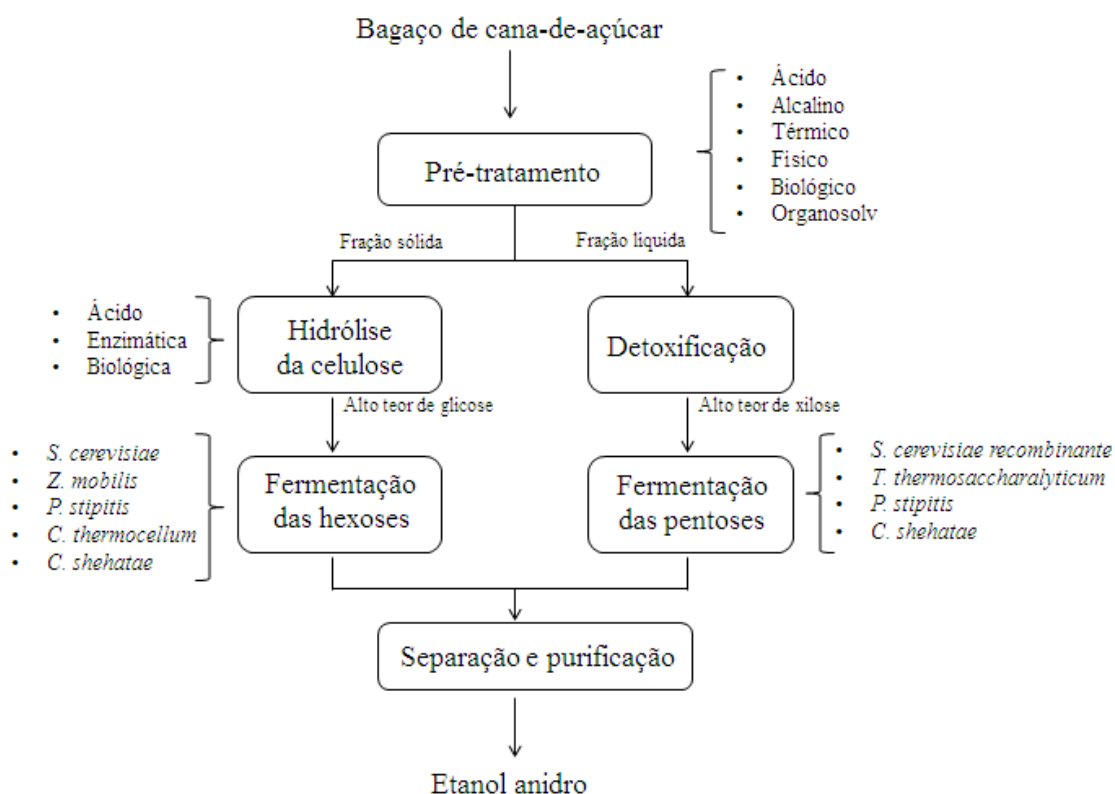


Figura 2.4 – Diagrama do processo de produção de E2G a partir de bagaço de cana-de-açúcar (adaptado de CARDONA, QUINTERO e PAZ, 2010; MORO, 2015).

2.2.1.1. Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica tem como objetivo romper a estrutura da parede celular para tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática, como mostra a Figura 2.5. Um pré-tratamento eficaz provoca redução no tamanho das partículas, aumento da área superficial do material, redução na cristalinidade da celulose, quebra das hemiceluloses e redistribuição da lignina sem que se tenha a formação de produtos que inibam a ação microbiana na fermentação alcoólica (BISWAS et al., 2014; TOMÉ, 2014; ADITIYA et al., 2016).

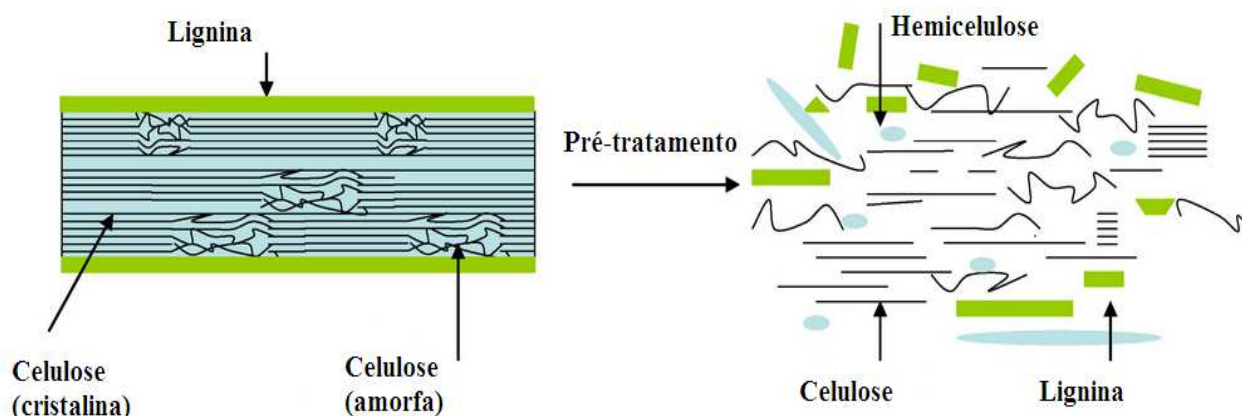


Figura 2.5 – Esquema dos efeitos do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica (adaptado de CABIAC et al., 2011).

Esta etapa é de grande importância para as etapas subsequentes, uma vez que torna disponíveis os açúcares fermentescíveis. Caso o pré-tratamento realizado não seja adequado, pode influenciar de forma negativa a hidrólise enzimática e gerar compostos inibidores da etapa de fermentação. Com isso, é essencial a escolha de um pré-tratamento adequado para que o processo de produção seja satisfatório (BISWAS et al., 2014; TOMÉ, 2014; ADITIYA et al., 2016).

O Quadro 2.1 mostra exemplos de pré-tratamento mais utilizados, que podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. No pré-tratamento de explosão a vapor, a biomassa é exposta a elevadas temperatura e pressão durante alguns minutos e, logo em seguida, sofre uma rápida descompressão. Essa mudança brusca causa uma “explosão” que rompe as ligações do material, reduzindo o tamanho das partículas e aumentando sua porosidade. Este pré-tratamento tem como vantagens bons rendimentos de açúcares e ausência de custos com tratamento de efluentes. Contudo, dependendo das condições empregadas, pode-se ter a geração de inibidores da fermentação, como compostos fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural a partir da degradação de lignina, pentoses e hexoses, respectivamente (ADITIYA et al., 2016).

No pré-tratamento químico, tem-se a solubilização da hemicelulose da biomassa de forma efetiva. A combinação entre concentração de ácido, temperatura e tempo de reação pode gerar grandes quantidades de açúcares provenientes da fração hemicelulósica. Após hidrólise da hemicelulose, constituída principalmente de xilana, são liberados diversos monossacarídeos, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose na maioria dos materiais lignocelulósicos (SANTOS, 2012).

Quadro 2.1 – Exemplo de métodos de pré-tratamento mais utilizados (HAMELINCK et al., 2005; RABELO, 2007)

Método	Processo	Descrição
Pré-tratamento físico	Explosão a vapor	A biomassa é tratada com vapor saturado (160 a 260 °C) seguida de uma rápida descompressão
	Termohidrólise	Utiliza água quente e alta pressão (pressões acima do ponto de saturação) para hidrolisar a hemicelulose
Pré-tratamento químico	Hidrólise ácida	Uso de ácidos concentrados ou diluídos, como H ₂ SO ₄ , HCl e HNO ₃
	Hidrólise alcalina	Uso de bases, como NaOH e Ca(OH) ₂
Pré-tratamento biológico	Biológico	Utilização de fungos para solubilizar a lignina.
Pré-tratamento físico-químico	Explosão a vapor catalisada	Adição de H ₂ SO ₄ ou CO ₂ na explosão de vapor para aumentar a remoção da hemicelulose
	Afex (<i>ammonia fibre explosion</i>)	Exposição à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um certo período de tempo, seguida de uma rápida descompressão

O pré-tratamento ácido pode ser conduzido com ácidos diluídos ou concentrados. A técnica de utilização de ácido concentrado gera inibidores, necessita de equipamentos resistentes, além de apresentar toxicidade e ser corrosiva, e por isso não é tão atrativa quanto a

técnica com ácido diluído, que costuma ser mais efetiva por apresentar menor degradação de açúcares e menor formação de inibidores. Entre os ácidos utilizados, encontram-se: H_2SO_4 , HCl , HF , CH_3COOH e HNO_3 (SANTOS, 2012).

2.2.1.2. Hidrólise enzimática

O processo de hidrólise quebra a cadeia longa de carboidratos para obtenção de açúcares fermentescíveis; e pode ser realizada com ácido concentrado, ácido diluído ou enzima. Esta etapa é essencial na produção de etanol, uma vez que a qualidade do hidrolisado afetará diretamente no processo de fermentação porque os microrganismos, que são utilizados na etapa de fermentação, somente são capazes de digerir a forma mais simples de açúcar derivado do carboidrato complexo da biomassa (ADITIYA et al., 2016).

Para que ocorra o processo enzimático, a biomassa lignocelulósica deve ser pré-tratada para aumentar a acessibilidade ao ataque das enzimas. Após esta etapa, ocorre a hidrólise enzimática, na qual a celulose é quebrada através das enzimas. Este processo ocorre em condições mais suaves e, com isso, uma menor quantidade de subprodutos é liberada, resultando em um alto rendimento de açúcares fermentescíveis, tais como glicose, manose, celobiose, xilose e arabinose.

As enzimas que podem degradar as biomassas lignocelulósicas são as celulasas, xilanases e pectinases. O complexo enzimático de celulasas, constituído por endoglucanase, exoglucanase e β -glicosidase, age como catalisador e é altamente específico (FISCHER, 2014). O mecanismo geral das celulasas é realizado por meio da clivagem das ligações β -1-4 glicosídicas, mas dependendo do seu sítio de ação na celulose, elas podem ser divididas em três grupos (ZÚÑIGA, 2010):

- i) Endoglucanases: enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise, pois quebram randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica.
- ii) Exoglucanases: constituídas pelas celobiohidrolases e pelas glucanohidrolases, catalisam a hidrólise nos terminais da fibra celulósica e promovem a quebra de oligossacarídeos formados na celobiose.
- iii) β -glicosidases: possuem a propriedade de hidrolisar a celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose.

As celulasas são insumos que impactam significativamente o processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Por isso, as tecnologias para produção das

enzimas e suas aplicações na hidrólise são processos em contínuo desenvolvimento para que a produção de etanol seja satisfatória (ZÚÑIGA, 2010; FISCHER, 2014).

Na produção de celulases, podem ser usados processos fermentativos como a fermentação em estado sólido (FES) e a fermentação submersa (FS). Em comparação com a FS, a FES possui vantagens por ser um processo mais simples, com baixos custos operacionais, menor gasto energético, menos volume de efluentes líquidos gerados, menor risco de contaminação, baixo capital de investimento e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (ROCHA et al, 2013; FISCHER, 2014; LIU et al., 2015).

Os materiais sólidos utilizados na FES podem ser materiais inertes, que só agem como um local de fixação para o microrganismo, e não inerte, que fornecerá nutrientes para o microrganismo. Os resíduos agroindustriais são ricos em nutrientes e podem ser utilizados como fonte de carbono e energia para o microrganismo. A aplicação destes resíduos é interessante por serem gerados em grandes quantidades e estarem disponíveis a custos baixos (FISCHER, 2014).

Diferentes microrganismos são capazes de produzir enzimas que hidrolisam a celulose por meio de fermentação em estado sólido (FES) ou por fermentação submersa (FS), como mostra o Quadro 2.2. Dentre os microrganismos existentes, os fungos filamentosos são os mais promissores para produção de enzimas, pois o desenvolvimento das hifas permite que os fungos colonizem e penetrem no substrato e na região porosa entre as partículas do substrato. Além disso, muitos destes microrganismos conseguem crescer sem maiores dificuldades em ambientes sólidos que apresentam baixa atividade de água (MENON e RAO, 2012; ROCHA et al., 2013; LIU et al., 2015).

Espécies de fungos que produzem celulases incluem, principalmente, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. O fungo *Aspergillus niger*, fonte do complexo celulolítico, é considerado o microrganismo ideal devido a sua grande capacidade de fermentação, elevados níveis de secreção de proteína, além da grande variedade de enzimas produzidas para diversas aplicações (FISCHER, 2014; LIU et al., 2015).

Quadro 2.2 – Microrganismos produtores de celulase e método de produção (MENON e RAO, 2012).

Microrganismo	Método de produção
<i>Acinetobacter anitratus</i>	FS
<i>Bacillus subtilis</i>	FES
<i>Bacillus pumilus</i>	FS
<i>Cellulomonas biazotea</i>	FS
<i>Clostridium papyrosolvans</i>	FS
<i>Thermoascus auranticus</i>	FES
<i>Neurospora crassa</i>	FS
<i>Trichoderma reesei</i>	FS
<i>Penicillium decumbens</i>	FES
<i>Aspergillus fumigatus</i>	FS
<i>Aspergillus terreus</i>	FES
<i>Aspergillus niger</i>	FES
<i>Fusarium oxysporum</i>	FES

FS: fermentação submersa; FES: fermentação em estado sólido

2.2.1.3. Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo biológico, realizado por microrganismos (leveduras ou bactérias), que converte compostos orgânicos, como açúcares, em compostos mais simples, como o etanol e outros subprodutos. A forma mais simples e comum de obter etanol no Brasil é através de fermentação devido a diversidade de matérias-primas naturais e residuais existentes no país (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

Para otimizar a produção de etanol de segunda geração, pode-se realizar as etapas de hidrólise e fermentação alcoólica de forma separada (SHF) ou realizar a sacarificação e fermentação de forma simultânea (SSF).

A SHF é realizada em duas etapas, em que a lignocelulose é hidrolisada utilizando enzimas para disponibilizar os açúcares, e estes são fermentados a etanol, na segunda etapa, usando várias leveduras, tais como *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zymomonas*, bem como seus recombinantes. A principal vantagem é a possibilidade de se conduzir a hidrólise e a fermentação em suas condições ótimas de pH e temperatura. Porém, pode-se ocorrer a inibição do complexo enzimático de celulases pelos açúcares liberados na

hidrólise, principalmente celobiose e glicose que se acumulam no meio, resultando em uma hidrólise incompleta da celulose e rendimentos mais baixos. Outra desvantagem é a possibilidade de contaminação devido ao longo tempo envolvido na etapa de hidrólise (MENON e RAO, 2012; FISCHER, 2014).

Na SSF, a hidrólise e fermentação alcoólica ocorrem na mesma etapa. Como vantagens, tem-se a redução da inibição das celulasas pelo produto, pois os açúcares gerados pelas enzimas são consumidos imediatamente pelo microrganismo responsável pela fermentação alcoólica; o menor custo do processo, reduzindo o número de reatores e os riscos de contaminação devido às baixas concentrações de açúcar livre e pela presença de etanol no meio. A desvantagem da SSF é o desfavorecimento da cinética enzimática porque é necessário conduzir o processo dentro da faixa ótima do microrganismo fermentador (MENON e RAO, 2012; FISCHER, 2014).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados nas fermentações alcoólicas. É bastante utilizada na produção industrial de álcool combustível devido a sua capacidade de assimilar facilmente a glicose da cana ou da celulose de biomassas. Possui importantes características, como alta eficiência fermentativa, tolerância a baixos valores de pH e alta concentração de açúcar e etanol, capacidade de crescer anaerobicamente, alta resistência a inibidores presentes na biomassa hidrolisada e, ainda, alta competitividade perante contaminação na fermentação industrial (FISCHER, 2014).

2.2.1.4. Histórico do E2G no Brasil

O uso indiscriminado de combustíveis fósseis pela humanidade desde o início da civilização ocasionou mudanças climáticas no mundo. Um marco na história do etanol no Brasil foi a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), em 1975, que instituiu e consolidou o uso do álcool hidratado e a mistura deste com gasolina como combustível. A experiência serviu como alternativa para diminuir a dependência de períodos politicamente e economicamente variáveis devido a crise mundial do petróleo. Neste programa, a cana-de-açúcar foi escolhida como matéria-prima para produção de etanol em função das características geográficas do Brasil e, como consequência, intensificaram-se as pesquisas neste tema, levando o país a uma posição muito favorável em termos de segurança energética (SOCCOL et al., 2010; FISCHER, 2014).

A produção de E1G, a partir dos açúcares extraídos da cana-de-açúcar, vem gerando grandes excedentes de bagaço, com potencial para serem transformados em E2G e aumentar

significativamente a oferta deste combustível, sem exigir um aumento proporcional das áreas de plantio (NOVACANA, 2016).

O uso de biomassas lignocelulósicas para produção de etanol é favorecida no Brasil, pois o processo de produção pode ser anexado às usinas de açúcar e álcool já existentes, exigindo menores investimentos, infraestrutura, logística e fornecimento de energia. Neste cenário, mais etanol seria produzido a partir da mesma quantidade de cana-de-açúcar processada, sem aumentar a área utilizada para o cultivo da cana-de-açúcar. O rendimento de etanol é equivalente a 6.000 L/hectare plantado, e estima-se que a produção de etanol poderá chegar a 10.000 L/ha se apenas metade do bagaço gerado for aproveitado para a produção de biocombustíveis (CANILHA et al., 2012; SOCCOL et al., 2010).

A construção da primeira usina de etanol celulósico em escala comercial no Brasil, em Alagoas, representa um grande avanço. Atualmente, duas empresas – GranBio e Raízen – têm usinas de etanol celulósico em funcionamento no Brasil. A GranBio foi a primeira a inaugurar uma unidade produtora de etanol E2G em escala comercial no país. A Bioflex 1, unidade industrial da GranBio, começou a operar em setembro de 2014, em São Miguel dos Campos (AL), e tem capacidade anual de produção de 82 milhões de litros. Em 2015, a fábrica produziu 4 milhões de litros do biocombustível a partir da palha da cana e este volume foi comercializado no Nordeste. Em abril de 2016, contudo, a usina parou de operar devido a necessidade de ajustes na etapa de pré-tratamento da biomassa (NOVACANA, 2016).

A Raízen é a segunda unidade produtora de etanol E2G e foi inaugurada em novembro de 2014, em Piracicaba (SP). A fábrica tem capacidade para produzir 42 milhões de litros por ano e fica ao lado da usina de etanol de primeira geração, que também pertence ao grupo e produz 100 milhões de litros anuais. Após algumas paradas para ajustes, desde abril de 2016 a fábrica trabalha em regime contínuo e tem como objetivo atingir uma produção de 42 milhões de litros até 2018 (NOVACANA, 2017).

2.2.3. Surfactantes e Biossurfactantes

Os tensoativos ou surfactantes são compostos químicos amplamente utilizados em variados setores industriais. A grande maioria dos surfactantes é sintetizada a partir de derivados do petróleo. Contudo, a crescente preocupação ambiental levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os surfactantes são agentes ativos de superfície que reduzem a energia livre do sistema por substituir a maior parte das moléculas de alta energia na interface, diminuindo a tensão superficial e interfacial dos líquidos. Eles contêm uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico que é fortemente atraído pelo meio aquoso (MULLIGAN, 2005).

A presença de grupos anfifílicos faz com que os surfactantes tenham a tendência de se distribuir nas interfaces fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, a qual reduz a tensão superficial e interfacial, é responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes, como: detergência, emulsificação, lubrificação, ação espumante e antiespumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (LIN, 1996; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Os biossurfactantes são compostos tensoativos, produzidos microbiologicamente, que possuem estruturas semelhantes aos surfactantes de origem sintética. Eles podem ser sintetizados como produtos metabólicos por diferentes microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, utilizando vários substratos de baixo custo incluindo açúcares, óleos, resíduos industriais e agrícolas (BANAT, MAKKAR E CAMEOTRA, 2000).

Nas últimas décadas, os biossurfactantes ganharam maior atenção porque apresentam algumas vantagens como elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceitabilidade ecológica, estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e concentrações de sal, capacidade de serem produzidos a partir de substratos renováveis e mais baratos (DESAI e BANAT, 1997; EL-SHESHTAWY e DOHEIM, 2014).

2.2.3.1. Tipos de biossurfactantes

No Quadro 2.3 estão listados os principais tipos de biossurfactantes e microrganismos envolvidos em sua produção. Os surfactantes sintéticos são classificados de acordo com a natureza do seu grupo polar. Já os biossurfactantes são classificados, principalmente, de acordo com sua composição química e origem microbiana. Os microrganismos podem produzir diversas classes de biossurfactantes e as principais incluem glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos, biossurfactantes poliméricos e biossurfactantes particulados (EL-SHESHTAWY e DOHEIM, 2014; NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Quadro 2.3 – Principais tipos de biossurfactantes e microrganismos produtores
(DESAI e BANAT, 1997).

Tipos de biossurfactantes	Microrganismos
Glicolipídeos	
Raminolipídeos	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Trealolipídeos	<i>R. erythropolis</i> , <i>N. erythropolis</i> , <i>Mycoacterium</i> sp.
Soforolipídeos	<i>T. bombicola</i> , <i>T. apicola</i> , <i>T. petrophilum</i> , <i>Candida</i> sp.
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	
Peptídeo-lipídeo	<i>B. licheniformis</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Surfactina	<i>B. subtilis</i>
Gramicidina	<i>B. brevis</i>
Ácidos Graxos, Lipídeos Neutros e Fosfolipídeos	
Ácidos graxos	<i>C. lepus</i>
Lipídeos Neutros	<i>N. erythropolis</i>
Fosfolipídeos	<i>T. thiooxidans</i>
Surfactantes Poliméricos	
Emulsan	<i>A. calcoaceticus</i>
Biodispersan	<i>A. calcoaceticus</i>
Manana-lipídeo-proteína	<i>C. tropicalis</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Carboidrato-lipídeo-proteína	<i>P. fluorescens</i> , <i>D. polymorphis</i>
Surfactantes Particulados	
Vesículas	<i>A. calcoaceticus</i>
Células	Várias bactérias

Os biossurfactantes possuem uma estrutura comum: uma porção hidrofóbica usualmente composta por cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, que podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, ligados à uma porção hidrofílica, que

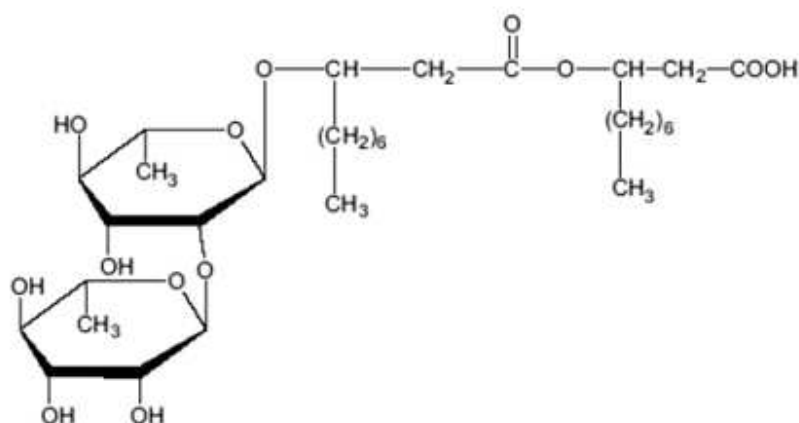
consiste de aminoácido, éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

2.2.3.2. Glicolipídeos

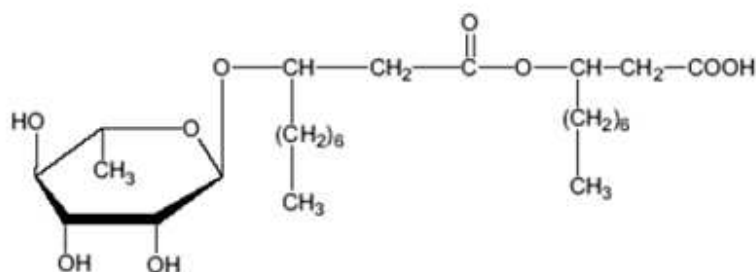
Os biossurfactantes mais conhecidos pertencem ao grupo dos glicolipídeos, que são formados por uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou hidróxi-ácidos ligados a uma ou duas moléculas de raminose. Jarvis e Jonhson (1949) estudaram, pela primeira vez, a produção de glicolipídeos contendo raminose, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI e BANAT, 1997).

Na Figura 2.6 estão representados os raminolipídeos do tipo I, L-ramnosil-L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, e do tipo II, L-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, que são os principais glicolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Os soforolipídeos, que são produzidos principalmente por leveduras, consistem em uma molécula de soforose ligada a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado, como mostra a Figura 2.7 (DESAI e BANAT, 1997). Entre as leveduras, as espécies de *Candida* têm sido amplamente utilizadas na produção de biossurfactantes a partir de fontes de carbono solúvel e insolúvel (SARUBBO, LUNA e CAMPOS-TAKAKI, 2006).



(A) raminolipídeo tipo I



(B) raminolipídeo tipo II

Figura 2.6 – Estruturas dos raminolipídeos dos tipos I (A) e II (B) de *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI e BANAT, 1997; BORGES, 2011).

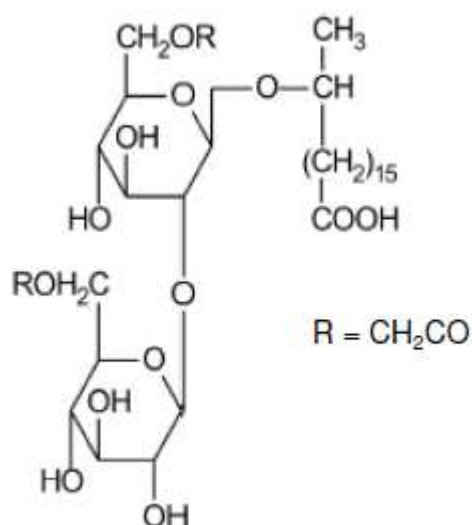


Figura 2.7 – Estrutura de um sofrorolipídeo de *Torulopsis bombicola* (DESAI e BANAT, 1997; BORGES, 2011).

Em comparação com outros biossurfactantes, como os raminolipídeos que são produzidos por microrganismos patogênicos, os sofrorolipídeos podem ser produzidos em grandes quantidades por espécies de *Candida* não-patogênicas. Além disso, podem ser produzidos utilizando matérias-primas fermentativas de baixo custo, tais como gordura animal, soro de queijo desproteínizado, melaço de soja, óleo residual de restaurante e outras, para reduzir o custo de produção (DAVEREY e PAKSHIRAJAN, 2009). Os sofrorolipídeos podem diminuir a tensão superficial e interfacial, porém não são agentes emulsionantes eficazes (DESAI e BANAT, 1997).

2.2.3.3. Propriedades gerais e aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes apresentam diversas funções fisiológicas, tais como (NITSCHKE e PASTORE, 2002):

- emulsificação e solubilização de compostos insolúveis em água;
- transporte de hidrocarbonetos;
- atividade antibiótica;
- aderência e liberação da célula a superfície: os microrganismos podem utilizar surfactantes ligados à sua parede celular com o intuito de aderir ou se desligar de um determinado local, conforme sua necessidade, buscando ambientes com maior disponibilidade de nutrientes.

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, a maioria dos biossurfactantes reduz a tensão superficial do meio aquoso. Essa tensão superficial é o aumento das forças atrativas intermoleculares na superfície do meio (BORGES, 2011). Além disso, alguns destes compostos apresentam elevada estabilidade térmica e de pH, podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas; são facilmente degradáveis, tornando-os adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos; e possuem baixa toxicidade, podendo ser utilizados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Biossurfactantes têm aplicações extensivas em muitos setores tais como petróleo, cosméticos, detergentes, fármacos, mineração e metalurgia, proteção ambiental, entre outros. Eles podem ser usados como emulsionantes, molhantes, agentes dispersantes e espumantes. O Quadro 2.4 apresenta algumas destas aplicações.

Quadro 2.4 – Funções dos biossurfactantes e suas aplicações (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000).

Funções	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos e alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza e agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Sequestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Estimuladores de crescimento microbiano	Tratamento de esgoto para resíduos oleosos, fermentação
Demulsificantes	Tratamento de resíduos e recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações e oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água e calcário-água
Fungicidas	Controle biológico de fitopatógenos

2.2.3.4. Produção de biossurfactantes

A produção de um biossurfactante envolve as etapas de concentração, recuperação e purificação do produto final. Esta produção é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio, concentrações de fósforo, manganês e ferro no meio, além das condições de cultivo, como pH, temperatura e agitação (BORGES, 2011).

Várias fontes diferentes de nitrogênio como nitrato, amônia e ureia têm sido utilizadas para a produção de biossurfactantes, sendo nitrato a melhor fonte de nitrogênio para a indução da síntese desses compostos. A fonte de carbono é importante no processo de fermentação, pois fornece características à estrutura do biossurfactante, e pode ser escolhida pelo custo e pela forma de aplicabilidade que pretende utilizar o produto final. Entre as fontes

de carbono disponíveis, pode-se citar glicose, glicerol, alcanos, óleos vegetais, biomassas lignocelulósicas e outras (HENKEL et al., 2012).

Benincasa e Accorsini (2008) estudaram a produção de raminolipídeos de *P. aeruginosa* a partir de resíduos da produção de óleo de girassol em diferentes condições, como um sistema integrado de plantas de refinaria de óleo vegetal, e obtiveram até 7 g/L de raminolipídeo.

Silva et al. (2014) avaliaram a produção de biossurfactante em diferentes substratos de baixo custo utilizando quatro espécies de *Pseudomonas*: *P. cepacia*, *P. acidovorans*, *P. picketti* e *P. fluorescens*. O melhor resultado obtido foi com *P. cepacia* em meio mineral suplementado com 2,0 % de água de maceração de milho e 2,0 % de óleo de fritura residual, durante 144 h a 30 °C e agitação de 200 rpm. A tensão superficial do meio foi reduzida para 27,57 mN/m ao final do cultivo, obtendo-se 5,2 g/L de biossurfactante.

Gudiña et al. (2015) utilizaram substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante de *P. aeruginosa*. A produção mais elevada (3,2 g/L) foi obtida utilizando meio de cultura composto por melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho. O biossurfactante reduziu a tensão superficial da água até 30 mN/m e apresentou atividade emulsificante de 60%.

O uso de efluentes gordurosos resultantes do abate de aves e suínos como substrato para produção de raminolipídeo foi estudado por Borges et al. (2015), e obtiveram 5,37 g/L de biossurfactante, tensão superficial de 25,6 dyna/cm e índice de emulsificação de 100%.

2.3. ASSOCIAÇÃO DE REDES NEURAIS E MÉTODOS HEURÍSTICOS NA OBTENÇÃO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS DE FERMENTAÇÃO

As redes neurais artificiais foram desenvolvidas na década de 40, inspiradas no funcionamento das redes neurais. Os primeiros estudos se referem ao desenvolvimento de um modelo de neurônio artificial, como representado na Figura 2.8. Esta figura mostra duas representações para um neurônio artificial que recebe informações x_1, x_2, \dots, x_n e a partir destas informações gera uma resposta y . Neste neurônio v (soma das informações recebidas multiplicadas pelos pesos w_1, w_2, \dots, w_n e somada a uma tendência b) é o potencial de ativação e f é uma função de ativação que quando calculada a partir do valor do potencial de ação gera a resposta de interesse (COUTINHO FILHO, 2015).

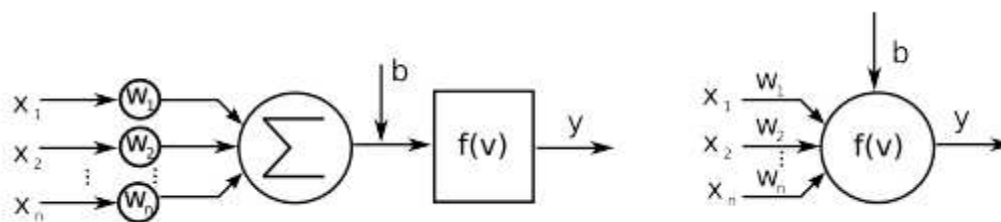


Figura 2.8 – Rede neural artificial (COUTINHO FILHO, 2015).

Matematicamente: $v = w_1 \times x_1 + w_2 \times x_2 + \dots + w_n \times x_n + b = \sum_{i=1}^n w_i \times x_i + b$, ou seja, $y = f(\sum_{i=1}^n w_i \times x_i + b) = f(v)$.

Este modelo foi inicialmente desenvolvido por McCulloch e Pitts (1943) e ampliada por Frank Rosenblatt (1958) quando ficou conhecido como *perceptron*. Embora seja uma representação extremamente simplificada de neurônios, pode ser feito o uso da associação de neurônios que segue este modelo de forma a gerar redes de neurônios. Redes maiores e mais complexas se tornam aproximadores universais, pois com um número adequado de neurônios possibilitam aproximar qualquer função (COUTINHO FILHO, 2015).

Se uma rede neural já estiver validada, torna-se necessário, associar a esta rede, métodos capazes de buscar respostas de interesse, que constituem uma função objetivo que precisa ser minimizada ou maximizada. A utilização de redes neurais na otimização pode ser realizada pelo uso de métodos heurísticos como os enxames inteligentes, que representam uma busca de otimização que pode ser utilizada tanto no ajuste da rede quanto no uso da mesma, sendo que cada um destes usos tem um objetivo distinto de otimização. O objetivo da otimização é encontrar uma solução ótima para um problema que satisfaça uma ou mais funções objetivo possivelmente sujeitas a um conjunto de restrições (COUTINHO FILHO, 2015).

A Inteligência de Enxame ou Swarm Intelligence (SI) pode ser definida como a capacidade coletiva de animais sociais de resolverem problemas como resultado direto de auto-organização, no qual a interação dos componentes (seres) em baixo nível (interação individual entre os componentes) gera uma dinâmica global que pode ser chamada de inteligência (COUTINHO FILHO, 2015). Há diversos tipos de SI, como:

- Evolutionary Algorithms (i.e., The Genetic Algorithm – GA);
- Particle Swarm Optimization (PSO);
- Artificial Bee Colony Optimization (ABCoptim);
- Ant Colony Optimization (ACO).

Os métodos de enxame citados (GA, PSO, ABCOptim, ACO) inspiram-se em formas que seres vivos sociais ou parte de sistemas vivos caminham em direção a uma solução dita ótima ou otimizada. A diferença chave entre os métodos de enxame de otimização (SOM) e a busca direta do ótimo (MBD) vem do fato que os SOM geram uma população de solução para cada iteração e não uma única solução como são os casos dos MBD (COUTINHO FILHO, 2015).

Auto-organização representa um dos princípios dos SI e tem como base quatro elementos:

- Feedback positivo: conjunto de regras simples que, combinadas, geram estruturas de organização;
- Feedback negativo: gera um mecanismo de contrabalanço do feedback positivo (pode ser, por exemplo, critérios de limitação de busca a cada iteração);
- Aleatoriedade: gera incerteza que leva a descoberta de novos caminhos ou soluções e, também, reduz o efeito do feedback positivo;
- Interações múltiplas entre os elementos da população (indivíduos).

CAPÍTULO 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são apresentados os microrganismos, as biomassas e os materiais utilizados nos experimentos, bem como a descrição detalhada dos procedimentos adotados para produção de etanol e biossurfactante. Na Figura 3.1 é apresentado um fluxograma com as principais etapas realizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

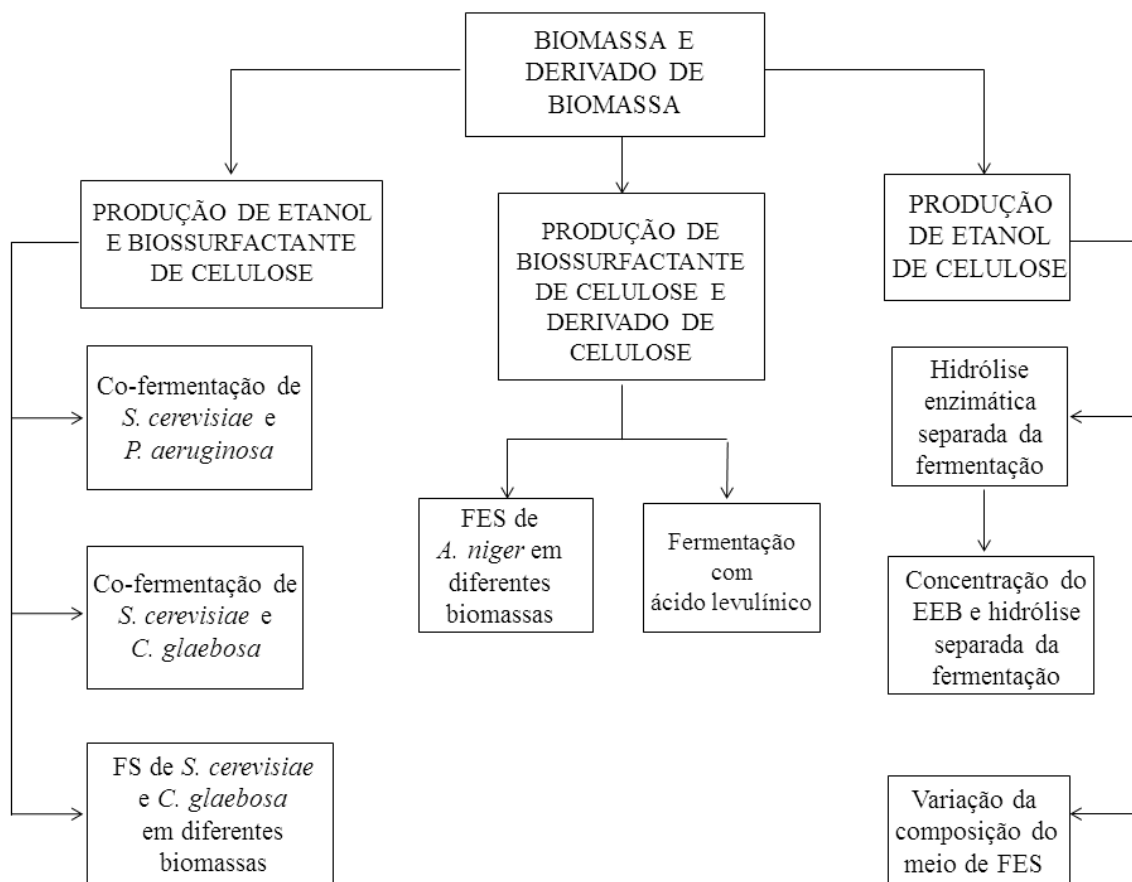


Figura 3.1 – Fluxograma ilustrativo das etapas desenvolvidas neste trabalho.

3.1. MICRORGANISMOS

O fungo *Aspergillus niger* ATCC 16404 adquirido da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, SP – Brasil) foi utilizado nas fermentações em estados sólido (FES) para produção de extratos enzimáticos brutos (EEB) e para investigação da produção de biossurfactante. Para a preservação, o fungo foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultura Batata Glicose Agar (PDA), de composição descrita na Tabela 3.1

(DSMZ, 2017), conservado sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) e renovado por cultivo a cada 20 dias para manutenção da cultura.

Tabela 3.1 – Composição do meio PDA.

PDA (g/L)	
Infusão de batatas	200,0
Glicose	20,0
Agar	15,0

A levedura utilizada para as fermentações alcoólicas foi a cepa *Saccharomyces cerevisiae* Y904, produzida pela Mauri Brasil Ind. Com. Ltda, na forma liofilizada, sendo estocada sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) em embalagem fechada.

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi utilizada para a produção de biossurfactante. Esta bactéria é oriunda da Coleção de Cultura Tropical da Fundação André Tosello (Campinas, SP – Brasil) e foi mantida em tubos de ensaio com meio inclinado, cuja composição é apresentada na Tabela 3.2. A incubação foi realizada por 48 horas em estufa a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e, posteriormente, os cultivos foram mantidos sob refrigeração ($5 \pm 1^\circ\text{C}$).

Tabela 3.2 – Composição do meio de cultura para manutenção da *Pseudomonas aeruginosa*.

Componentes	Concentração (g/L)
Sacarose	20,0
Extrato de carne	3,0
Peptona de carne bacteriológica	5,0
Agar	20,0

A levedura *Candida glabrata* L75, da coleção de culturas da Divisão de Recursos Microbianos do Centro Pluridisciplinas de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/Unicamp), foi utilizada no estudo de produção de biossurfactante. A levedura foi preservada em frascos de penicilina, em ultrafreezer a -70°C , contendo meio padrão de levedura, conforme composição descrita na Tabela 3.3, e glicerol a 50% (v/v).

Tabela 3.3 – Composição do meio de cultura para manutenção da *Candida glabrata*.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	3,0

3.2. BIOMASSAS

As biomassas utilizadas neste trabalho foram: bagaço de cana-de-açúcar não tratado (*in natura*); bagaço de cana tratado com explosão a vapor em condições de baixa severidade (12 kgf/cm², 8 min), gentilmente cedido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba/SP; farelo e casca de arroz, adquiridos em uma beneficiadora da região (Uberlândia/MG); sabugo de milho triturado e farelo de trigo, obtidos no mercado local de abastecimento de alimentos; e sorgo biomassa, cedido pela Embrapa.

As biomassas utilizadas nas fermentações em estado sólido (FES) foram bagaço de cana explodido, farelo de arroz, sabugo de milho e farelo de trigo.

As biomassas utilizadas nas fermentações submersas (FS) foram bagaço de cana explodido, bagaço de cana *in natura*, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa. Estas biomassas, com exceção do bagaço de cana explodido, foram tratadas com ácido diluído H₂SO₄ 2% por 30 min em autoclave a 121°C, com uma carga de sólidos de 5% (p/v) (DÁVILA et al., 2014). Posteriormente, as biomassas foram lavadas com água destilada por duas vezes e logo em seguida secas em estufa a 50 °C e armazenadas em temperatura ambiente (30 °C ± 2°C).

Nas Figuras 3.2 e 3.3 são apresentadas as biomassas utilizadas neste trabalho.



Figura 3.2 – Imagem ilustrativa das biomassas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa, tratadas com H₂SO₄ diluído.

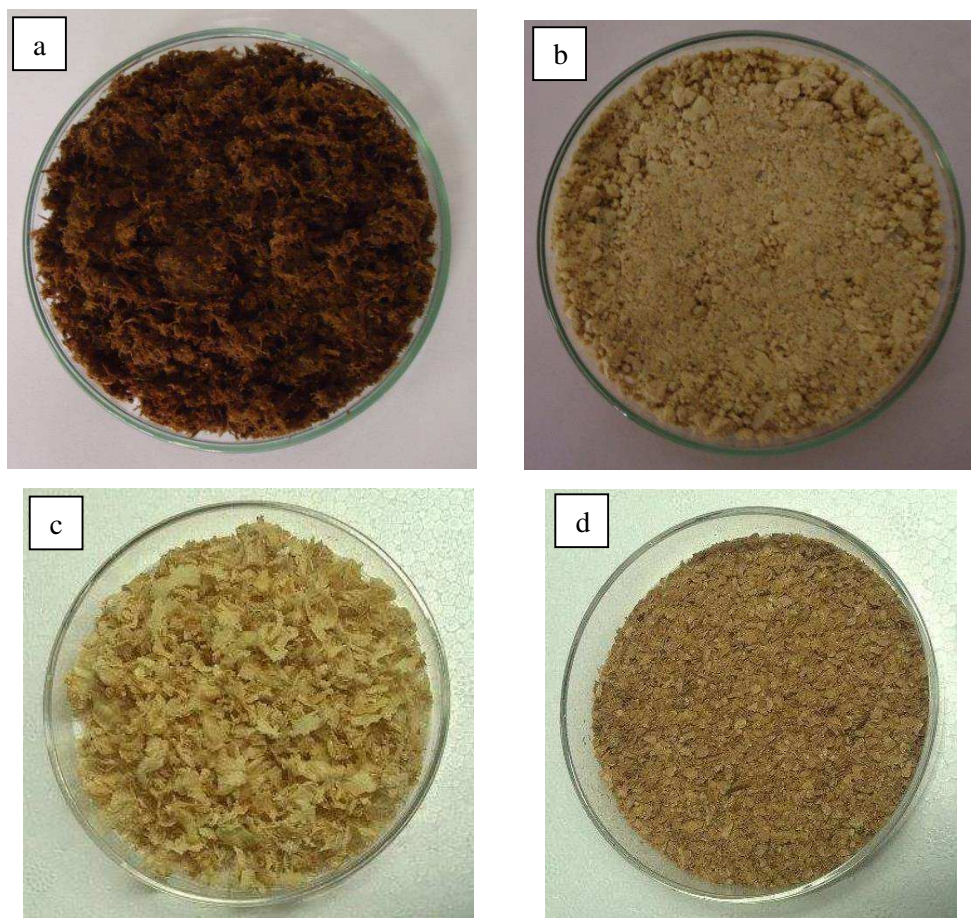


Figura 3.3 – Imagem ilustrativa das biomassas bagaço de cana explodido (a), farelo de arroz (b), sabugo de milho (c) e farelo de trigo (d).

3.3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

A seguir, serão descritas as etapas dos processos fermentativos realizados para o estudo da produção de etanol e biossurfactante.

3.3.1. Fermentações

Neste trabalho foram realizados dois tipos de fermentações: fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS). A FES foi utilizada para produção de extrato enzimático bruto (EEB) e biossurfactante, na qual foi utilizado o fungo *Aspergillus niger*. Além disso, foram realizadas FSs empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, para produção de etanol, e *Candida glabrata*, para produção de biossurfactante, e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, para produção de biossurfactante.

3.3.1.1. Fermentação em estado sólido (FES)

A FES foi realizada em três etapas sequenciais: preparo do inóculo, fermentação sólida e extração.

O preparo do inóculo para a FES foi realizado em reatores cônicos de 500 mL de volume, cada um contendo 100 mL de meio de cultura Czapek líquido (DSMZ, 2017), conforme composição: glicose (20,0 g/L), NaNO₃ (2,0 g/L); K₂HPO₄ (1,0 g/L); MgSO₄ (0,5 g/L); KCl (0,5 g/L); FeSO₄ (0,01 g/L). O meio de cultura foi previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min. Esporos do fungo *A. niger*, obtidos da raspagem de uma placa de petri contendo o fungo em estudo, foram inoculados nos reatores, que continham tampão de algodão envolto com gaze. O meio inoculado foi mantido sob agitação a 120 rpm, por 48 h e em temperatura ambiente (30 ± 2°C). Após essa etapa, as células geradas foram centrifugadas e ressuspensas em 40 g de água destilada estéril, obtendo uma concentração celular da ordem de 10⁶ esporos/g (FISCHER, 2014). Logo em seguida, estas células foram utilizadas na FES.

As fermentações sólidas para produção de enzimas e biossurfactantes foram realizadas em reator estático (frascos cônicos de 500 mL de volume) com 40 g de substrato e 40 g de água com células de *A. niger* centrifugadas, obtidas do inóculo (etapa anterior). A composição do substrato sólido e o tempo de fermentação foram definidos em cada experimento.

A extração das enzimas e do biossurfactante foi realizada utilizando 100 mL de meio extrativo, que foi definido e descrito em cada experimento. Os meios extrativos estudados foram água destilada estéril, solução de Tween 80 a 1% em água destilada, inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* com ausência das células, denominado solução de raminolípideo a 0,4%, e inóculo de *Candida glabrata* com ausência das células. Após adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se o extrato enzimático bruto (EEB).

Para o preparo do inóculo de *P. aeruginosa*, foi utilizado meio de cultura, conforme composição: glicose (10,0 g/L); extrato de levedura (11,0 g/L); NH₄NO₃ (5,7 g/L); MgSO₄·7H₂O (0,2 g/L); Na₂HPO₄ (7,0) e KH₂PO₄ (3,0 g/L), previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min. Um tubo de ensaio contendo a *P. aeruginosa* foi inoculado em erlenmeyer de 250 mL de volume, com tampão de algodão envolto em gaze, contendo 100 mL do meio de cultura. O meio inoculado foi mantido em mesa agitadora a 120 rpm, por 48 h em temperatura ambiente (30 ± 2°C). Após 48 h, o inóculo foi centrifugado para ser usado como meio extrativo com ausência das células.

O inóculo de *Candida glabrata* foi preparado em erlenmeyer de 250 mL de volume, com tampão de algodão envolto em gaze, contendo 100 mL de meio de cultura, de composição descrita na Tabela 3.3, previamente esterilizado em autoclave a 1,0 atm por 20 min. Foram retirados 2 mL da levedura preservada em frascos de penicilina, com auxílio de seringa estéril, e inoculados no meio de cultura. O meio inoculado foi mantido em mesa agitadora a 120 rpm, por 48 h em temperatura ambiente ($30 \pm 2^\circ\text{C}$). Após 48 h, o inóculo foi centrifugado para ser usado como meio extrativo com ausência das células.

3.3.1.2. Fermentação submersa (FS) para produção de etanol e biossurfactante

Para a produção de etanol e biossurfactante, as FS foram realizadas em reatores cônicos estáticos de 250 mL de volume, contendo 100 mL de EEB gerado na FES, substrato sólido e microrganismo.

As fermentações foram conduzidas em mesa agitada a 120 rpm, com controle de temperatura, e as condições operacionais (substrato e microrganismo) foram definidas em cada experimento. Em todas as fermentações submersas foi feita a suplementação com nutrientes nas concentrações (g/L): KH_2PO_4 5,0, MgSO_4 1,0, NH_4Cl 1,0, KCl 5,0 e extrato de levedura 6,0.

3.3.2. Avaliação da produção simultânea de biossurfactante e etanol de *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*

Avaliou-se a produção conjunta de biossurfactante e de etanol pelo uso de diferentes extratos enzimáticos brutos gerados por FES de *Aspergillus niger*. Estes EEB obtidos foram produzidos a partir de diferentes combinações de meio sólido composto de bagaço de cana explodido, sabugo de milho triturado e farelo de arroz.

O EEB utilizado foi obtido por FES de 72 h a 30°C pela adição de 10^6 células/g de *A. niger* ressuspensas em 40 g de água destilada estéril, gerando uma umidade de 50% no meio sólido da FES. As fermentações foram realizadas em reator cônico estático com os meios FES1 e FES2 de composição apresentada na Tabela 3.4 e proporção das biomassas baseada no trabalho de Fischer et al. (2014).

Tabela 3.4 – Meios da FES.

Meio	Características
FES1	40% de bagaço de cana explodido, 60% de farelo de arroz
FES2	40% de sabugo de milho, 60% de farelo de arroz

Foram produzidos nove extratos enzimáticos (E1 a E9) diferentes entre si na composição do meio extrativo e quantidade de meio sólido utilizado na extração, conforme mostra a Figura 3.4 e Tabela 3.5. Na extração simples (S) de 40 g de meio de uma FES, 100 mL de meio extrativo foram adicionados ao reator cônico, onde foi realizada a fermentação. Após adição do meio extrativo, o meio sólido fermentado foi agitado com auxílio de um bastão de vidro e filtrado, obtendo-se 100 mL de extrato enzimático bruto (EEB). Para extração dupla (D), 100 mL de meio extrativo foram utilizados para extração de 80 g de meio sólido, ou seja, extração de duas FESs, cada uma contendo 40 g de meio sólido e obtenção ao final de 100 mL de EEB. Para extração tripla (T), o mesmo procedimento foi realizado para extração de 120 g de meio sólido, ou seja, extração de três FESs, cada uma contendo 40 g de meio sólido, e obtenção de 100 mL de EEB ao final do procedimento.

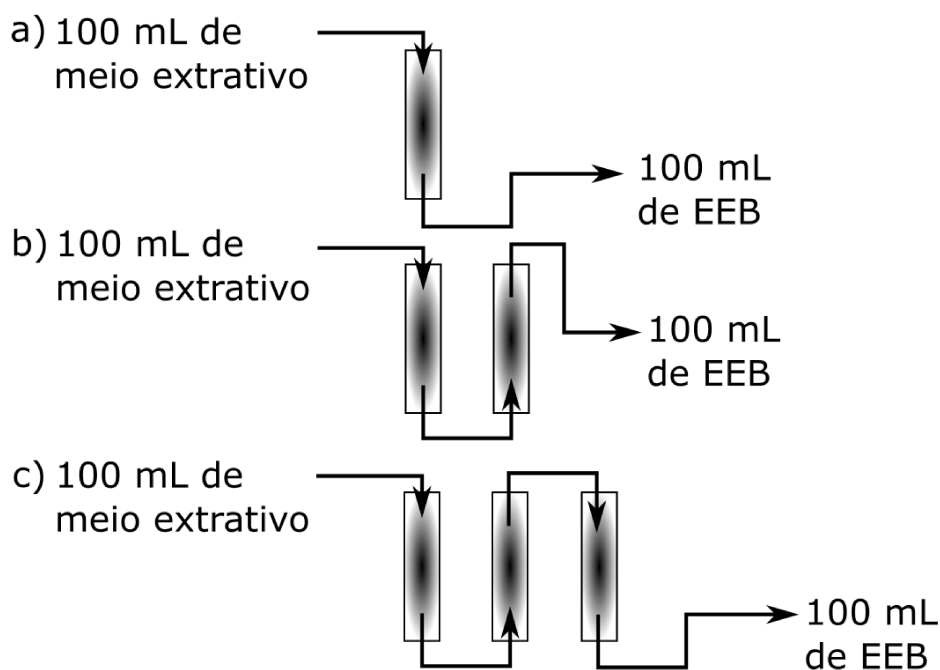


Figura 3.4 – Extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados com extração simples (S, item a), dupla extração (D, item b) e tripla extração (T, item c).

Tabela 3.5 – Extratos enzimáticos brutos (EEB) gerados por fermentação em estado sólido (FES).

EEB	Meio da FES ^a	FES (g) ^b	Meio extrativo ^c
E1	100% FES1	40	100% TW
E2	100% FES1	40	50% TW + 50% RH
E3	100% FES1	40	100% RH
E4	100% FES2	40	100% RH
E5	50% FES1, 50% FES2	80	100% RH
E6	100% FES1	80	100% RH
E7	100% FES2	80	100% RH
E8	100% FES1	120	100% RH
E9	100% FES2	120	100% RH

^a FES1: 40% de bagaço de cana explodido, 60% de farelo de arroz. FES2: 40% de sabugo de milho e 60% de farelo de arroz.

^b Quantidade de meio sólido utilizado para produzir 100 mL de EEB após a extração da enzima obtida em FES.

^c TW e RH representam tween 80 a 1% e raminolípídeo a 0,4%, respectivamente.

As fermentações submersas foram realizadas para os nove extratos enzimáticos gerados em duas sequências de experimentos. Foi inicialmente testada a substituição do tween 80 1% por raminolípídeo 0,4%, proveniente do inóculo de *P. aeruginosa* centrifugado (extratos E1 a E3), e, sequencialmente, avaliados os extratos enzimáticos E3 a E9 obtidos com o uso do meio extrativo de raminolípídeo 0,4%

Em todas as fermentações, foi utilizado 100 mL de cada extrato enzimático bruto distinto, 250 g/L de bagaço de cana-de-açúcar explodido, 30 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*, 25 mL de inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* (10^6 células/mL) e nutrientes nas concentrações descritas no item 3.3.1.2.

3.3.3. Avaliação da produção simultânea de biossurfactante e etanol de *C. glabrosa* e *S. cerevisiae*

Neste estudo, foram realizados testes visando a produção simultânea de biossurfactante e etanol, utilizando as leveduras *C. glabrosa* e *S. cerevisiae* em co-fermentação com o extrato enzimático E6 (condição estudada no item 3.3.2)

A fermentação submersa foi conduzida por 48 horas em reator cônico sob mesa agitada a 120 rpm, 30 g/L de *S. cerevisiae*, 25 g de água com células de *C. glabrosa* (10^6 células/g), 100 mL de EEB e suplementação com nutrientes nas concentrações descritas no item 3.3.1.2.

O EEB (E6) foi obtido da extração de duas FES (Figura 3.4, item b) de bagaço de cana tratado com explosão de vapor (40%), farelo de arroz (60%), durante 72 h, ou seja, cada reator contendo 40 g de meio sólido e 40 g de água com células de *A. niger* centrifugadas. O meio extrativo utilizado foi inóculo de *Candida glabrosa* na ausência das células, realizado com meio de cultura descrito anteriormente na Tabela 3.3, durante 48 h.

3.3.4. Avaliação da produção de biossurfactante em FES utilizando *A. niger*

Com os estudos anteriores (itens 3.3.2 e 3.3.3), verificou-se que no EEB havia biossurfactante produzido durante a FES. Por isso, investigou-se esta produção com o uso de *A. niger* em FES. Para este estudo, foram realizadas quatro fermentações em estado sólido com os meios FES A, FES B, FES C e FES D de composição apresentada na Tabela 3.6. Cada uma das FES foi realizada em reatores cônicos estáticos de 500 mL de volume, a 30 °C, adição de 40 g de água destilada estéril com células de *A. niger* (10^6 células/g), nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. O meio extrativo utilizado foi água destilada estéril e o EEB obtido foi analisado para verificar a produção de biossurfactante.

Tabela 3.6 – Meios da FES.

Meio	Características
FES A	40% de bagaço de cana explodido, 60% de farelo de arroz
FES B	40% de farelo de trigo, 60% de farelo de arroz
FES C	40% de casca de arroz tratada*, 60% de farelo de arroz
FES D	40% de casca de arroz <i>in natura</i> , 60% de farelo de arroz

*Casca de arroz tratada com H₂SO₄ 2%

Após, análise dos melhores meios de FES para produção de biossurfactante, os meios FES A e FES B foram escolhidos para serem usados para produção de etanol em FS com bagaço de cana explodido e *S. cerevisiae*.

3.3.5. Produção de etanol e biossurfactante com casca de arroz tratada

Neste estudo foram realizados testes para avaliar a produção de etanol e biossurfactante, utilizando casca de arroz tratada com H₂SO₄ 2% na fermentação submersa (Tabela 3.7). A primeira etapa teve como objetivo a produção de EEB, obtido de FES A de 72 h, contendo 40 g de meio sólido (40% de bagaço de cana explodido e 60% de farelo de arroz) e 40 g de água com células de *A. niger* (10⁶ células/g) centrifugadas. O meio extrativo utilizado foi água destilada estéril.

A FS foi conduzida com 100 mL de EEB, 30 g/L de *S. cerevisiae*, 25 g de água destilada estéril com células de *C. glabrosa* (10⁶ células/g) centrifugadas e casca de arroz tratada. Cada fermentação submersa foi realizada com ajuste de pH, tempo e quantidade de casca de arroz descritos na Tabela 3.6, e suplementada com nutrientes nas concentrações descritas no item 3.3.1.2.

Tabela 3.7 – Descrição das condições dos ensaios com variação do pH, tempo e quantidade de casca de arroz para as fermentações submersas.

Ensaio	pH	Tempo (dias)	g Casca/100 mL EEB
1	3	2	5
2	3	4	5
3	3	6	5
4	5	2	5
5	5	4	5
6	5	6	5
7	7	2	5
8	7	4	5
9	7	6	5
10	3	2	10
11	3	4	10
12	3	6	10
13	5	2	10
14	5	4	10
15	5	6	10
16	7	2	10
17	7	4	10
18	7	6	10
19	3	2	15
20	3	4	15
21	3	6	15
22	5	2	15
23	5	4	15
24	5	6	15
25	7	2	15
26	7	4	15
27	7	6	15

3.3.6 Produção de etanol e biossurfactante com diferentes biomassas tratadas

Nesta etapa do trabalho foram avaliadas diferentes biomassas tratadas com H_2SO_4 2% (bagaço de cana, sabugo de milho triturado, sorgo biomassa, casca de arroz) e bagaço de cana tratado com explosão a vapor. Estas biomassas foram utilizadas em fermentações submersas para produção de etanol e biossurfactante de forma simultânea.

Para a produção de etanol e biossurfactante, foram realizadas fermentações em estado sólido com os meios FES A e FES B de composição apresentada na Tabela 3.6, apresentada no item anterior, para obtenção do EEB. Cada uma das FES foi realizada em reatores cônicos estáticos de 500 mL de volume, a 30 °C, adição de 40 g de água destilada estéril com células de *A. niger* (10^6 esporos/g), nos tempos de 72 e 96 horas. O meio extrativo utilizado foi água destilada estéril e o EEB obtido foi utilizado nas fermentações submersas.

As FS foram conduzidas em reatores cônicos de 250 mL de volume contendo 100 mL de EEB, 250 g/L de biomassa tratada, 30 g/L de *S. cerevisiae*, 25 g de água destilada estéril com células de *C. glabrata* (10^6 células/g) centrifugadas e nutrientes (composição descrita no item 3.3.1.2), como ilustra a Figura 3.5. Além disso, as FS foram realizadas em mesa agitadora a 120 rpm e 30°C durante 48 horas.



Figura 3.5 – Reatores cônicos utilizados para fermentação submersa com bagaço de cana explodido e biomassas tratadas com H_2SO_4 2% – bagaço de cana, casca de arroz, sorgo biomassa e sabugo de milho triturado, respectivamente.

3.3.7. Avaliação da produção de biossurfactante a partir de ácido levulínico

Estudou-se a produção de biossurfactante a partir de ácido levulínico (AL), que é uma substância derivada de biomassa celulósica, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*. Um teste preliminar foi realizado com duas fermentações líquidas: uma com meio composto por 15 g/L de glicose, minerais e 0,3 g/L de *P. aeruginosa*, e outra composta por 15 g/L de AL, minerais e 0,3 g/L de *P. aeruginosa*. O objetivo deste teste preliminar foi verificar a possibilidade de produção de biossurfactante a partir de AL como fonte de carbono e comparar os resultados obtidos para cada fermentação.

As duas fermentações líquidas foram conduzidas em reator cônico de 250 mL de volume, contendo, em ambas, 100 mL de meio mineral constituído por 0,1 % KH_2PO_4 ; 0,1 % K_2HPO_4 ; 0,02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,002% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,005 % $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,2 % NaNO_3 (SILVA et al., 2010), em mesa agitadora a 120 rpm e 30 °C, durante 72 horas.

Na sequência aos testes preliminares, utilizou-se métodos estatísticos para otimizar os resultados. Entre os métodos estatísticos, escolheu-se o Delineamento Composto Central (DCC), que é um projeto amplamente utilizado, praticável e eficiente para estudar os efeitos de interação dos componentes do meio em fermentações microbianas. A partir dos estudos preliminares, verificou-se que a concentração do AL (fonte de carbono), o pH, a concentração de NaNO_3 (fonte de nitrogênio) e o inóculo de *P. aeruginosa* são fatores significativos e que influenciam a produção de biossurfactante. Assim, estas quatro variáveis foram escolhidas para a otimização (ANTHONY et al., 2016).

Um Delineamento Composto Central (DCC), contendo 26 experimentos sendo 16 pontos fatoriais (experimentos 1 a 16), 8 pontos rotacionais (experimentos 17 a 24) e 2 pontos centrais (experimentos 25 e 26), foi conduzido para otimizar as variáveis selecionadas para produção máxima de raminolipídeo. Os valores centrais fixos para a produção de raminolipídeo foram 0,6 g/L de *P. aeruginosa*, 20 g/L de AL, 2 g/L de NaNO_3 e pH 6,0. A Tabela 3.8 mostra o plano experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a concentração de raminolipídeo foi modelada pelo uso de redes neurais, utilizando o software AMORE da linguagem R. O modelo de rede neural obtido foi utilizado para avaliar as condições ótimas por otimização heurística, utilizando o software ABCoptim da linguagem R (ANTHONY et al., 2016).

Tabela 3.8 – Delineamento Composto Central.

Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
	<i>P. aeruginosa</i>	AL	NaNO ₃	pH
1	-1 (0,4 g/L)	-1 (15 g/L)	-1 (1,25 g/L)	-1 (4,5)
2	-1 (0,4 g/L)	-1 (15 g/L)	-1 (1,25 g/L)	1 (7,5)
3	-1 (0,4 g/L)	-1 (15 g/L)	1 (2,75 g/L)	-1 (4,5)
4	-1 (0,4 g/L)	-1 (15 g/L)	1 (2,75 g/L)	1 (7,5)
5	-1 (0,4 g/L)	1 (25 g/L)	-1 (1,25 g/L)	-1 (4,5)
6	-1 (0,4 g/L)	1 (25 g/L)	-1 (1,25 g/L)	1 (7,5)
7	-1 (0,4 g/L)	1 (25 g/L)	1 (2,75 g/L)	-1 (4,5)
8	-1 (0,4 g/L)	1 (25 g/L)	1 (2,75 g/L)	1 (7,5)
9	1 (0,8 g/L)	-1 (15 g/L)	-1 (1,25 g/L)	-1 (4,5)
10	1 (0,8 g/L)	-1 (15 g/L)	-1 (1,25 g/L)	1 (7,5)
11	1 (0,8 g/L)	-1 (15 g/L)	1 (2,75 g/L)	-1 (4,5)
12	1 (0,8 g/L)	-1 (15 g/L)	1 (2,75 g/L)	1 (7,5)
13	1 (0,8 g/L)	1 (25 g/L)	-1 (1,25 g/L)	-1 (4,5)
14	1 (0,8 g/L)	1 (25 g/L)	-1 (1,25 g/L)	1 (7,5)
15	1 (0,8 g/L)	1 (25 g/L)	1 (2,75 g/L)	-1 (4,5)
16	1 (0,8 g/L)	1 (25 g/L)	1 (2,75 g/L)	1 (7,5)
17	-2 (0,2 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)
18	+2 (1,0 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)
19	0 (0,6 g/L)	-2 (10 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)
20	0 (0,6 g/L)	2 (30 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)
21	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	-2 (0,5 g/L)	0 (6,0)
22	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	2 (3,5 g/L)	0 (6,0)
23	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	-2 (3,0)
24	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	2 (9,0)
25	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)
26	0 (0,6 g/L)	0 (20 g/L)	0 (2 g/L)	0 (6,0)

3.3.8. Avaliação da hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica para produção de etanol

Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de etanol sem a presença de microrganismos produtores de biossurfactante na fermentação submersa, visando aumentar a produção de etanol. Avaliou-se a produção de E2G com hidrólise enzimática e fermentação alcoólica realizadas separadamente (SHF). O EEB foi produzido por FES A realizada durante 72 horas a 30 °C, em reator cônico estático de 500 mL de volume, contendo 40 g de meio sólido (40 % de bagaço de cana tratado com explosão a vapor e 60 % de farelo de arroz) e 40 g de água destilada estéril contendo células de *A. niger* (10^6 células/g). O meio extrativo utilizado foi de 100 mL de solução de Tween 80 a 1%, que é um método tradicional para extração de enzimas. Após a fermentação, o meio foi filtrado e o EEB gerado foi utilizado nas fermentações submersas seguintes.

As hidrólises enzimáticas foram realizadas em mesa agitadora com rotação de 120 rpm, com 250 g/L de bagaço de cana explodido em reator cônico de 250 mL de volume, contendo 100 mL de EEB. O primeiro estudo realizado foi com hidrólise enzimática a 30 °C em pHs de 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5, durante 6 horas de hidrólise. Os pH foram ajustados com solução de NaOH 1M e HCl 1M. Após este tempo, o meio foi suplementado com nutrientes (composição descrita no item 3.3.1.2), a levedura *S. cerevisiae* (30 g/L) foi adicionada ao meio e a fermentação alcoólica foi realizada durante 48 horas. Após definição do pH, testou-se diferentes tempos de hidrólise: 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas. Neste estudo, a hidrólise enzimática também foi realizada a 30 °C e em pH definido no experimento anterior. Na última etapa desse estudo, avaliou-se diferentes temperaturas de hidrólise enzimática: 30, 40 e 50°C.

3.3.9. Estudo da concentração do extrato enzimático bruto para produção de etanol

Neste estudo, avaliou-se o uso de extratos enzimáticos brutos concentrados de *A. niger*, produzidos por FES, para produção de etanol. Os EEB foram concentrados por evaporação a vácuo, utilizando um Rotaevaporador modelo RV 10 IKA, com vácuo de 500 mmHg, rotação de 160 rpm e temperaturas de 50 e 60 °C. Em cada uma das temperaturas foi testada a redução de volume de 25 e 50%. Com este EEB concentrado, foi realizada a hidrólise enzimática nas melhores condições estudadas no teste anterior (item 3.3.8) e, posteriormente, realizada a produção de etanol.

3.3.10. Avaliação do efeito da composição do meio da fermentação em estado sólido na produção de etanol

Avaliou-se extratos enzimáticos brutos (EEB) de três diferentes meios de fermentação em estado sólido (FES) e suas combinações para produção de etanol. Na etapa de produção dos EEB, foram efetuadas FES durante 72 h em reatores cônicos estáticos de 500 mL de volume, contendo 40 g de meio sólido de diferentes composições, conforme apresentado na Tabela 3.9, e 40 g de água destilada estéril contendo células de *A. niger* (10^6 células/g).

Tabela 3.9 – Composição dos meios sólidos na FES.

Meio	Composição
FES 1	40% de bagaço de cana explodido e 60% de farelo de arroz
FES 2	40% de sabugo de milho e 60% de farelo de arroz
FES 3	40% de bagaço de cana explodido e 60% de farelo de arroz (em tampão fosfato – pH = 6,0)

Além disso, investigou-se o efeito da quantidade de enzima disponível no EEB e da combinação das propriedades dos extratos enzimáticos provenientes dos meios FES 1, FES 2 e FES 3, descritos anteriormente, pela extração de enzima a partir de meios sólidos, como mostrado na Figura 3.6, e nas combinações especificadas na Tabela 3.10 com volume final do EEB de 100 mL.

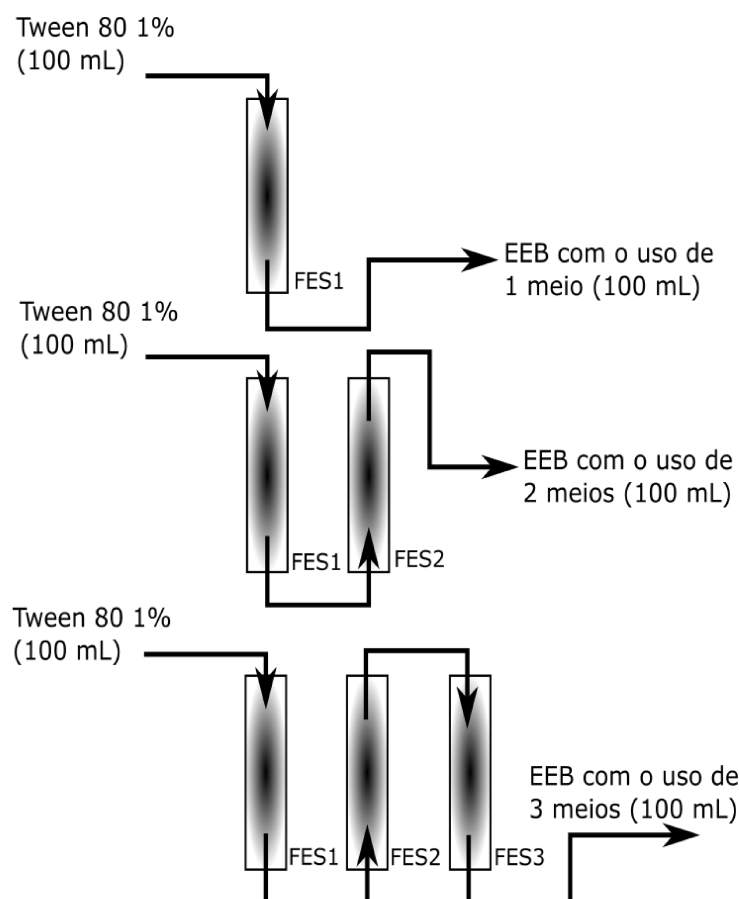


Figura 3.6 – Método de extração de enzima utilizando as combinações de meios sólidos.

Tabela 3.10 – Extratos enzimáticos obtidos das combinações das FES.

Extratos	Quantidade de meio	FES utilizadas
	(g)	
M1	40	FES1
M2	40	FES2
M3	40	FES3
M4	80	FES1 e FES2
M5	80	FES1 e FES3
M6	80	FES1 e FES1
M7	120	FES1, FES2 e FES3

A produção de etanol foi avaliada após os tempos de 24 e 48 horas de fermentação de bagaço de cana explodido na concentração de 250 g/L, com EEB obtido dos meios FES 1, FES 2 e FES 3 através de extração com 100 mL de Tween 80 1%.

3.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Os métodos utilizados para análise das amostras, obtidas nos experimentos realizados neste trabalho, estão descritos nos itens 3.4.1 a 3.4.7

3.4.1. Concentração de açúcares e etanol

As concentrações de etanol e açúcares foram determinadas por cromatografia líquida em HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) a partir de suas respectivas curvas de calibração. As amostras foram diluídas para 15,0 mL em ácido fosfórico a 0,1%, filtradas e injetadas no sistema cromatográfico de marca Shimadzu, modelo LC-20A Prominence, coluna SUPELCOGEL C610H, na qual os componentes são separados e detectados por refração de luz. A fase móvel utilizada foi solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1%, vazão do eluente de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32 °C e volume de injeção de 20,0 µL

3.4.2. Tensão superficial

Para determinação da tensão superficial, utilizou-se 10,0 mL da amostra livre de células, que foi disposta em placa de Petri, para ser analisada em tensiômetro. O método utilizado foi o de anel de du Noüy (1925), com o tensiômetro de modelo K6, à temperatura ambiente e previamente calibrado com álcool etílico. O anel de platina-iridium de 2,0 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura foi imerso na amostra contida na placa de Petri e a leitura da tensão superficial foi realizada três vezes, com os resultados expressos como o valor médio dessas leituras.

3.4.3. Índice de emulsificação

O índice de emulsificação (IE) foi determinado segundo o método descrito por Cooper e Goldenberg (1987). Adicionou-se 6,0 mL de querosene e 4,0 mL da amostra centrifugada em um tubo de ensaio com tampa de rosca. Com o auxílio de um agitador de tubos Vortex (marca Phoenix, modelo AP56), a mistura foi agitada por 2 min e deixada em repouso por 24 horas. O índice de emulsificação foi calculado a partir da divisão da altura da parte emulsionada pela altura total, e a razão foi multiplicada por 100 para se obter o resultado em porcentagem, como demonstrado na Equação 3.1.

$$IE = \frac{\text{altura da camada emulsionada}}{\text{altura total da mistura}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.4. Concentração de biossurfactante

A concentração de biossurfactante foi obtida por método gravimétrico de extração, utilizando-se 2,0 mL de amostra livre de células e 2,0 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada com auxílio de um agitador de tubos Vortex por 2 min e, após agitação, foi retirado 1,0 mL do sobrenadante e armazenado em placas de Petri previamente pesadas, as quais foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 30 °C por 24 horas. A determinação da concentração de biossurfactante foi realizada pela diferença do peso inicial e o peso final da placa de petri, dividido pelo volume retirado do sobrenadante.

3.4.5. Concentração de raminose

A concentração de raminose foi determinada de acordo com o método descrito por Rahman et al. (2002), realizando-se uma curva de calibração, utilizando várias concentrações conhecidas de raminose (APÊNDICE A1). Para a realização da análise, adicionou-se em um tubo de ensaio com tampa de rosca 1,0 mL da amostra centrifugada e 4,5 mL de ácido sulfúrico 70%. A solução foi misturada e colocada em aquecimento a 100 °C por 10 minutos. Após o aquecimento, esperou-se o resfriamento da solução à temperatura ambiente e adicionou-se 0,1 mL de ácido tioglicólico 3%, preparado a fresco, deixando-a em repouso por 3 horas na ausência de luz. Posteriormente, fez-se a leitura da absorbância no comprimento de onda de 420 nm, utilizando espectrofotômetro da marca Genesys, modelo 10 UV.

3.4.6. Caracterização do bagaço após fermentação

O bagaço foi separado do meio de fermentação, utilizando-se uma peneira de 18 mesh. Posteriormente, ele foi seco em estufa a 40 °C durante 24 horas e armazenado em temperatura ambiente para posterior determinação do bagaço recuperado, espectroscopia de infravermelho, umidade e poder calorífico.

A recuperação do bagaço foi expressa como a quantidade de massa seca recuperada e foi calculada como mostra a Equação 3.2:

$$R(\%) = \frac{B}{B_i} \times 100 \quad (3.2)$$

onde B é a massa sólida de bagaço recuperado no final da fermentação submersa e B_i é a massa de bagaço adicionado no início da fermentação submersa.

A umidade foi avaliada por secagem do bagaço em estufa a 105 °C até se atingir um peso constante. O poder calorífico do bagaço recuperado, em base úmida, foi avaliado utilizando calorímetro de bomba de oxigênio (IKA WORKS, C-2000).

Os bagaços fermentados foram analisados por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), para obtenção de informações referente às características estruturais das moléculas e grupos funcionais presentes nas amostras.

Para a realização desta análise, amostras de 1,0 mg do material a ser analisado, previamente secos em dessecador, foram misturados a 250,0 mg de KBr e transformados em pastilhas por prensagem. Estas pastilhas foram submetidas a análise na região do infravermelho (400 – 4000 cm^{-1}) em um espectrômetro de infravermelho IRPRESTIGE21 – SHIMADZU na resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se o software Irsolution. Os dados foram processados utilizando linguagem R.

3.4.7 Concentração celular

A massa seca foi determinada pela centrifugação de 25,0 mL do meio fermentado por 20 minutos. Em seguida, as células precipitadas foram lavadas com água destilada, armazenadas em béqueres de 50,0 mL, previamente pesados, e levadas à estufa a 100 °C por 24 horas. A determinação da massa seca foi realizada pela diferença do peso inicial e o peso final do béquer, dividido pelo volume de amostra centrifugada.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho serão apresentados e discutidos neste capítulo. Inicialmente, serão apresentados os resultados referentes a produção simultânea de etanol e biossurfactante de *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa* em bagaço de cana explodido, utilizando extrato enzimático bruto de *A. niger* para hidrolisar a biomassa celulósica. Em seguida, apresentar-se-á resultados do teste preliminar para verificar a produção simultânea de etanol e biossurfactante com as leveduras *S. cerevisiae* e *Candida glabrata*; e, posteriormente, o estudo da produção em fermentação submersa com casca de arroz tratada com ácido diluído. Na sequência, serão especificados os resultados da produção de biossurfactante de *A. niger* em fermentação sólida (FES), utilizando diferentes substratos. Apresenta-se, também, o estudo do uso deste EEB na fermentação submersa de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* com diversos substratos pré-tratados. A produção de biossurfactante de *P. aeruginosa* também foi avaliada com o uso de ácido levulínico, composto derivado de celulose, por otimização em rede neural e métodos heurísticos. A produção de etanol foi investigada com a realização de hidrólises enzimáticas separadas da fermentação alcoólica; concentração do EEB com o uso de rotaevaporador e diferentes combinações de meio sólido para gerar EEB com maior capacidade de hidrolisar o bagaço de cana.

4.1. PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE ETANOL E BIOSSURFACTANTE COM *S. cerevisiae* E *P. aeruginosa*

Nesta etapa do trabalho, avaliou-se a produção conjunta de biossurfactante e de etanol pelo uso de diferentes extratos enzimáticos brutos gerados por fermentação em estado sólido de *Aspergillus niger*. As diferentes combinações de meio sólido, com as biomassas bagaço de cana tratado com explosão a vapor, sabugo de milho e farelo de arroz, foram utilizadas para produção dos extratos enzimáticos brutos.

Na Tabela 4.1 são apresentadas as concentrações de etanol, raminolipídeos e índice de emulsificação em co-fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* e *Pseudomonas aeruginosa*, para 24 e 48 horas de fermentação, com o uso dos extratos enzimáticos E1 a E3, e fermentação com o extrato enzimático E1 sem *Pseudomonas aeruginosa*. No que se refere a produção de etanol, pode ser observado que a presença de *P. aeruginosa* não reduziu a

concentração de etanol, como esperado no ensaio de controle sem a *P. aeruginosa*. A substituição de tween 80 pelo uso de biossurfactante de *P. aeruginosa*, produzido no inóculo, e a co-fermentação são vantagens em termos de redução de gasto com tween e pela ampliação da variedade de produtos sem reduzir a concentração de etanol. Outra observação referente a produção de etanol é que, apesar do fato das concentrações de etanol maiores que 40,0 g/L serem esperadas para se atingir uma produção de baixo custo (KANG et al., 2015), as concentrações de etanol encontradas nesse estudo (maior que 6,0 g/L) podem ser consideradas um resultado importante porque a co-produção de energia afeta a eficiência de todo o processo (DIAS et al., 2013).

Tabela 4.1 – Concentrações de etanol e raminolípídeo para fermentação com os extratos enzimáticos E1 a E3.

EEB	Etanol (g/L)		Raminolípídeo (g/L) ^b	
E1 ^a	5,5 (24h)	6,2 (48h)	0 (24h)	0 (48h)
E1	5,4 (24h)	6,3 (48h)	0 (24h)	4,5 (48h)
E2	5,2 (24h)	6,3 (48h)	5,7 (24h)	1,9 (48h)
E3	5,6 (24h)	6,2 (48h)	5,1 (24h)	1,7 (48h)

^a Ensaio de controle: fermentação sem *P. aeruginosa*.

^b Valores correspondentes ao aumento de raminolípídeos, considerando a concentração inicial de 4 g/L no EEB

Em relação a produção de raminolípídeo, pode ser observado que a co-fermentação produz, pelo menos, 1,7 g/L de raminolípídeo, e isto sugere que a utilização de bagaço em co-fermentação representa uma promissora fonte para produção de raminolípídeo. Ramírez et al. (2015) produziram raminolípídeo a partir de resíduo da produção de azeite de oliva e obtiveram 1,9 g/L. De Lima et al. (2007) estudaram a produção de raminolípídeo a partir de óleo de soja residual, utilizando *Pseudomonas aeruginosa*, e obtiveram 2,2 g/L de raminose. An e Nakhate (2015) estudaram a produção de raminolípídeo a partir de uma fonte de soja e obtiveram 3,6 g/L. Benincasa e Accorsini (2008) atingiram 7,3 g/L na produção de raminolípídeo, usando resíduos de óleo de girassol refinado como substrato.

Os espectros de infravermelho (FTIR) do bagaço fermentado com os extratos enzimáticos E3 a E9 e o bagaço de cana explodido sem fermentar (ESB) são mostrados nas Figuras 4.1 e 4.2. As bandas de absorbância a 896, 1430 e 1730 cm⁻¹ são atribuídas à presença de celulose I (mais passível de hidrólise), celulose II (hidrólise mais resistente), e os grupos acetil ligados a hemicelulose e lignina, respectivamente. Pode-se observar que as alterações

estruturais no bagaço foram diferentes dependendo do EEB utilizado nas fermentações (ZHANG, CAI e WANG, 2008; POORNEJAD, KARIMI e BEHZAD, 2013; NOORI e KARIMI, 2016).

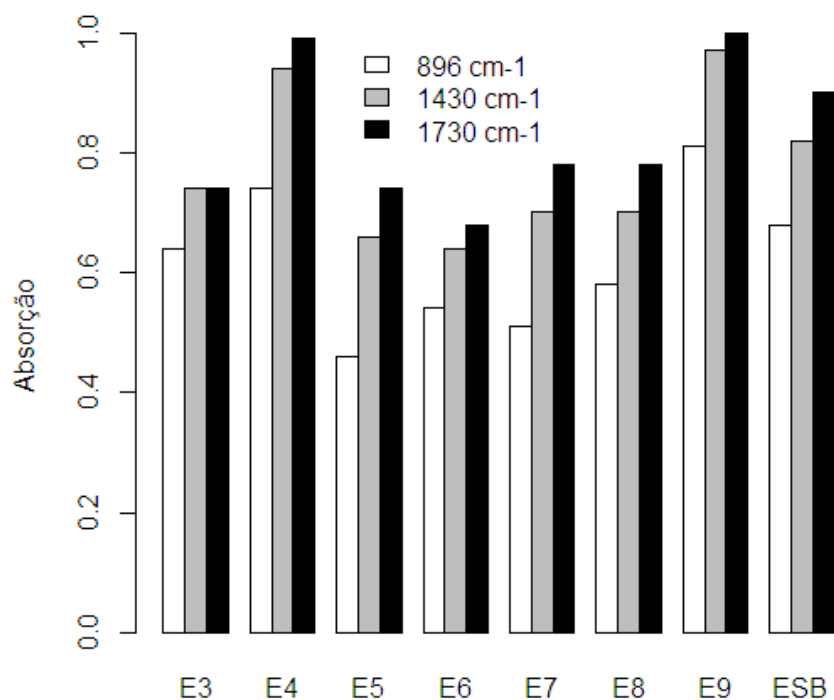


Figura 4.1 – Variações de banda nos espectros FTIR de bagaço de cana explodido fermentado.

A Tabela 4.2 mostra a produção de etanol e raminolípídeo, a quantidade de bagaço recuperado e a caracterização do bagaço recuperado após as fermentações utilizando os EEBs E4 a E12. Os resultados de bagaço sugerem que esta biomassa fermentada é uma fonte potencial de energia. O poder calorífico foi maior para o bagaço explodido fermentado do que o bagaço explodido sem fermentar. O bagaço de cana explodido usado tem um poder calorífico de 8,01 MJ/kg com uma umidade de 52,0% e de acordo com a literatura, o bagaço *in natura* tem um poder calorífico de 9,95 MJ/kg com uma umidade de 48% (RAMJEAWON, 2008). Os resultados sugerem que a recuperação da biomassa sólida pode fornecer pelo menos 6,95 GJ por tonelada métrica de bagaço fermentado (Teste 3). Outro fato observado é que a melhor condição para a produção de etanol (Teste 7) não é a melhor condição para a produção de raminolípídeo (Testes 1 e 2). Diante do interesse da produção conjunta de raminolípídeo e

etanol, as condições associadas aos Testes 4 e 5, que correspondem aos extratos enzimáticos E6 e E7 respectivamente, foram selecionadas para realização de futuras etapas deste estudo, pois nestas condições uma maior produção dos dois produtos foi observada, o que corresponde a concentrações de raminolipídeo e de etanol superiores, respectivamente, a 4,0 e 6,0 g/L.

Tabela 4.2 – Concentrações de etanol, raminolipídeo, recuperação do bagaço e poder calorífico.

Teste	EEB	Etanol (g/L)		Raminolipídeo (g/L) ^a		R(%w/w) ^b	Energia ^{b,c} (MJ/kg)	Umidade ^b (%)
1	E3	3,2 (24 h)	4,1 (48 h)	5,3 (24 h)	8,0 (48 h)	79,38	9,53	51,9
2	E4	2,6 (24 h)	3,1 (48 h)	7,2 (24 h)	4,5 (48 h)	82,62	9,61	52,9
3	E5	3,1 (24 h)	4,2 (48 h)	5,2 (24 h)	4,0 (48 h)	73,12	9,55	50,5
4	E6	4,2 (24 h)	6,1 (48 h)	5,1 (24 h)	5,6 (48 h)	83,10	8,78	51,7
5	E7	4,4 (24 h)	6,0 (48 h)	2,2 (24 h)	4,6 (48 h)	86,48	9,09	51,8
6	E8	4,0 (24 h)	5,4 (48 h)	0 (24 h)	1,0 (48 h)	85,28	9,10	52,3
7	E9	7,5 (24 h)	7,4 (48 h)	1,4 (24 h)	0,8 (48 h)	80,07	9,02	49,9

^aAumento na concentração de raminolipídeo (concentração inicial de 4 g/L).

^bBagaço fermentado recuperado

^cPoder calorífico inferior

Nas Figuras 4.2 e 4.3 são apresentadas as concentrações de etanol e raminolipídeos, respectivamente, gerados ao longo de 96 horas de fermentação para os extratos enzimáticos E6 e E7. Em relação à produção de etanol, os resultados mostram que as concentrações de etanol foram semelhantes para as fermentações com os extratos enzimáticos E6 e E7. Na produção de raminolipídeo conjunta com etanol, os resultados mostram que o ensaio E6 proporcionou os melhores resultados em 84 h de fermentação (8,4 g/L de etanol e 9,1 g/L de raminolipídeo). Borges et al. (2015) estudaram a produção de raminolipídeos utilizando biorreator de batelada com um volume de trabalho de 1,5 L, *Pseudomonas aeruginosa* e efluentes gordurosos do abate de aves e suínos como substrato, e obtiveram produção de raminose de 5,4 g/L. Izmirliloglu e Demirci (2016) avaliaram a produção de etanol, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* e resíduos de batata, e obtiveram 9,4 g/L de etanol em 120 horas de fermentação.

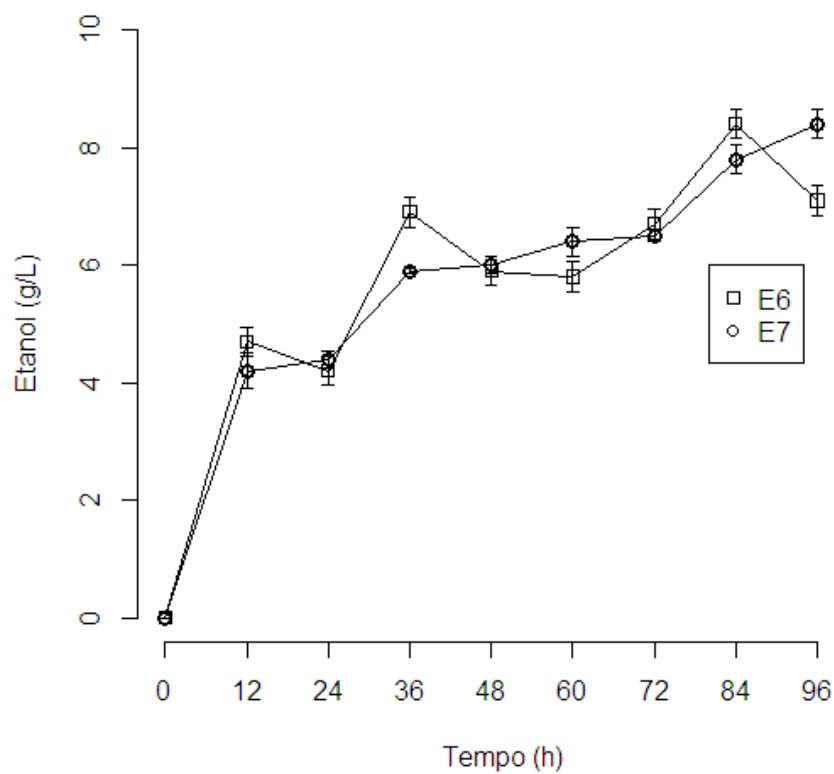


Figura 4.2 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para concentrações de etanol.

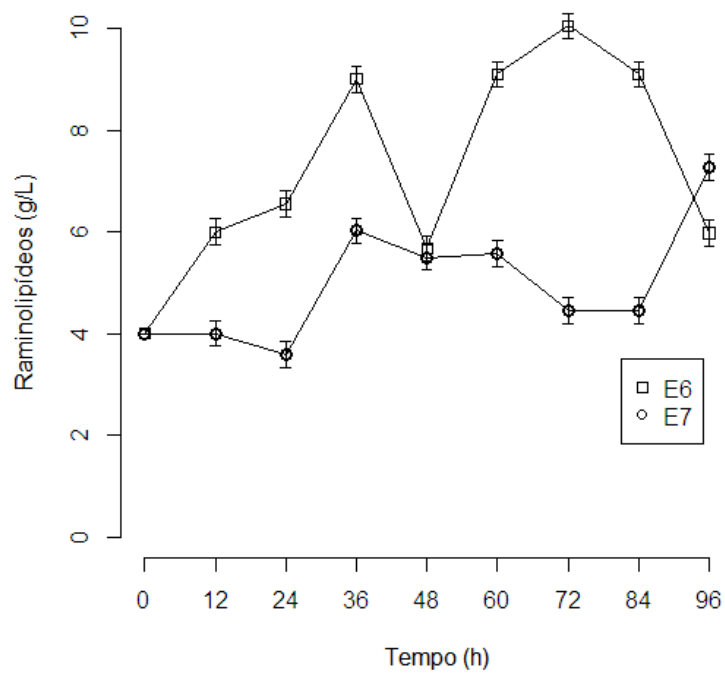


Figura 4.3 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para concentrações de raminolípídeo.

Os resultados para tensão superficial (TS) e índice de emulsificação (IE24%) são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente. Pode ser visto que a TS e IE24% variaram de 34 a 38 mN/m e 60 a 92,5%, respectivamente, ao longo do experimento, e isto sugere uma produção satisfatória de raminolípdeo. De acordo com a literatura, o IE24% maior que 60% representa uma satisfatória produção de raminolípdeo (GUDIÑA et al., 2015; SOUSA et al., 2011; WEI, CHOU e CHANG, 2005) e TS variando de 30 a 40 mN/m é esperado (GUDIÑA et al., 2015; RAMÍREZ et al., 2015; ZHANG, CAI e WANG, 2008; MOUSSA, MOHAMED e SAMAK, 2014; KITAMOTO et al., 2009).

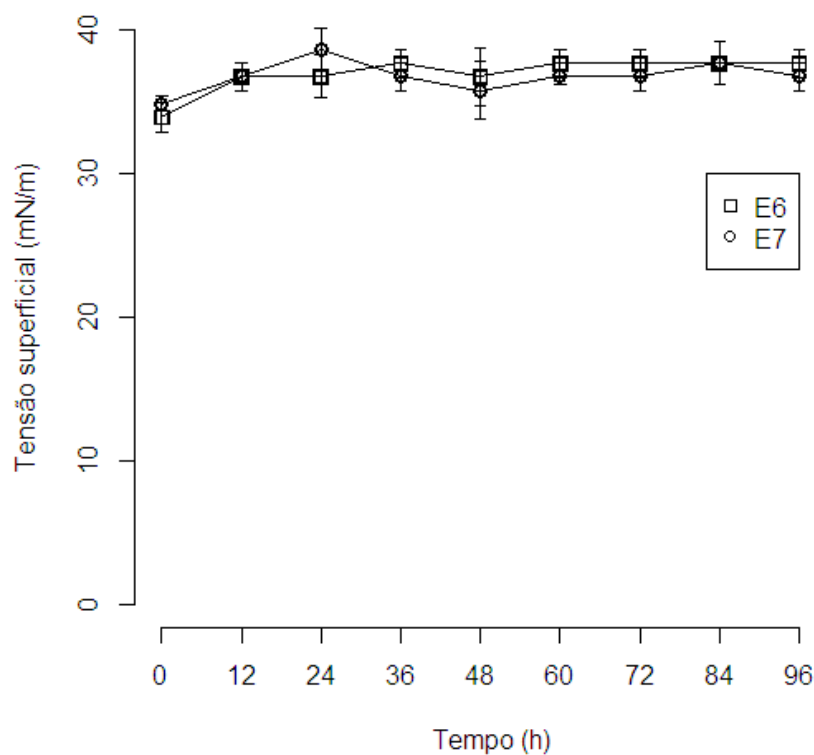


Figura 4.4 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para tensão superficial.

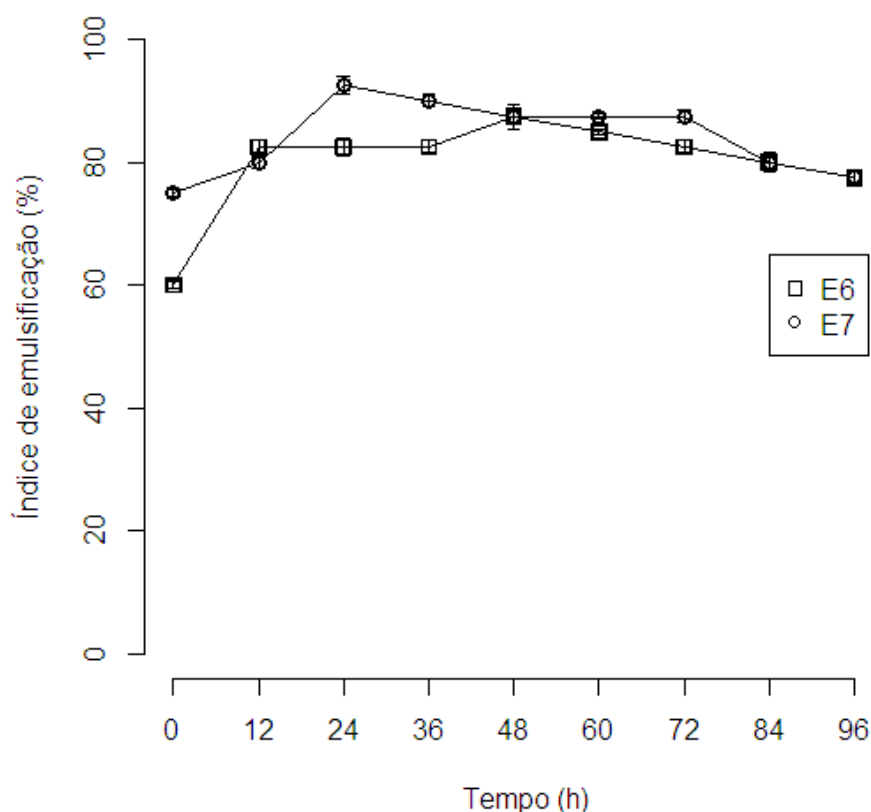


Figura 4.5 – Estudo comparativo do efeito dos extratos enzimáticos E6 e E7 na co-fermentação para índice de emulsificação.

Com isso, observa-se que o extrato enzimático E6, obtido através da extração dupla da FES de bagaço de cana e farelo de arroz, foi o que gerou maiores concentrações de etanol e biossurfactante simultaneamente.

4.2. PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSSURFACTANTE E ETANOL DE *C. glabosa* E *S. cerevisiae*

Visando avaliar a produção simultânea de biossurfactante e etanol com leveduras, foram realizadas fermentações com *Candida glabosa* e *Saccharomyces cerevisiae* na melhor condição de fermentação do estudo com *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*. O extrato enzimático E6, obtido da extração de duas FESs de bagaço de cana explodido e farelo de arroz, com meio extrativo de inóculo de *C. glabosa* centrifugado, foi utilizado nas fermentações submersas com bagaço de cana explodido, *C. glabosa* e *S. cerevisiae*. As condições operacionais foram descritas no item 3.3.3.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para as concentrações de etanol e biossurfactante e índice de emulsificação para os tempos de 24 e 48 horas de fermentação submersa. Para 24 horas de fermentação, obteve-se uma produção de 6,3 g/L de etanol e 6,4 g/L de biossurfactante; e para 48 horas de fermentação, 5,8 e 6,6 g/L de etanol e biossurfactante, respectivamente.

Tabela 4.3 – Concentrações de etanol e biossurfactante e IE para 48 horas de fermentação com *S. cerevisiae* e *C. glabrosa*.

Tempo de FS (h)	Etanol (g/L)	Biossurfactante (g/L)	IE (%)
24	6,3	6,4	86,7
48	5,8	6,6	90,3

Daverey e Pakshirajan (2009) estudaram a produção de soforolípido por *Candida bombicola* em óleo de soja, óleo de girassol, azeite e melaço de cana-de-açúcar. Para 48 horas de fermentação, obtiveram 5,0 g/L de biossurfactante, aproximadamente, em meio contendo azeite. Comparando os resultados obtidos neste estudo com os da literatura, pode-se verificar que a produção foi satisfatória e que é possível a produção conjunta utilizando as leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrosa* para produção de etanol e biossurfactante.

4.3. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE EM FES DE *A. niger*

A Figura 4.6 mostra as concentrações de biossurfactante obtidas para as fermentações sólidas de *A. niger* FES A, FES B, FES C e FES D, descritas no item 3.3.4. Observa-se que as fermentações FES A e FES B geraram maiores concentrações de biossurfactante para todos os tempos estudados. Para FES A, a maior produção foi de 7,7 g/L de biossurfactante em 72 horas de fermentação, constituída por bagaço de cana explodido e farelo de arroz. Para a FES B, a maior produção observada foi de 10,1 g/L de biossurfactante em 48 horas de fermentação com farelo de trigo e farelo de arroz.

Velioglu e Urek (2015) estudaram a produção de biossurfactantes por *Pleurotus djamor*, cultivadas em casca de sementes de girassol, resíduo de uva e cascas de batata como

substratos baratos e renováveis em fermentação em estado sólido. A maior produção de biossurfactante foi de 10,2 g/L em 13 dias de fermentação com substrato composto por óleo e casca de sementes de girassol.

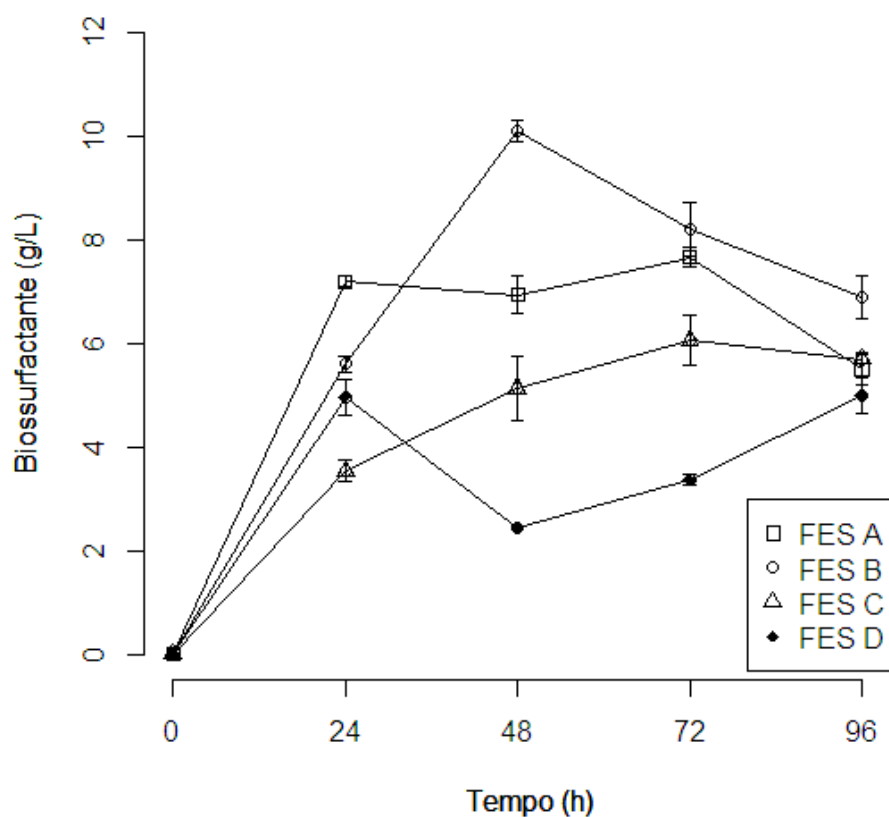


Figura 4.6 – Concentração de biossurfactante para as fermentações sólidas FES A, FES B, FES C e FES D.

A Figura 4.7 mostra os valores do índice de emulsificação utilizando querosene, que foi maior para o meio FES B, com máxima emulsificação para 24 h de fermentação (IE% = 100%).

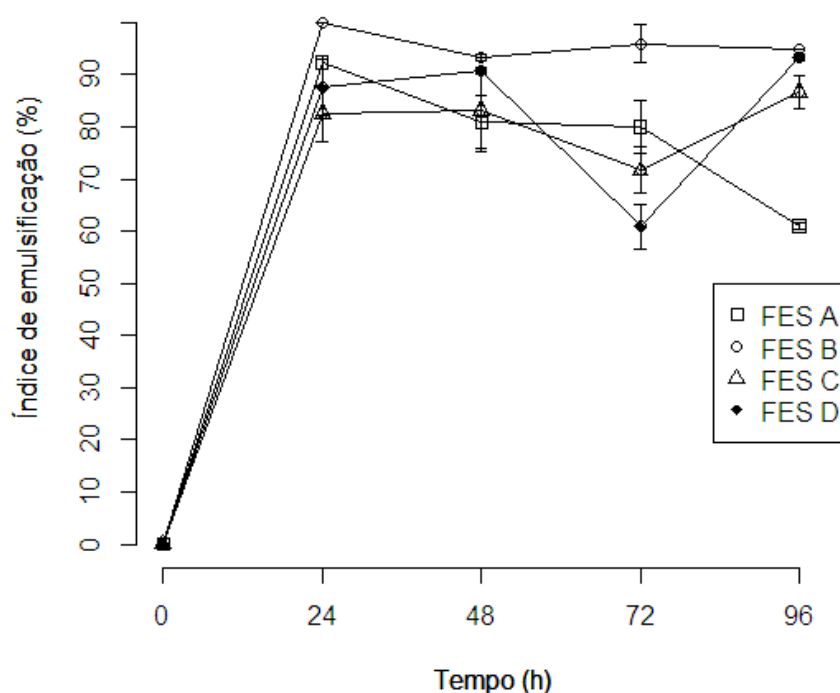


Figura 4.7 – Índice de emulsificação em querosene para as fermentações sólidas FES A, FES B, FES C e FES D.

Os resultados para tensão superficial são mostrados na Figura 4.8 para os quatro meios de fermentação sólida: FES A, FES B, FES C, FES D. Observa-se que o comportamento das amostras foi semelhante em todos os tempos de fermentação estudados. A tensão superficial para 24 h de fermentação foi de 39 a 45 mN/m, e após esse tempo a TS diminuiu para a faixa de 37 a 40 mN/m e se manteve estável até as 96 horas de fermentação.

Colla et al. (2010) avaliaram a produção por fermentação submersa e fermentação sólida de dois biocompostos com amplas aplicações industriais (lipases e biossurfactantes) em um único bioprocessos, utilizando *Aspergillus* sp. que foram isolados de um solo contaminado por óleo diesel. A fermentação sólida foi conduzida em substrato composto por farelo de soja e casca de arroz, com adição de azeite e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Foi verificado que a tensão superficial diminuiu de 50 para 28 mN/m em 4 dias de fermentação, indicando que os microrganismos foram capazes de produzir biossurfactante.

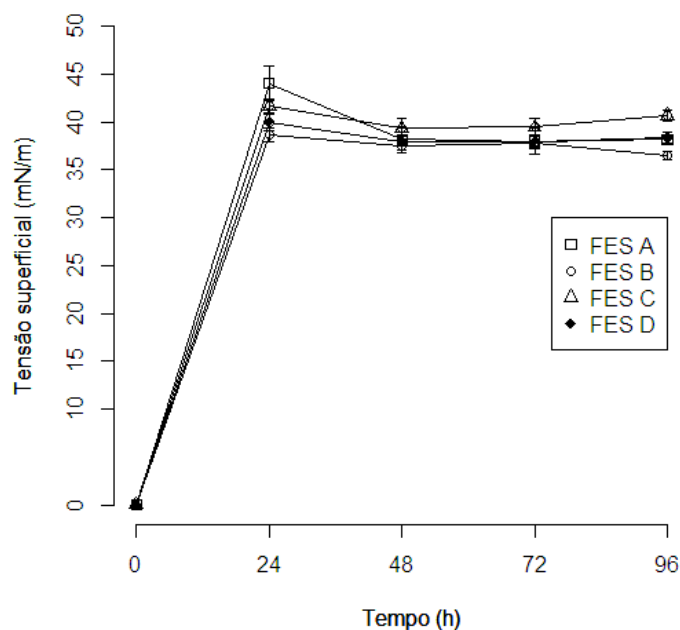


Figura 4.8 – Tensão superficial para as fermentações sólidas FES A, FES B, FES C e FES D.

Analizando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que o fungo *Aspergillus niger* é capaz de produzir biossurfactante em fermentação em estado sólido em quantidade e capacidade de emulsificação adequadas.

4.3.1. Avaliação da produção de biossurfactante em FES de *A. niger* e uso do extrato enzimático gerado para produção de etanol em bagaço de cana

No estudo da produção de biossurfactante de *A. niger* em FES, os meios sólidos que proporcionaram as maiores concentrações de biossurfactante foram FES A, constituída por 40% de bagaço de cana explodido e 60% de farelo de arroz, e FES B, constituída por 40% de farelo de trigo e 60% de farelo de arroz. Os extratos enzimáticos destes meios, obtidos nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas em fermentação sólida, foram utilizados para produção de etanol de *S. cerevisiae* em bagaço de cana explodido para 24 e 48 horas de fermentação alcoólica.

A Figura 4.9 apresenta as concentrações de etanol nos tempos de 24 e 48 horas, em fermentação de bagaço de cana explodido com EEB obtido da FES A. Para 24 horas de fermentação alcoólica, a maior concentração de etanol, 11,2 g/L, ocorreu para o EEB gerado em 96 horas. A maior produção de etanol para 48 horas de fermentação foi de 12,4 g/L de etanol com o EEB gerado em 72 horas.

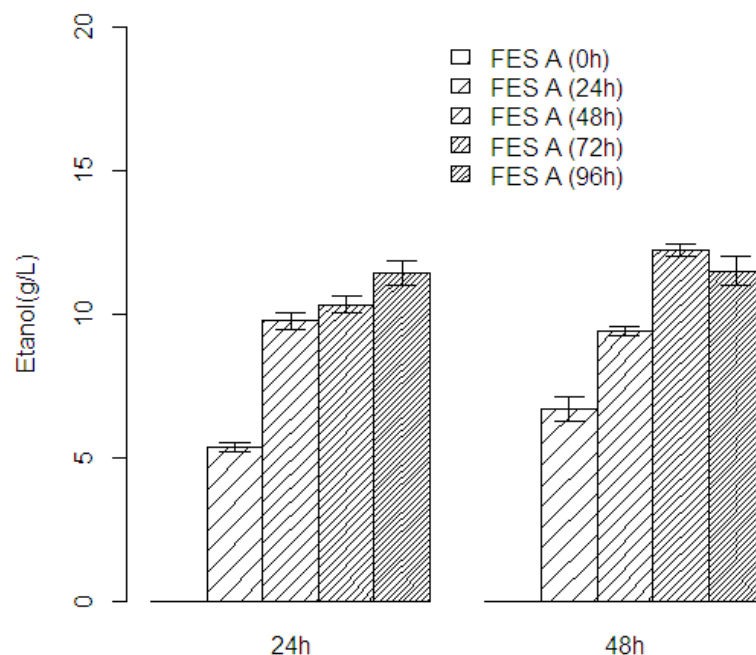


Figura 4.9 – Concentração de etanol para 24 e 48 horas de fermentação alcoólica utilizando os EEB obtidos em diferentes tempos de FES A, constituída por bagaço de cana explodido e farelo de arroz.

A Figura 4.10 apresenta as concentrações de etanol nos tempos de 24 e 48 horas, em fermentação de bagaço de cana explodido com EEB obtido da FES B. As maiores concentrações de etanol tanto para 24 horas quanto para 48 horas ocorreram com o uso de EEB produzido em FES de 72 horas, as quais foram de 13,3 e 14,3 g/L de etanol, respectivamente.

Lever, Ho e Cord-Ruwisch (2010) utilizaram extrato enzimático bruto, gerado a partir de fermentações em estado sólido, para realizar sacarificação e fermentação simultâneas de palha de trigo moída. Para fermentação alcoólica em batelada alimentada, obtiveram uma produção de etanol de, aproximadamente, 17 g/L em 48 horas. Cuevas et al. (2015) avaliaram a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas de caroço de azeitona tratado com ácido sulfúrico diluído e obtiveram, aproximadamente, 18 g/L de etanol em 48 horas de fermentação.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem uma satisfatória produção conjunta de etanol e biossurfactante de *Aspergillus niger*. Verificou-se que o EEB gerado na FES B produziu 1,2 vezes mais etanol em 48 horas de fermentação alcoólica de bagaço de cana explodido que o EEB gerado na FES A.

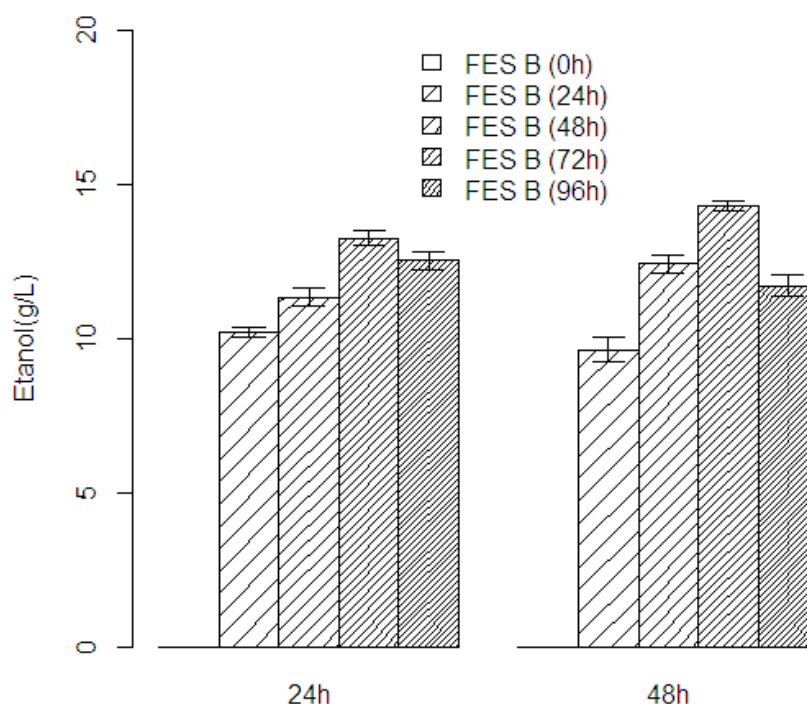


Figura 4.10 – Concentração de etanol para 24 e 48 horas de fermentação alcoólica utilizando os EEB obtidos em diferentes tempos de FES B, constituída por farelo de trigo e farelo de arroz.

4.4. PRODUÇÃO DE ETANOL E BIOSSURFACTANTE COM CASCA DE ARROZ TRATADA

Nesta etapa foi avaliada a produção de etanol e biossurfactante com as leveduras *S. cerevisiae* e *C. glabrata* em FS, utilizando casca de arroz, tratada com ácido sulfúrico diluído, e EEB obtido em FES de bagaço de cana explodido e farelo de arroz de *A. niger*. Optou-se por esse EEB pelo fato do bagaço de cana ser uma biomassa celulósica que se encontra prontamente disponível nas destilarias, possui elevado teor de carboidratos e pelo fato que o uso do bagaço representa a situação de integração de produção de etanol com diferentes produtos em uma biorrefinaria.

A Tabela 4.4 mostra os resultados para a produção de etanol e biossurfactante em termos de tensão superficial (TS), índice de emulsificação (IE24%) com querosene, concentração de biossurfactante e concentração de etanol.

Tabela 4.4 – Produção de etanol e biossurfactante com casca de arroz.

Ensaio	TS	IE24%	Concentração de biossurfactante total (g/L)	Concentração de biossurfactante* gerado na FS (g/L)	Etanol (g/L)
EEB	37,7	66,5	8,0	0	0
1	36,0	91,7	5,9	0	1,5
2	37,0	88,1	7,0	0	0
3	35,9	90,8	8,8	0,8	0
4	36,1	85,7	6,7	0	2,1
5	35,6	90,0	8,6	0,6	0
6	36,4	91,7	7,2	0	0
7	35,8	95,0	8,9	0,9	1,1
8	32,3	96,7	12,9	4,9	0
9	31,1	100,0	8,3	0,3	0
10	37,0	92,5	5,6	0	1,2
11	37,7	91,7	6,9	0	0
12	36,4	89,2	7,9	0	0
13	36,4	92,3	6,2	0	1,3
14	37,2	83,3	8,7	0,7	0
15	35,6	88,3	6,6	0	0
16	35,6	96,7	7,9	0	2,5
17	32,9	100,0	17,9	9,9	1,3
18	31,9	95,8	7,1	0	0
19	36,7	94,2	5,3	0	3,1
20	38,5	90,8	4,5	0	0
21	38,9	93,4	1,1	0	0
22	37,7	90,0	2,2	0	2,6
23	36,7	72,5	3,7	0	0,7
24	36,3	91,6	2,9	0	0
25	37,7	95,0	8,6	0,6	2,6
26	34,8	94,2	6,3	0	0
27	32,5	91,6	4,3	0	1,3

* os valores das concentrações de biossurfactante foram descontados do valor inicial de biossurfactante advindo do EEB.

A produção de etanol e biossurfactante de forma simultânea foi observada para os ensaios 7, 17 e 25, obtendo-se, para o ensaio 7, 0,9 g/L de biossurfactante e 1,1 g/L de etanol; para o ensaio 17, 9,9 g/L de biossurfactante e 1,3 g/L de etanol; e para o ensaio 25, 0,6 g/L de biossurfactante e 2,6 g/L de etanol. Entre estes ensaios, a maior redução da tensão superficial foi observada no ensaio 17, com redução de 37,7 para 32,9 mN/m, com emulsificação de 100% para este mesmo ensaio. A fermentação submersa do ensaio 17 foi conduzida em pH 7, durante 4 dias e quantidade de casca de arroz de 10 g/100 mL EEB.

Com relação a produção de etanol, Kim et al. (2012) estudaram o uso de pré-tratamento de palha de arroz com ácido sulfúrico diluído. Eles usaram *S. cerevisiae* K35, 100 g/L de palha de arroz tratada, enzima comercial e realizaram hidrólise e fermentação separadas (24 h), com obtenção de 1,8 g/L de etanol. Dagnino et al. (2013) também estudaram o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído de casca de arroz, e obtiveram 4,42 g/L de etanol de *S. cerevisiae* em 72 h de fermentação.

Em relação a produção de biossurfactante, Jain et al. (2013) testaram vários substratos, tais como bagaço de cana, palha de trigo, casca de arroz, casca de batata em pó, milho e soja em pó, para produção de biossurfactante de *Klebsiella sp.* (cepa RJ-03). A fermentação foi conduzida durante 72 horas e as concentrações de biossurfactante obtidas foram de 15,40 g/L para milho em pó; 9,60 g/L para casca de batata em pó; 6,20 g/L para bagaço de cana; 3,40 g/L para soja em pó; 1,03 g/L para palha de trigo e 0,94 g/L para casca de arroz.

Analisando os resultados obtidos neste estudo, observa-se que as concentrações de etanol e biossurfactantes estão coerentes com os resultados dos trabalhos de Kim et al. (2012), Dagnino et al. (2013) e Jain et al. (2013), citados anteriormente. É necessário, contudo, o estudo da produção de biossurfactante e etanol com outros substratos como fontes de carbono.

4.5. PRODUÇÃO DE ETANOL E BIOSSURFACTANTE COM DIFERENTES BIOMASSAS TRATADAS

Avaliou-se a produção de biossurfactante em FES de *A. niger* com as biomassas bagaço de cana explodido, farelo de arroz e farelo de trigo, e a produção de etanol e biossurfactante, simultaneamente, em co-fermentação utilizando as leveduras *S. cerevisiae* e

C. glabrosa com bagaço de cana explodido e com as biomassas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa, tratadas com H₂SO₄ diluído.

As Tabela 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 mostram os resultados obtidos para fermentação submersa realizada com as biomassas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa, para tensão superficial, índice de emulsificação com querosene, concentrações de biossurfactante e etanol em 24 e 48 horas de fermentação submersa.

Na Tabela 4.5, estão apresentados os resultados para fermentação submersa realizada com EEB, obtido de FES A, composta por bagaço de cana e farelo de arroz, realizada durante 72 horas e utilizando o fungo *A. niger*. O EEB produzido gerou 10,8 g/L de biossurfactante, tensão superficial (TS) de 34,7 mN/m e apresentou índice de emulsificação (IE24) de 90,8%. Os resultados apresentados são referentes a produção de biossurfactante na fermentação submersa, descontado o valor da concentração de biossurfactante advindo do EEB.

Tabela 4.5 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES A* de 72 horas.

	Fermentação submersa	TS (mN/m)	IE24 (%)	Biossurfactante** (g/L)	Etanol (g/L)
Bagaço explodido	24 h	33,2	51,7	6,0	6,6
	48 h	32,0	50,0	13,1	6,8
Bagaço tratado com H ₂ SO ₄	24 h	32,6	79,4	2,6	7,5
	48 h	32,4	56,6	13,4	6,9
Casca de arroz tratada com H ₂ SO ₄	24 h	34,9	90,8	4,0	4,1
	48 h	33,7	93,3	7,7	2,5
Sabugo de milho tratado com H ₂ SO ₄	24 h	35,6	57,5	4,0	8,8
	48 h	34,7	69,2	11,9	5,7
Sorgo biomassa tratado com H ₂ SO ₄	24 h	35,6	54,2	8,7	7,8
	48 h	34,7	71,6	9,9	7,0

* FES A composta por bagaço de cana explodido e farelo de arroz

** Concentração de biossurfactante descontado o valor do EEB

Em relação a produção de biossurfactante conjunta com etanol, os resultados mostram que os ensaios com as biomassas bagaço de cana explodido e bagaço de cana tratado com H₂SO₄ proporcionaram as maiores concentrações em 48 horas de fermentação. Para o bagaço de cana explodido, as concentrações de biossurfactante e etanol obtidas foram de 13,1 e 6,8 g/L, respectivamente; e para o bagaço de cana tratado com H₂SO₄, as concentrações obtidas foram de 13,4 g/L de biossurfactante e 6,9 g/L de etanol. A menor TS também foi observada para estes dois ensaios, nos quais a TS reduziu de 34,7 para 32,0 mN/m.

Na Tabela 4.6, estão apresentados os resultados para fermentação submersa realizada com EEB, obtido de FES A, composta por bagaço de cana e farelo de arroz, realizada durante 96 horas e utilizando o fungo *A. niger*. O EEB produzido gerou 9,9 g/L de biossurfactante, TS de 37,0 mN/m e apresentou IE24 de 88,3%.

Tabela 4.6 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES A* de 96 horas.

	Fermentação submersa	TS (mN/m)	IE24 (%)	Biossurfactante** (g/L)	Etanol (g/L)
Bagaço explodido	24 h	35,8	67,9	8,5	5,1
	48 h	37,0	50,8	6,2	5,1
Bagaço tratado com H ₂ SO ₄	24 h	36,4	50,0	3,9	5,3
	48 h	36,1	85,8	0,5	5,0
Casca de arroz tratada com H ₂ SO ₄	24 h	37,6	90,7	5,5	4,3
	48 h	38,6	63,3	9,1	3,4
Sabugo de milho tratado com H ₂ SO ₄	24 h	37,5	92,4	6,1	4,7
	48 h	38,7	94,2	0,4	4,1
Sorgo biomassa tratado com H ₂ SO ₄	24 h	39,2	83,0	2,3	6,6
	48 h	40,5	83,3	14,1	6,8

* FES A composta por bagaço de cana explodido e farelo de arroz

** Concentração de biossurfactante descontado o valor do EEB

No que se refere à produção de biossurfactante conjunta com etanol, os resultados mostram que o ensaio com sorgo biomassa proporcionou o melhor resultado em 48 horas de fermentação. As concentrações de etanol e biossurfactante foram de 6,8 e 14,1 g/L, respectivamente. Não houve redução da TS para este ensaio e o índice de emulsificação se manteve em 83%.

Na Tabela 4.7, estão apresentados os resultados para fermentação submersa realizada com EEB, obtido de FES B, composta por farelo de trigo e farelo de arroz, realizada durante 72 horas e utilizando o fungo *A. niger*. O EEB produzido gerou 13,4 g/L de biossurfactante, TS de 33,6 mN/m e apresentou IE24 de 95,0%.

Tabela 4.7 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES B* de 72 horas.

	Fermentação submersa	TS (mN/m)	IE24 (%)	Biossurfactante** (g/L)	Etanol (g/L)
Bagaço explodido	24 h	35,2	75,0	16,6	6,6
	48 h	35,9	82,5	7,0	8,0
Bagaço tratado com H ₂ SO ₄	24 h	34,3	85,3	6,3	6,6
	48 h	34,8	85,8	6,8	7,6
Casca de arroz tratada com H ₂ SO ₄	24 h	37,2	82,5	16,7	5,5
	48 h	36,1	96,6	23,6	6,5
Sabugo de milho tratado com H ₂ SO ₄	24 h	37,6	95,1	6,0	6,2
	48 h	36,1	94,2	14,0	7,4
Sorgo biomassa tratado com H ₂ SO ₄	24 h	38,6	77,5	8,6	8,0
	48 h	38,6	82,5	3,5	8,5

* FES B composta por farelo de trigo e farelo de arroz

** Concentração de biossurfactante descontado o valor do EEB

Em relação a produção de biossurfactante conjunta com etanol, os resultados mostram que os ensaios com as biomassas bagaço explodido, casca de arroz tratada com H₂SO₄ e sabugo de milho tratado com H₂SO₄ proporcionaram os melhores resultados. Para o bagaço explodido, a maior produção foi para 24 horas de FS (16,6 g/L de biossurfactante e 6,6 g/L de etanol); para casca de arroz os maiores valores de etanol e biossurfactante foram obtidos para 48 horas de FS com 23,6 g/L de biossurfactante e 6,5 g/L de etanol; e para sabugo de milho a maior produção observada foi para 48 h de FS e foram obtidos 14,0 g/L de biossurfactante e 7,4 g/L de etanol. Em nenhum dos ensaios foi observada redução da TS, e os IE24 se mantiveram acima de 70%.

Na Tabela 4.8, estão apresentados os resultados para fermentação submersa realizada com EEB, obtido de FES B, composta por farelo de trigo e farelo de arroz, realizada durante 96 horas e utilizando o fungo *A. niger*. O EEB produzido gerou 12,2 g/L de biossurfactante, TS de 33,9 mN/m e apresentou IE24 de 87,5%.

O ensaio com bagaço explodido proporcionou maior produção de etanol conjunta com biossurfactante para 48 horas de FS. Neste ensaio, as concentrações obtidas foram de 16,8 g/L de biossurfactante e 7,1 g/L de etanol, com IE24 maiores que 75%.

Tabela 4.8 – Produção de etanol e biossurfactante em fermentação submersa para diferentes biomassas com EEB de FES B* de 96 horas.

	Fermentação submersa	TS (mN/m)	IE24 (%)	Biossurfactante** (g/L)	Etanol (g/L)
Bagaço explodido	24 h	35,6	75,4	13,4	6,5
	48 h	35,9	93,3	16,8	7,1
Bagaço tratado com H ₂ SO ₄	24 h	33,3	62,1	4,8	6,2
	48 h	34,8	62,3	9,6	5,9
Casca de arroz tratada com H ₂ SO ₄	24 h	35,8	93,2	12,2	6,0
	48 h	36,7	95,0	14,6	6,0
Sabugo de milho tratado com H ₂ SO ₄	24 h	37,6	90,0	8,0	6,3
	48 h	36,7	94,9	6,3	6,1
Sorgo biomassa tratado com H ₂ SO ₄	24 h	38,6	84,8	6,4	10,0
	48 h	39,5	85,8	8,7	10,5

* FES B composta por farelo de trigo e farelo de arroz

** Concentração de biossurfactante descontado o valor do EEB

Izmirliloglu e Demirci (2016) avaliaram o meio de fermentação para sacarificação e fermentação simultâneas, utilizando co-cultura de *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* e resíduos de batata. Para o meio composto por 50 g/L de resíduo de batata, 20 g/L de extrato de malte, 0,1 g/L de FeSO₄·7H₂O e 3 g/L de CaCl₂·2H₂O, obtiveram uma produção de 9,4 g/L de etanol para 120 horas de fermentação.

Com base no exposto até o momento, tem-se que os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios, pois verificou-se a possibilidade de produção de etanol e biossurfactante de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* com as biomassas celulósicas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa, usando diferentes extratos enzimáticos brutos de *A. niger*, que também é capaz de produzir biossurfactante.

4.6. PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE A PARTIR DE ÁCIDO LEVULÍNICO

A Figura 4.11 apresenta os resultados preliminares do uso de ácido levulínico (AL) como fonte de carbono capaz de gerar biossurfactante. Pode-se observar que o crescimento de *P. aeruginosa* em AL foi 3,1 vezes menor que o observado em glicose. Foi observado também que a produção de raminose com AL gerou baixas concentrações de raminose, que variaram de 0,02 a 0,06 g/L.

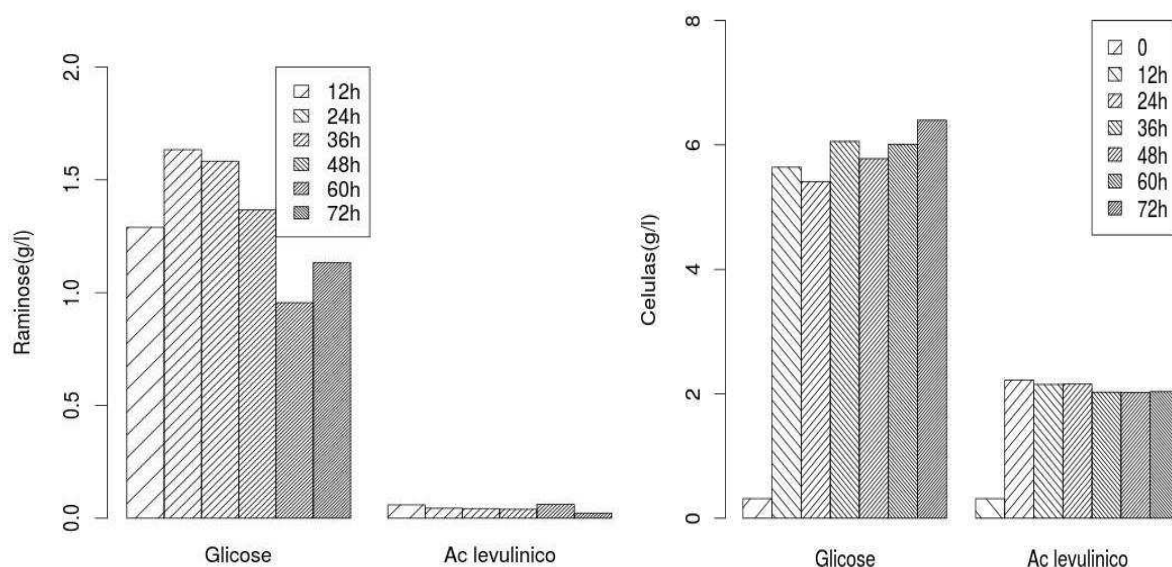


Figura 4.11 – Resultados do teste preliminar com glicose e ácido levulínico para crescimento celular e concentração de raminose.

Na Figura 4.12 são mostrados os resultados experimentais (y_{calc}) e teóricos (target) obtidos para rede neural que descreve a concentração de raminose em função da concentração de *P. aeruginosa*, concentração de AL, concentração de NaNO_3 e pH. Pode-se observar que a rede neural com 10 neurônios foi capaz de representar 87,1% dos resultados experimentais e, por isso, pode ser usada na otimização das condições de produção de raminose ($\text{TARGET} = 0,851440 \cdot y_{\text{calc}} + 0,015226$, $r^2 = 0,871$, $p < 0,0505$).

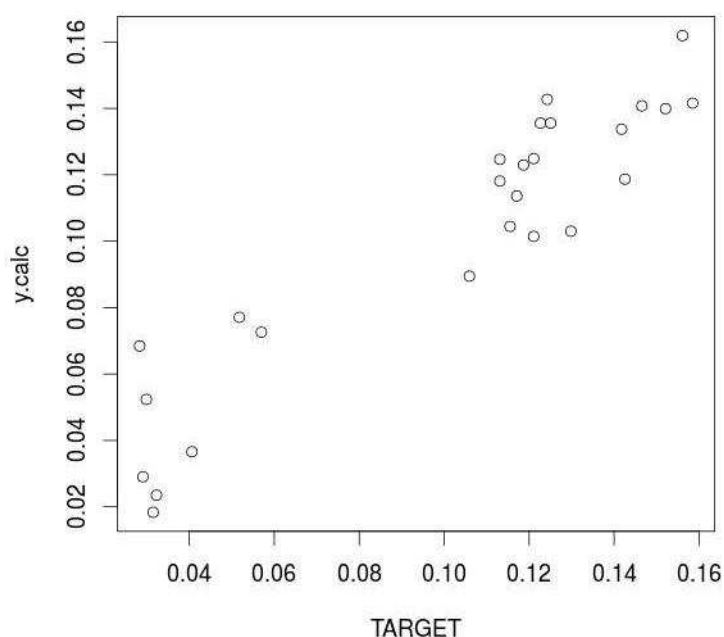


Figura 4.12 – Resultados da rede neural com 10 neurônios na camada oculta.

Na Tabela 4.9 são apresentados os resultados da otimização referentes a máxima concentração de raminose obtida. Pode-se observar que diferentes concentrações de *P. aeruginosa*, ácido levulínico, NaNO₃ e pH são capazes de otimizar a maior concentração de raminose sendo que se destacaram entre estas, respectivamente, 0,2 g/L, 18,1 g/L, 2,0 g/L e 3,0.

Tabela 4.9 – Resultados da otimização da produção de raminose.

<i>P. aeruginosa</i> (g/L)	AL (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	pH	Raminose (g/L) (valor teórico)
0,2	18,1	2,0	3,0	0,2

Gudiña et al. (2015) otimizaram a produção de biossurfactante de *P. aeruginosa*, utilizando substratos de baixo custo. A produção de biossurfactante mais elevada (3,2 g/L) foi obtida em meio de cultura contendo água de maceração de milho e melaço de cana. Comparando os resultados da literatura com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar que a *P. aeruginosa* teve dificuldade em consumir o ácido levulínico em raminose, e por isso é necessário ampliar os estudos e testar novas condições operacionais com o AL.

4.7. AVALIAÇÃO DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA SEPARADA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Na Tabela 4.10, são apresentadas as concentrações de glicose, xilose, arabinose e etanol após hidrólise de 6 horas a 30 °C nos pHs de 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5, e após 48 horas de fermentação alcoólica. Pode-se observar que as hidrólises que ocorreram nos pH 3,5, 4,0 e 4,5 favoreceram a produção de etanol, e a maior concentração para esta produção foi obtida em pH 4,0. Neste estudo, pode-se notar, também, que as concentrações das pentoses, xilose e arabinose, aumentaram durante a fermentação alcoólica em todos os pHs analisados, mostrando que a hidrólise do bagaço de cana continuou durante a fermentação.

Tabela 4.10 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise de 6 h a 30 °C em diferentes pH e após 48 h de fermentação alcoólica.

		Glicose	Xilose	Arabinose	Etanol
		g/L			
Hidrólise	EEB após H.	2,3	2,0	-	-
pH = 2,0	Após 48h FA	1,3	4,9	0,9	11,1
Hidrólise	EEB após H.	3,9	2,9	0,6	-
pH = 2,5	Após 48h FA	0,3	6,4	1,6	14,1
Hidrólise	EEB após H.	4,7	3,9	0,8	-
pH = 3,0	Após 48h FA	-	6,4	1,7	12,7
Hidrólise	EEB após H.	3,7	3,7	0,7	-
pH = 3,5	Após 48h FA	0,3	6,9	1,9	16,1
Hidrólise	EEB após H.	4,3	5,6	1,3	-
pH = 4,0	Após 48h FA	0,4	8,0	2,5	16,3
Hidrólise	EEB após H.	3,6	5,1	1,2	-
pH = 4,5	Após 48h FA	0,3	7,8	2,4	15,5

EEB após H.: representa os valores do extrato enzimático bruto após a hidrólise enzimática
 Após 48h FA: representa os valores após 48 h de fermentação alcoólica

Outro estudo foi realizado para avaliar a hidrólise enzimática nos tempos de 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, a 30 °C e em pH 4, que foi o pH que mais favoreceu a produção de etanol no estudo anterior. A Tabela 4.11 mostra as concentrações de glicose, xilose, arabinose e etanol após hidrólise e após 48 h de fermentação alcoólica. Obteve-se a maior concentração de etanol, 18,3 g/L, realizando uma hidrólise enzimática de 18 horas.

Tabela 4.11 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise em pH 4,0 a 30 °C em diferentes tempos e após 48 h de fermentação alcoólica.

		Glicose	Xilose	Arabinose	Etanol
		g/L			
Hidrólise	EEB após H.	0,1	4,3	1,3	-
6 horas	Após 48h FA	-	5,3	2,2	15,9
Hidrólise	EEB após H.	0,2	6,8	1,3	-
12 horas	Após 48h FA	0,1	5,2	1,6	15,6
Hidrólise	EEB após H.	0,1	5,5	1,0	-
18 horas	Após 48h FA	0,1	3,5	1,4	18,3
Hidrólise	EEB após H.	0,1	6,7	1,3	-
24 horas	Após 48h FA	0,1	3,7	2,0	17,7
Hidrólise	EEB após H.	0,1	4,2	1,3	-
36 horas	Após 48h FA	-	1,2	1,3	11,7
Hidrólise	EEB após H.	0,1	6,5	1,6	-
48 horas	Após 48h FA	-	3,1	1,4	17,1

EEB após H.: representa os valores do extrato enzimático bruto após a hidrólise enzimática
 Após 48h FA: representa os valores após 48 h de fermentação alcoólica

Os resultados da Tabela 4.12 são apresentados em termos de concentração de glicose, xilose, arabinose e etanol após hidrólise enzimática e após 48 horas de fermentação alcoólica.

As hidrólises enzimáticas foram conduzidas nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, em pH 4,0 e durante 18 horas. De acordo com a Tabela 4.12, os melhores resultados foram observados para hidrólise a 40 °C e foi obtida a concentração de etanol de 20,3 g/L para 48 horas de fermentação alcoólica.

Tabela 4.12 – Concentração dos açúcares e etanol após hidrólise de 18 h em pH 4,0 em diferentes temperaturas e após 48 horas de fermentação alcoólica.

		Glicose	Xilose	Arabinose	Etanol
		g/L			
Hidrólise	EEB após H.	0,1	5,5	1,0	-
a 30 °C	Após 48h FA	-	0,8	1,1	16,2
Hidrólise	EEB após H.	4,8	9,4	1,8	-
a 40 °C	Após 48h FA	0,1	0,3	1,0	20,3
Hidrólise	EEB após H.	13,4	6,7	-	-
a 50 °C	Após 48h FA	-	1,6	0,3	14,6

EEB após H.: representa os valores do extrato enzimático bruto após a hidrólise enzimática
 Após 48h FA: representa os valores após 48 h de fermentação alcoólica

Na Tabela 4.13, faz-se uma comparação dos resultados obtidos com a hidrólise e fermentação alcoólica simultâneas, e com a hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica, realizada nas melhores condições operacionais estudadas nos experimentos anteriores, ou seja, hidrólise de 18 horas, a 40 °C e em pH 4,0.

Tabela 4.13 – Comparação da hidrólise e fermentação alcoólica simultâneas com a hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.

		Glicose	Xilose	Arabinose	Etanol
		g/L			
Hidrólise e FA	EEB	0,2	-	-	-
simultâneas	Após 48h FA	0,5	1,5	1,9	9,9
Hidrólise: 18h,	EEB após H.	1,2	14,8	1,9	-
40°C, pH = 4,0	Após 48h FA	0,1	7,4	2,5	19,8

EEB após H.: representa os valores do extrato enzimático bruto após a hidrólise enzimática
 Após 48h FA: representa os valores após 48 h de fermentação alcoólica

Das et al. (2015) também estudaram a hidrólise enzimática de biomassa de aguapé, com enzimas comerciais, realizada durante 60 horas. As leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Saccharomyces cerevisiae* foram incubadas ao hidrolisado e a fermentação foi conduzida por 36 horas. As concentrações de etanol obtidas foram de 10,4 g/L usando *P. stipitis*; 8,2 e 6,7 g/L usando *C. shehatae* e *S. cerevisiae*, respectivamente. Rocha et al. (2013)

investigaram a produção de etanol a partir de fermentação e sacarificação simultâneas e hidrólise e fermentação separadas, utilizando complexos enzimáticos de *Aspergillus niger* e subprodutos de arroz, soro e bagaço de cana. O melhor resultado que os autores encontraram foi de 11,7 g/L de etanol para 12 h de sacarificação e fermentação simultâneas a pH 4,5 e 35°C, utilizando substrato composto por soro, casca e palha de arroz.

Comparando os resultados da Tabela 4.13, pode-se afirmar que a produção de etanol foi maior ao se realizar a hidrólise enzimática separadamente, na qual obteve-se uma concentração de 19,8 g/L de etanol. Este fato está relacionado ao maior controle das variáveis tempo, pH e temperatura quando se utilizada a hidrólise separada.

4.8. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO EEB

A Figura 4.13 mostra a concentração de glicose, xilose, arabinose e açúcares totais associados somente à hidrólise enzimática separada de 18 horas, com EEB e extratos enzimáticos concentrados (EC 25%, 50°C; EC 50%, 50°C; EC 25%, 60°C; EC 50%, 60°C). Os resultados mostram que a concentração de açúcares totais foi de 1,8 a 2,3 vezes maior nas situações com concentração do extrato enzimático que a observada na hidrólise pelo uso de extrato enzimático bruto (EEB), o que sugere uma maior capacidade de hidrólise nos extratos EC 25%, 50°C; EC 50%, 50°C; EC 25%, 60°C e EC 50%, 60°C.

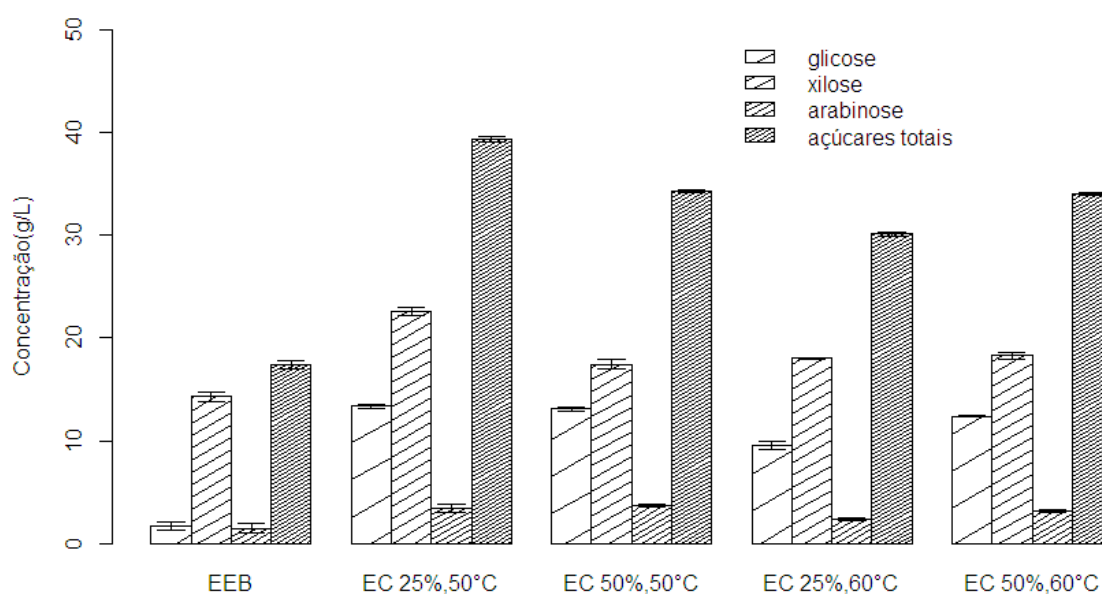


Figura 4.13 – Concentração dos açúcares presentes no extrato enzimático bruto após hidrólise enzimática separada de 18 horas a 40°C.

Também pode ser observado que a hidrólise com o uso de extratos enzimáticos concentrados à 50 °C (EC 25%, 50°C e EC 50%, 50°C) gerou maior teor de glicose que o observado pelo uso de extratos concentrados à 60 °C (EC 25%, 60°C e EC 50%, 60°C). Isso sugere que caso a inibição do crescimento celular e a produção de etanol sejam semelhantes nas diferentes condições estudadas, a concentração do extrato enzimático à 50 °C é mais favorável que à 60 °C, pois em menor temperatura há uma maior produção de glicose, que representa o açúcar fermentescível capaz de gerar etanol.

Na Figura 4.14, são apresentadas as concentrações de etanol para 48 horas de fermentação alcoólica a 35 °C, utilizando EEB sem concentrar e sem realizar hidrólise enzimática separada, e extratos enzimáticos concentrados em rotaevaporador a 50 e 60 °C, com redução de volume de 25 e 50 %, e realizando hidrólise de 18 horas a 40 °C e em pH 4,0.

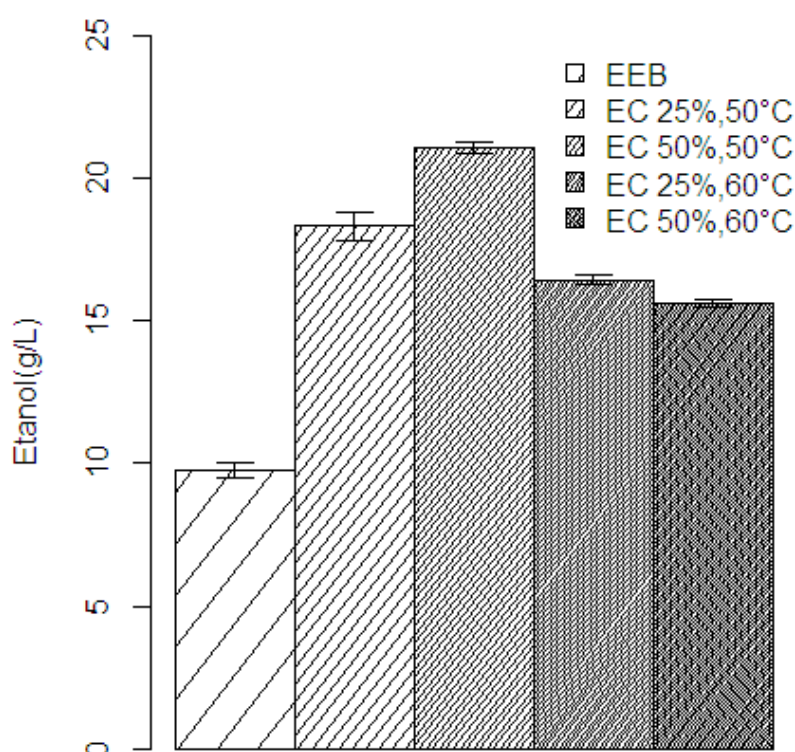


Figura 4.14 – Concentração de etanol para 48 horas de fermentação alcoólica utilizando EEB sem concentrar e os EEB concentrados.

A comparação entre os experimentos confirma que o extrato enzimático concentrado tem melhor ação na produção de etanol que o extrato enzimático não concentrado, e a concentração à 50 °C foi melhor que a realizada à 60 °C.

Ao analisar as situações de redução de volume de 25 % e 50 %, verifica-se que EC 50%, 50°C foi mais favorável ao processo, com produção de 21,0 g/L de etanol, correspondendo a um valor de 2,1 vezes superior ao observado com o uso de EEB sem concentrar e sem realizar a hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.

4.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO NA PRODUÇÃO DE ETANOL

Na Figura 4.15 são apresentados os valores das concentrações de etanol obtidos na fermentação com o uso de EEBs M1, M2 e M3, referentes às fermentações sólidas FES1, FES2 e FES3, respectivamente, descritas na Tabela 3.9 e 3.10.

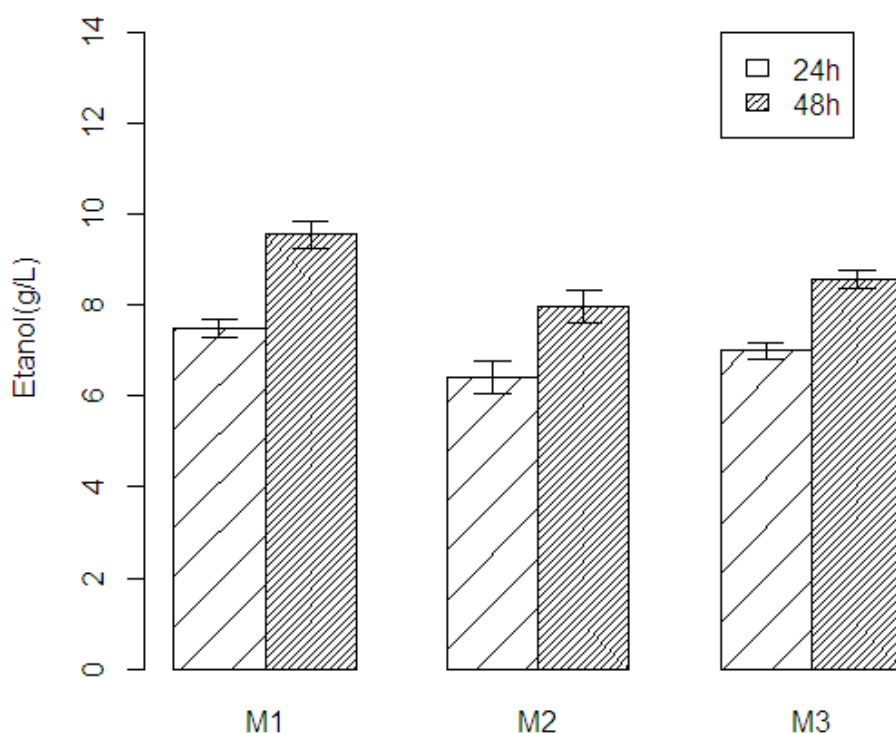


Figura 4.15 – Concentração de etanol empregando apenas um meio sólido.

Verifica-se que apesar do sabugo de milho ser rico em celulose e hemicelulose, a escolha deste substrato (M2) apresentou reduzida concentração de etanol, que foi de 6,4 g/L e 7,9 g/L em 24 e 48 h, respectivamente, na etapa de fermentação, em relação aos outros dois meios contendo bagaço de cana explodido. Ressalta-se que o enriquecimento dos substratos

para a indução das enzimas de interesse (celulases e hemicelulases) foi realizado nas mesmas proporções em todos os três meios.

Na condição de M1, obtido da FES1 com bagaço de cana explodido e farelo de arroz, observa-se a máxima concentração de etanol obtida entre os ensaios com o uso de meios individuais, resultado que mostra o bagaço de cana como substrato vantajoso ao Brasil, uma vez que sua disponibilidade é ampla. Além disso, o controle inicial de pH 6,0 na FES3 (extrato enzimático M3) não influenciou a produção de etanol de forma significativa.

Na Figura 4.16, são apresentadas as concentrações de etanol produzido nas combinações de extratos enzimáticos M4, M5, M6 e M7.

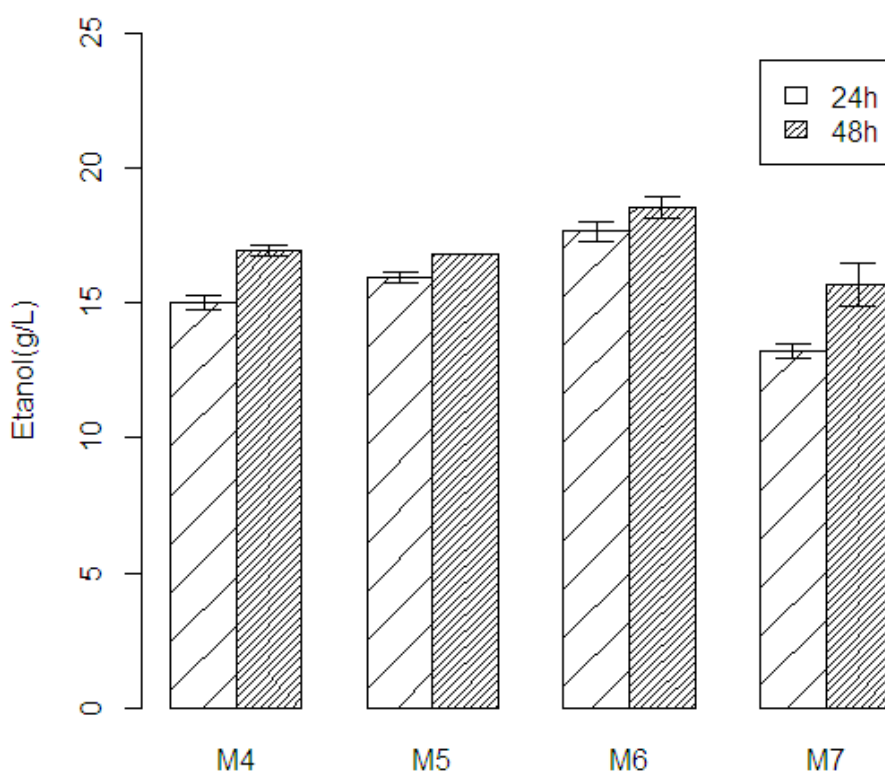


Figura 4.16 – Concentração de etanol empregando as diferentes combinações de meios sólidos.

Os resultados obtidos indicam que formas distintas de combinação de extratos enzimáticos de diferentes características influenciam no tempo e na concentração de etanol. A combinação dos meios sólidos de FES reduziu o tempo para a produção de determinado teor de etanol em razão da maior quantidade de enzimas presente no extrato enzimático utilizado na etapa de fermentação. O M6 foi o ensaio com EEB que ensejou as maiores concentrações de etanol: 17,6 g/L e 18,5 g/L nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente

O uso do extrato enzimático M7 apresentou redução de 25,0 % na produção de etanol comparado ao melhor ensaio com extrato enzimático proveniente de dois meios (M6) no tempo de 24 h. Portanto, o melhor resultado obtido foi o ensaio com M6 que atingiu a concentração de 18,5 g/L de etanol em 48 h de fermentação.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que a co-produção de etanol e biossurfactante com o uso de diferentes biomassas lignocelulósicas é uma estratégia promissora em biorrefinarias. Além disso, pode-se concluir que:

- A co-fermentação de *Pseudomonas aeruginosa* e *Saccharomyces cerevisiae* pode ser realizada com produção de 9,1 g/L de raminolípido e 8,4 g/L de etanol e recuperação do bagaço para produção de energia. Consequentemente, a produção simultânea de etanol, raminolípido e energia do bagaço de cana-de-açúcar pode ser considerada uma nova estratégia na busca de produção sustentável de biossurfactantes e biocombustíveis.
- A produção simultânea de etanol e biossurfactante utilizando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida glabrata*, realizada com extrato enzimático bruto de *A. niger* e bagaço de cana explodido, mostrou-se satisfatória com concentrações de 6 g/L de etanol e 6,5 g/L de biossurfactante, aproximadamente, para 48 horas de fermentação.
- Na produção de biossurfactante em fermentação em estado sólido, utilizando o fungo *A. niger*, observou-se que este microrganismo tem a capacidade de gerar 7,6 g/L de biossurfactante em 72 horas de fermentação com bagaço de cana explodido e farelo de arroz; e 10,1 g/L de biossurfactante em 48 horas de fermentação com farelo de trigo e farelo de arroz, além de gerar índices de emulsificação acima de 60%.
- Verificou-se a possibilidade de produção de etanol e biossurfactante de *S. cerevisiae* e *C. glabrata* com as biomassas celulósicas bagaço de cana, casca de arroz, sabugo de milho e sorgo biomassa em fermentação submersa, usando extrato enzimático bruto de *A. niger* produzido em fermentação sólida, que também é capaz de produzir biossurfactante.
- O ácido levulínico, que é um derivado de biomassa celulósica, se mostrou uma fonte de carbono promissora para a produção de biossurfactante.

- Referente aos ensaios para produção de etanol, verificou-se que ao realizar a hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica, tem-se o maior controle das variáveis tempo, pH e temperatura e 19,8 g/L de etanol foi a produção máxima obtida neste estudo.
- O extrato enzimático concentrado por evaporação a vácuo favorece uma maior hidrólise do bagaço de cana e maior produção de etanol, sendo que o uso de extrato enzimático concentrado a 50 °C e com redução de volume de 50 % gerou uma concentração de etanol 1,3 vezes maior que o uso do extrato enzimático concentrado a 60 °C.
- As distintas combinações de meios sólidos para produção de extratos enzimáticos influenciam no tempo e na concentração de etanol e são uma alternativa para aumentar a produção de etanol. O extrato enzimático bruto obtido da extração de duas fermentações em estado sólido, constituídas por bagaço de cana explodido e farelo de arroz, foi o que ensejou as maiores concentrações de etanol: 17,6 g/L e 18,5 g/L nos tempos de 24 e 48 horas de fermentação submersa, respectivamente.

CAPÍTULO 6

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a produção de biossurfactante de *Aspergillus niger* em fermentação sólida com complementação do meio com fontes adicionais de carbono;
- Ampliar o estudo da produção de biossurfactante de ácido levulínico;
- Investigar a produção de outros bioprodutos em diferentes condições operacionais.
- Produzir etanol de segunda geração com outros substratos e testar diferentes pré-tratamentos para as biomassas celulósicas.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; HUR, H.; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631-653, 2016.

AN, P.; NAKHATE, P. H. Optimisation of Rhamnolipid: A New Age Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 1688 and its Application in Oil Recovery, Heavy and Toxic Metals Recovery. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, v. 5, p. 1-14, 2015.

ANTHONY, P.; HARISH, B. S.; JAMPALA, P.; RAMANUJAM, S.; UPPULURI, K. B. Statistical optimization, purification and applications of xylanase produced from mixed bacteria in a solid liquid fermentation using *Prosopis juliflora*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 213-220, 2016.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3843-3849, 2008.

BISWAS, RAJIB, UELLEND AHL, H.; AHRING, B. K. Wet Explosion Pretreatment of Sugarcane Bagasse for Enhanced Enzymatic Hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 104-113, 2014.

BORGES, W. S. **Aproveitamento de efluente gorduroso gerado por abatedouro e frigorífico para produção de biossurfactante**. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

BORGES, W. S.; MOURA, A. A. O.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the operating conditions for rhamnolipid production using slaughterhouse-generated industrial float as substrate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 357-365, 2015.

CABIAC, A.; GUILLON, E.; CHAMBON, F.; PINEL, C.; RATABOUL, F.; ESSAYEM, N. Cellulose reactivity and glycosidic bond cleavage in aqueous phase by catalytic and non catalytic transformations. **Applied Catalysis A: General**, v. 402, p. 1-10, 2011.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, p. 1-15, 2012.

- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754-4766, 2010.
- COLLA, L. M.; RIZZARDI, J.; PINTO, M. H.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8308-8314, 2010.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Compêndio de estudos Conab**. Brasília: Conab, v. 4, 2016. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 jan. 2017.
- COOPER, D.G.; GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n.2, p. 224-229, 1987.
- COUTINHO FILHO, U. **Redes Neurais Artificiais aplicadas à Engenharia Química**. Notas de aula, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.
- CRIPWELL, R.; FAVARO, L.; ROSE, S. H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S.; ZYL, W. van. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. **Applied Energy**, v. 160, p. 610-617, 2015.
- CUEVAS, M.; SÁNCHEZ, S.; GARCÍA, J. F.; BAEZA, J.; PARRA, C.; FREER, J. Enhanced ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated olive stones. **Renewable Energy**, v. 74, p. 839-847, 2015.
- DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.
- DAS, S.; BHATTACHARYA, A.; HALDAR, S.; GANGULY, A.; GU, S.; TING, Y. P.; CHATTERJEE, P. K. Optimization of enzymatic saccharification of water hyacinth biomass for bio-ethanol: Comparison between artificial neural network and response surface methodology. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 3, p. 17-28, 2015.
- DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Production of sophorolipids by the yeast *Candida bombicola* using simple and low cost fermentative media. **Food Research International**, v. 42, p. 499-504, 2009.
- DÁVILA, J. A.; HERNÁNDEZ, V.; CASTRO, E.; CARDONA, C. A. Economic and environmental assesment of syrup production. Colombian case. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 84-90, 2014.
- DE LIMA, C. J. B.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L. Enhancement of rhamnolipid production in residual soybean oil by an isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137-140, p. 463-470, 2007.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72-78, 2013.

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Disponível em: <<http://www.dsmz.de>>. Acesso em: 06 jan. 2017

EL-SHESHTAWY, H. S.; DOHEIM, M. M. Selection of *Pseudomonas aeruginosa* for biosurfactant production and studies of its antimicrobial activity. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 23, p. 1-6, 2014.

ELUMALAI, S.; AGARWAL, B.; SANGWAN, R. S. Thermo-chemical pretreatment of rice straw for further processing for levulinic acid production. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 232-246, 2016.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acesso: 03 jan 2017.

FISCHER, J. **Produção de etanol de segunda geração pelo uso de complexo enzimático de cepas selecionadas do ecossistema do Cerrado**. 171 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

FISCHER, J.; LOPES, V.; SANTOS, E. F. Q.; FILHO, U.; CARDOSO, V. Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna). **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 487-492, 2014.

GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015.

GULDHE, A.; ANSARI, F. A.; SINGH, P.; BUX, F. Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinary concept for biomass production and nutrient remediation. **Ecological Engineering**, v. 99, p. 47-53, 2017.

HABE, H.; SATO, S.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KIRIMURA, K.; KITAMOTO, D. Bacterial production of short-chain organic acids and trehalose from levulinic acid: A potential cellulose-derived building block as a feedstock for microbial production. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 381-386, 2015.

HAMELINCK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. **Fuel**, v. 185, p. 684-691, 2016.

JAIN, A.; WEI, Y.; TIETJE, A. Biochemical conversion of sugarcane bagasse into bioproducts. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 227-242, 2016.

JAIN, R. M.; MODY, K.; JOSHI, N.; MISHRA, A.; JHA, B. Effect of unconventional carbon sources on biosurfactant production and its application in bioremediation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 52-58, 2013.

JARVIS, F. G.; JOHNSON, M. J. A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 71, p. 4124-4126, 1949.

KANG, K. E.; CHUNG, D.; KIM, Y.; CHUNG, B.; CHOI, G. High-titer ethanol production from simultaneous saccharification and fermentation using a continuous feeding system. **Fuel**, v. 145, p. 18-24, 2015.

KHARE, S. K.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. Current perspectives in enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 38-44, 2015.

KIM, S. B.; LEE, S. J.; JANG, E. J.; HAN, S. O.; PARK, C.; KIM, S. W. Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 183-187, 2012.

KITAMOTO, K.; MORITA, T.; FUKUOKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 315-328, 2009.

KORADIYA, M.; DUGGIRALA, S.; TIPRE, D.; DAVE, S. Pretreatment optimization of *Sorghum pioneer* biomass for bioethanol production and its scale-up. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 142-147, 2016.

LEDUC, S.; STARFELT, F.; DOTZAUER, E.; KINDERMANN, G.; MCCALLUM, I.; OBERSTEINER, M.; LUNDGREN, J. Optimal location of lignocellulosic ethanol refineries with polygeneration in Sweden. **Energy**, v. 35, p. 2709-2716, 2010.

LEVER, M.; HO, G.; CORD-RUWISCH, R. Ethanol from lignocellulose using crude unprocessed cellulase from solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7083-7087, 2010.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; XU, J.; SUN, Y.; YUAN, Z.; XIE, J. Consolidated bioprocess for bioethanol production with alkali-pretreated sugarcane bagasse. **Applied Energy**, v. 157, p. 517-522, 2015.

LOPES, V. S.; FISCHER, J.; PINHEIRO, T. M. A.; CABRAL, B. V.; CARDOSO, V. L.; COUTINHO FILHO, U. Biosurfactant and ethanol co-production using *Pseudomonas*

aeruginosa and *Saccharomyces cerevisiae* co-cultures and exploded sugarcane bagasse. **Renewable Energy**, v. xx, p. xx, 2017.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522-550, 2012.

MORO, M. K. **Pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar por extrusão com dupla-roscas**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MOUSSA, T. A. A., MOHAMED, M. S., SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867-880, 2014.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005.

NAIR, R. B.; LUNDIN, M.; BRANDBERG, T.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 314-323, 2015.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n.5, p. 772-776, 2002.

NOORI, M. S.; KARIMI, K. Detailed study of efficient ethanol production from elmwood by alkali pretreatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 197-204, 2016.

NOVACANA. Vendido como promessa, etanol de segunda geração trava em falta de apoio e pesquisa, 2016. Disponível em: <<http://www.novacana.com>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

OLAJUYIGBE, F. M.; OGUNYEW, O. A. Enhanced production and physicochemical properties of thermostable crude cellulase from *Sporothrix carnis* grown on corn cob. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 110-117, 2016.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In **Series on Biotechnology**, Ed. Amiga Digital UFRJ, Rio de Janeiro, v. 2, p. 45, 2008.

POORNEJAD, N.; KARIMI, K.; BEHZAD, T. Improvement of saccharification and ethanol production from rice straw by NMMO and [BMIM][OAc] pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 408-413, 2013.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 180 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2007.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAMÍREZ, I. M.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMÁN, M. G.; BANAT, I. M. Rhamnolipid and surfactant production from olive mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 231-236, 2015.

RAMJEAWON, T. Life cycle assesment of electricity generation from bagasse in Mauritius. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, p. 1727-1734, 2008.

ROCHA, N. R. A. F.; BARROS, M. A.; FISCHER, J.; COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex produced by *Aspergillus niger*. **Renewable Energy**, v. 57, p. 432-435, 2013.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica**. 218 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escolha de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP 1002. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 400-406, 2006.

SILALERTRUKSA, T.; PONGPAT, P.; GHEEWALA, S. H. Life cycle assessment for enhancing environmental sustainability of sugarcane biorefinery in Thailand. **Journal of Cleaner Production**, v. 140, p. 906-913, 2017.

SILVA, N. M. P. R.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132-139, 2014.

SILVA, S. N. R. L.; FARIAS, C. B. B.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174-183, 2010.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOUSA, J. R.; CORREIA, J. A. C.; ALMEIDA, J. G. L.; RODRIGUES, S.; PESSOA, O. D. L.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of a co-product of biodiesel production as carbon source in the production of biosurfactant by *P. aeruginosa* MSIC02. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1831-1839, 2011.

SUKUMARAN, R. K.; SURENDER, V. J.; SINDHU, R.; BINOD, P.; JANU, K. U.; SAJNA, K. V.; RAJASREE, K. P.; PANDEY, A. Lignocellulosic ethanol in India: Prospects, challenges and feedstock availability. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4826-4833, 2010.

SUN, S.; SUN, S.; CAO, X.; SUN, R. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 49-58, 2016.

TODHANAKASEM, T.; NARKMIT, T.; AREERAT, K.; THANONKEO, P. Fermentation of rice bran hydrolysate to ethanol using *Zymomonas mobilis* biofilm immobilization on DEAE-cellulose. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, p. 196-201, 2015.

TOMÉ, J. A. T. R. **Desenvolvimento do pré-tratamento por explosão com vapor da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração via hidrólise enzimática**. 140 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

UNICA – União da Indústria da Cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 03 jan 2017.

VELIOGLU, Z.; UREK, R. O. Optimization of cultural conditions for biosurfactant production by *Pleurotus djamor* in solid state fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 5, p. 526-531, 2015.

WEI, Y. H.; CHOU, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* J4 originating from petrochemical wastewater. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

YAN, K.; JARVIS, C.; GU, J.; YAN, Y. Production and catalytic transformation of levulinic acid: A platform for speciality chemicals and fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 986-997, 2015.

ZHANG, Q.; CAI, W.; WANG, J. Stimulatory effects of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BSZ-07 on rice straw decomposing. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 975-980, 2008.

ZHANG, Z.; O'HARA, I. M.; MUNDREE, S.; GAO, B.; BALL, A. S.; ZHU, N.; BAI, Z.; JIN, B. Biofuels from food processing wastes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 97-105, 2016.

ZHENG, J.; TASHIRO, Y.; WANG, Q.; SAKAI, K.; SONOMOTO, K. Feasibility of acetone-butanol-ethanol fermentation from eucalyptus hydrolysate without nutrients supplementation. **Applied Energy**, v. 140, p. 113-119, 2015.

ZÚÑIGA, U. F. R. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulasas específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. 228 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CAPÍTULO 8

APÊNDICE

APÊNDICE A1: CURVA DE CALIBRAÇÃO DE RAMINOSE

Na Tabela 8.1 estão apresentadas as leituras da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro.

Tabela 8.1 – Leitura no espectrofotômetro das absorbâncias para construção da curva de calibração de raminose.

Raminose (g/L)	Absorbância a 420 nm
0,0625	0,109
0,1250	0,258
0,1875	0,423
0,2500	0,582
0,3750	0,890

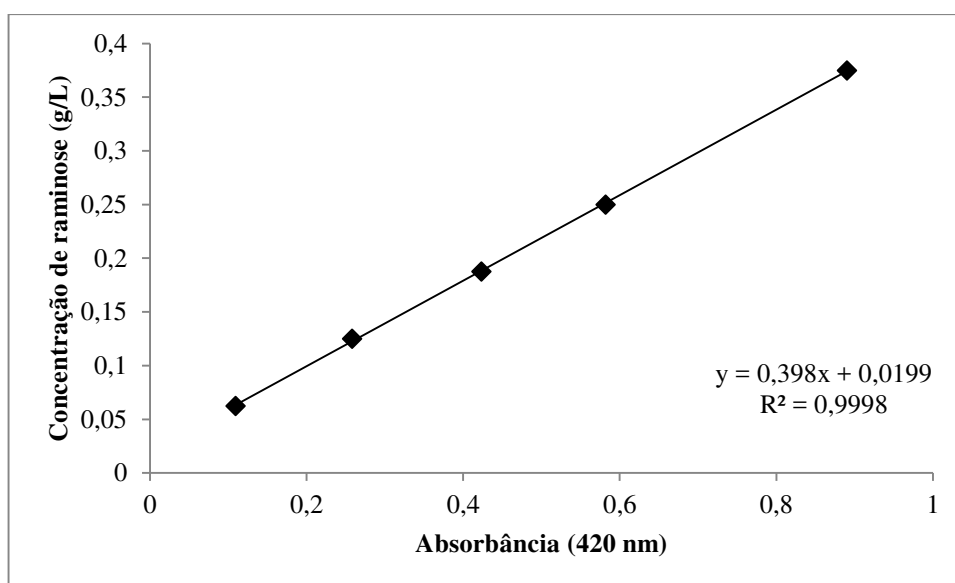


Figura 8.1 – Curva de calibração para concentração de raminose

A concentração de raminose (g/L), dada pelo gráfico da Figura 8.1, é calculada pela Equação 8.1:

$$\text{Concentração de raminose} = 0,398 \cdot \text{Absorbância} + 0,0199 \quad (8.1)$$

**APÊNDICE A2: PUBLICAÇÕES EM REVISTAS INTERNACIONAIS,
CONGRESSOS REGIONAIS, NACIONAIS E INTERNACIONAIS**

- **Revistas Internacionais:**

Artigo aceito para publicação na Revista (2016): **Brazilian Journal of Chemical Engineering** – Qualis A2 para Engenharia II da CAPES (<http://www.aidic.it/cet>);

Título: Machine learning techniques to study ethanol production from lignocellulosic biomass in simultaneous hydrolysis and fermentation;

Autores: Janaína Fischer, Verônica dos Santos Lopes, Saulo Cardoso, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso;

Revista: **Chemical Engineering Transactions** – The Italian Association of Chemical Engineering (AIDIC) – Qualis B5 para Engenharia II da CAPES (<http://www.aidic.it/cet>);

Título: Second generation ethanol production using crude enzyme complex produced by fungi collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna);

Autores: Janaína Fischer, Verônica dos Santos Lopes, Emanoela Fernanda Queiroz Santos, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso;

D.O.I.: 10.3303/CET1438082

Volume/Ano: 38, 2014.

Revista: **Chemical Engineering Transactions** – The Italian Association of Chemical Engineering (AIDIC) – Qualis B5 para Engenharia II da CAPES (<http://www.aidic.it/cet>);

Título: Utilization of cheese whey and cellulosic biomass for production of ethanol by selected fungi strain from Brazilian Savannas;

Autores: Janaína Fischer, Verônica dos Santos Lopes, Célia M. A. Galvão, Juliana C.Teodoro, Ubirajara Coutinho Filho, Vicelma Luiz Cardoso;

D.O.I.: 10.3303/CET1332180

Volume/Ano: 32, 2013.

- **Congressos Internacionais:**

10º Congresso Internacional de Bioenergia 2015 (artigo completo) – São Paulo/SP
– 15 a 16 de julho de 2015:

Estudo da produção de etanol de segunda geração com hidrólise e fermentação separadas;

Estudo comparativo de extratos enzimáticos brutos concentrados e *in natura* na produção de etanol de bagaço de cana;

Estudo da coprodução de etanol de segunda geração e biossurfactante pelo uso de bagaço de cana explodido;

Produção de etanol de bagaço de cana-de-açúcar por processos de hidrólise enzimática separada da fermentação alcoólica.

9º Congresso Internacional de Bioenergia 2014 (artigo completo) – São Paulo/SP –
01 a 03 de outubro de 2014:

Estudo da produção de etanol celulósico por *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*;

Estudo do efeito da hidrólise enzimática na produção de etanol de segunda geração;

8º Congresso Internacional de Bioenergia 2013 (artigo completo) – São Paulo/SP –
05 a 07 de novembro de 2013:

Influência da proporção de bagaço *in natura* e bagaço tratado por explosão de vapor na produção de etanol;

Estudo da produção de etanol com biomassa de celulose e soro por *Kluyveromyces marxianus*;

- **Congressos Nacionais:**

XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica 2015 (artigo completo) – Campinas/SP – 19 a 22 de julho de 2015:

Avaliação do efeito da composição do meio da fermentação em estado sólido na produção de etanol.

XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica 2015 (artigo completo) – Campinas/SP – 19 a 22 de julho de 2015:

Avaliação do efeito da composição do meio da fermentação em estado sólido na produção de etanol.

XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (XIX SINAFERM) e X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas 2013 (artigo completo) – Foz do Iguaçu/PR – 30 a 02 de agosto de 2013:

Uso de extrato enzimático de *Chrysonilia sitophila* na produção de etanol de celulose;
Produção de etanol de bagaço de cana com o uso de extrato enzimático bruto e sucessivas fermentações.

- **Congressos Regionais:**

XXI Jornada em Engenharia Química e III Semana da Pós-Graduação em Engenharia Química 2016 (artigo completo) – Uberlândia/MG – 22 a 26 de agosto de 2016:

Fermentação de biomassa lignocelulósica por levedura para produção de lipídeos.

XX Jornada em Engenharia Química e II Semana da Pós-Graduação em Engenharia Química 2015 (artigo completo) – Uberlândia/MG – 20 a 25 de setembro de 2015:

Avaliação de extratos enzimáticos de *Aspergillus niger* na produção de etanol de segunda geração.

XIX Jornada em Engenharia Química e I Semana da Pós-Graduação em Engenharia Química 2014 (artigo completo) – Uberlândia/MG – 03 a 08 de agosto de 2014:

Avaliação do reuso do bagaço na produção de etanol de segunda geração.

XVIII Jornada em Engenharia Química 2013 (artigo completo) – Uberlândia/MG – 25 a 30 de agosto de 2013:

Produção e uso de complexo enzimático de fungo do cerrado na geração de etanol celulósico.