

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

LAÍS CRISTINA FERREIRA SOUSA

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DA FABRICAÇÃO DE
PAMONHA**

Patos de Minas - MG
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCOMBUSTÍVEIS

LAÍS CRITINA FERREIRA SOUSA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DA FABRICAÇÃO DE PAMONHA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia em Biocombustíveis.

Orientação: Profa. Dra. Líbia Diniz Santos
Colaboração: Profa. Dra. Liliane Maciel de Oliveira

Patos de Minas - MG
2019

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

S725h Sousa, Laís Critina Ferreira, 1989-
2019 Hidrólise enzimática do resíduo da fabricação de pamonha [recurso eletrônico] / Laís Critina Ferreira Sousa. - 2019.

Orientadora: Líbia Diniz Santos.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.334>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Biocombustíveis. 2. Milho. 3. Hidrólise. I. Santos, Líbia Diniz, 1978-, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis. III. Título.

CDU: 662.756

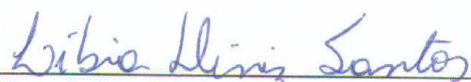
Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

LAÍS CRISTINA FERREIRA SOUSA

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO RESÍDUO DA FABRICAÇÃO DE PAMONHA

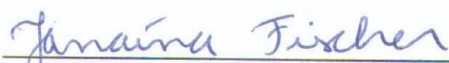
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biocombustíveis, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia em Biocombustíveis. Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora



Dra. Líbia Diniz Santos
Universidade Federal de Uberlândia

Examinadora



Dra. Janáina Fischer
Universidade de Passo Fundo

Examinador



Dr. Gilvan Caetano Duarte
Universidade Federal de Uberlândia

Patos de Minas, 11 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

À minha família,
Por não me deixar desistir.

AGRADECIMENTO

Uma fase muito importante da minha vida se finda e não posso deixar de agradecer a Deus. Minha fé nunca me deixou desistir, por saber que o melhor sempre está por vir.

À Faculdade de Engenharia Química, curso de Engenharia de Alimentos e à coordenação da pós-graduação em Biocombustíveis quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem e trabalho muito ricos.

Aos professores, principalmente Dra. Líbia Diniz Santos e Dra. Liliane Maciel de Oliveira, reconheço um esforço gigante com muita paciência e sabedoria. Foram eles que me deram recursos e ferramentas para evoluir um pouco mais todos os dias.

Agradeço o apoio da Fapemig através do projeto Demanda Universal APQ- 02079-16.

É claro que não posso esquecer da minha amada família, por cada ‘calma, vai dar certo’, dos meus amigos que ouviram muitos ‘nãos’ para os encontros, dos amigos do trabalho que me deram um suporte incrível nos dias mais corridos e insanos, ao aluno de iniciação científica Lucas Almeida pela ajuda com os experimentos e por cada pessoa que de uma alguma forma me ajudou e acreditou em mim.

Eu quero deixar um agradecimento eterno, porque sem tudo isso nada seria possível.

RESUMO

A preocupação com meio ambiente e a necessidade de um destino adequado aos resíduos gerados no setor agroindustrial, compostos por biomassa vegetal, plantas inteiras, palhas ou resíduos agrícolas, apresentam-se como uma alternativa aos produtos de origem fóssil. Além disso, o uso dos resíduos agrícolas contribui garantindo a sustentabilidade da produção e diminuindo a poluição ambiental. Neste sentido, o trabalho teve como objetivo caracterizar o resíduo do processo de fabricação de pamonha e estudar as condições de hidrólise do material. Para tanto, foram realizadas metodologias comumente utilizadas para caracterizar o material determinando a umidade, o teor de cinzas, a granulometria do material seco, o teor de lignina insolúvel e solúvel, holocelulose, hemicelulose e α -celulose, amido, proteína e a análise elementar. Após a caracterização foi realizado um pré-tratamento com ácido sulfúrico à 0,5% e temperatura de 120°C por 15 min, e, por fim, foram estudados processos de hidrólise a fim de verificar a melhor condição para obter o máximo de conversão em açúcares fermentescíveis. Os valores obtidos da concentração de materiais lignocelulósicos e amido no resíduo, torna este uma fonte promissora de açúcares fermentescíveis. O pré-tratamento foi eficiente, diminuindo consideravelmente a quantidade de hemicelulose (de 54,9% para 14,3%), tornando a celulose mais acessiva. Para o estudo da hidrólise deste resíduo foi necessário complexos enzimáticos a base de celulasas e amilases. Foram realizados testes preliminares buscando as melhores condições e variáveis para os estudos das hidrólises. Os melhores resultados foram com amostra pré-tratada, utilizando as concentrações de Accellerase® de 20 FPU/g de biomassa, de Liquozyme® Supra 2.2 de 0,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e de AMG® de 2,50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e a utilização simultânea destes complexos na etapa de sacarificação com tempo de hidrólise de 72h. Com isso, foi possível realizar um delineamento composto central rotacional (DCCR) para maximizar as condições de hidrólise do material estudado, com 22% de biomassa, pH de 5,45, temperatura de 60°C e tempo de 72h, apresentando uma conversão em glicose de 94,51% \pm 1,6, valor próximo ao obtido pelo modelo empírico, que descreveu bem o processo de hidrólise do resíduo da pamonha.

Palavras chaves: resíduo agroindustrial, milho, amido, hidrólise enzimática, pamonha

ABSTRACT

Concern about the environment and the need for a suitable destination for the residues generated in the agroindustrial sector, composed of vegetal biomass, whole plants, straws or agricultural residues, present an alternative to products of fossil origin. In addition, the use of agricultural waste contributes to the sustainability of production and reduces environmental pollution. In this sense, the objective of this work was to characterize the residue of the pamonha manufacturing process and to study the hydrolysis conditions of the material. In order to do so, we used traditional methodologies to characterize the material by determining the moisture content, ash content, grain size of dry material, insoluble and soluble lignin content, holocellulose, hemicellulose and α -cellulose, starch, protein and elemental analysis. After the characterization, a pre-treatment with 0.5% sulfuric acid and a temperature of 120°C for 15 minutes was carried out, and, finally, hydrolysis processes were studied in order to verify the best condition to obtain the maximum conversion to fermentable. The values obtained from the concentration of lignocellulosic materials and starch in the residue make it a promising source of fermentable sugars. Pre-treatment was efficient, considerably reducing the amount of hemicellulose (from 54.9% to 14.3%), making the cellulose more accessible. To study the hydrolysis of this residue, it was necessary to use enzymatic complexes based on cellulases and amylases. Preliminary tests were conducted looking for the best conditions and variables for hydrolysis studies. The best results were with a pre-treated sample using 20 FPU/g biomass Accellerase®, 0.16 μ L/mL Liquozyme® Supra 2.2 and 2.50 μ L/mL AMG®, and the use simultaneous of these complexes in the saccharification step with hydrolysis time of 72 h. Thus, it was possible to perform a central compound design (CCD) to maximize the hydrolysis conditions of the studied material, with 22% of biomass, pH of 5.45, temperature of 60°C and time of 72 h, presenting a conversion in glucose of 94.51% \pm 1.6, a value close to that obtained by the empirical model, which described well the process of hydrolysis of the residue of the pamonha.

Keywords: agroindustrial residue, corn, starch, enzymatic hydrolysis, pamonha

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Principais componentes estruturais do grão de mil..... | 16 |
| Figura 2 - Pamonha..... | 18 |
| Figura 3 – Fluxograma da produção de pamonha..... | 19 |
| Figura 4 - Esquema da parede celular de uma planta..... | 20 |
| Figura 5 - Estrutura molecular da celulose (a) e da hemicelulose (b)..... | 21 |
| Figura 6 – Estrutura molecular da lignina..... | 22 |
| Figura 7 - Estrutura dos componentes do amido..... | 23 |
| Figura 8 - Biomassa <i>in natura</i> | 30 |
| Figura 9 - Pré-tratamento físico da biomassa..... | 33 |
| Figura 10 - Extrator Soxhlet..... | 34 |
| Figura 11 - Amostra pré-tratada..... | 38 |
| Figura 12 - Concentração de glicose liberada por 0,5 mL de enzima diluída em função da log da concentração de enzima..... | 44 |
| Figura 13 - Concentração de glicose liberada pela ação da Liquozyme® (g/L) por tempo (min)..... | 45 |
| Figura 14 - Concentração de glicose liberada pela ação da AMG® (g/L) por tempo (min)..... | 46 |
| Figura 15 – Imagens das peneiras com material retino no peneiramento..... | 47 |
| Figura 16 - Histograma de análise da granulometria do resíduo da pamonha..... | 48 |
| Figura 17 - Teor de glicose (g/L) em resíduo com e sem pré-tratamento obtido pela ação da Accellerase®..... | 52 |
| Figura 18 – Gráfico de Pareto para planejamento fatorial..... | 53 |
| Figura 19 - Concentração da biomassa em glicose (%) após o tempo de sacarificação..... | 56 |
| Figura 20 - Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função da conversão em glicose..... | 58 |
| Figura 21 - Valores experimentais em função dos valores previstos para conversão de biomassa em glicose..... | 59 |
| Figura 22 - Distribuição dos resíduos e torno do zero..... | 59 |
| Figura 23 - Superfícies de resposta e curvas de contorno para Y1 em função da biomassa e pH (a), da biomassa e temperatura (b) e da temperatura e pH (c)..... | 61 |
| Figura 24 - Conversão da glicose (%) após tempo de sacarificação..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos..... | 21 |
| Tabela 2 – Planejamento fatorial do uso de Accellerase®..... | 39 |
| Tabela 3 – Fatores e níveis estudados no DCCR para a hidrólise do resíduo da pamonha..... | 41 |
| Tabela 4 – Valores da diluição e concentração de enzima e a quantidade de glicose liberada por 0,5 mL de enzima..... | 43 |
| Tabela 5 – Composição percentual de resíduos de milho..... | 49 |
| Tabela 6 – Teores de açúcares..... | 50 |
| Tabela 7 – Resultados da análise elementar..... | 51 |
| Tabela 8 – Análise elementar das partes do milho (RAMOS E PAULA et al., 2011)..... | 51 |
| Tabela 9 – Resultados do estudo do planejamento fatorial | 53 |
| Tabela 10 – Conversão em glicose após etapas de hidrólise utilizando complexos enzimáticos simultâneos e separados..... | 54 |
| Tabela 11 – Matriz do DCCR com valores de conversão (%) em glicose..... | 57 |
| Tabela 12 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros significativos para conversão em glicose..... | 58 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 12 |
| 1.1. Objetivos | 14 |
| 1.1.1. Objetivo geral | 14 |
| 1.1.2. Objetivos específicos | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 2.1. Biomassa | 15 |
| 2.1.1. O Milho e seus resíduos | 16 |
| 2.1.2. Pamonha | 18 |
| 2.2. Caracterização da biomassa | 19 |
| 2.2.1. Composição lignocelulósica | 20 |
| 2.2.2. Amido | 23 |
| 2.3. Pré-tratamento | 24 |
| 2.4. Hidrólise | 25 |
| 2.4.1. Enzimas celulolíticas | 26 |
| 2.4.2. Enzimas amilolíticas | 28 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 3.1. Material | 30 |
| 3.2. Métodos | 30 |
| 3.2.1. Determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais | 31 |
| 3.2.2. Análise das concentrações de açúcares | 31 |
| 3.2.3. Caracterização da biomassa | 31 |
| 3.2.4. Pré-tratamento da biomassa | 37 |
| 3.2.5. Estudo preliminar da hidrólise enzimática da biomassa utilizando somente a Accellerase® | 38 |
| 3.2.6. Estudo da hidrólise da biomassa utilizando complexos celulolíticos e amilolíticos de maneira simultânea (a) ou em separados (b) | 39 |
| 3.2.7. Delineamento composto central rotacional (DCCR) | 40 |
| 3.2.8. Estudo do tempo de sacarificação na condição obtida no DCCR | 42 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES | 43 |
| 4.1. Determinação das atividades enzimáticas | 43 |
| 4.1.1. Accellerase® 1500 (Filter Paper Activity) | 43 |
| 4.1.2. Liquozyme® Supra 2.2X e AMG® 300 (Taxas iniciais) | 45 |
| 4.2. Caracterização da biomassa | 47 |
| 4.2.1. Umidade e granulometria | 47 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.2.2. | Composição macromolecular. | 48 |
| 4.2.3. | Açúcares | 50 |
| 4.2.4. | Análise elementar | 50 |
| 4.3. | Hidrólise enzimática da biomassa..... | 51 |
| 4.3.1. | Estudo da influência do pré-tratamento na hidrólise da biomassa por enzimas celulolíticas | 51 |
| 4.3.2. | Efeito da concentração de enzimas celulolíticas e do tempo de hidrólise na sacarificação da biomassa..... | 52 |
| 4.3.3. | Uso das enzimas celulolíticas e amilolíticas na hidrólise da biomassa..... | 53 |
| 4.3.4. | Estudo de tempo de sacarificação utilizando enzimas celulolíticas e amilolíticas | 55 |
| 4.4. | Delineamento Composto Central Rotacional..... | 56 |
| 4.5. | Análise do tempo de sacarificação condição de validação do modelo empírico do DCCR .. | 62 |
| 5. | CONCLUSÕES..... | 64 |
| 6. | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 65 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |

1. INTRODUÇÃO

Os produtos de refino de petróleo durante anos têm se tornado a principal fonte de geração de energia e base para o crescimento das indústrias químicas, existindo uma forte dependência mundial por esta matéria-prima de origem fóssil e não renovável. Uma das atuais alternativas é a utilização de resíduos agroindustriais como fonte de biomassa, principalmente as lignocelulósicas. Essas fontes podem contribuir de várias formas, sendo uma delas a produção de bioetanol. Com o aumento de consumo dos combustíveis convencionais e da mudança climática, surge uma urgente necessidade de uso de fontes renováveis para um futuro sustentável. A reutilização de resíduos agroindustriais provenientes de outros processos propicia o uso de insumos mais baratos, evitando o acúmulo destas no meio ambiente (CINELLI, 2012; SANTOS, 2014; CARVALHO, 2016).

Resíduos lignocelulósicos, como por exemplo, os derivados da produção e processamentos do milho, cana-de-açúcar, abacate, entre outros, constituem uma fonte potencial para vários outros processos industriais, sendo uma das grandes vantagens a de não afetar a produção de alimentos. Alguns resíduos do processamento do milho se mostram ainda mais interessantes por apresentarem em sua composição, além de materiais lignocelulósicos, o amido, que é outra fonte rica em açúcares fermentescíveis, tornando-se um resíduo importante para estudos e aplicações em diversas rotas de processo, inclusive na de biocombustíveis (KOWALSKI et al., 2017; MITHRA et al., 2018).

A conversão de biomassa lignocelulósica em biocombustível, em geral, é composta por cinco operações principais: preparo da biomassa, pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação/retificação/desidratação, dependendo do biocombustível a ser produzido. Apesar desta conversão ser considerada uma alternativa promissora e da existência de tecnologias disponíveis para o processamento, ela ainda se depara em dificuldades técnicas e econômicas. Um dos principais problemas encontrados no processo de conversão é a recalcitrância da biomassa *in natura*, que se refere a proteção à deterioração enzimática dada pelos complexos lignocelulósicos (PAULY E KEEGSTRA, 2010; CANILHA et al., 2012; ZHAO et al, 2012; SANTOS et al., 2012; RAMOS et al., 2015).

Devido a essa recalcitrância, o pré-tratamento destaca-se como uma etapa importante na conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis uma vez que este tem por finalidades a remoção total ou parcial da lignina e hemicelulose, diminuição da cristalinidade da celulose disponibilizando a mesma e demais moléculas sacarídicas ao coquetel enzimático empregado

na hidrólise, aumentando rendimento da conversão em glicose (RUIZ et al., 2011; PHITSUWAN et al., 2013).

Tem-se como outro ponto muito importante para a eficiência da conversão da biomassa a hidrólise, que pode ser tanto por via ácida como por via enzimática. Na hidrólise enzimática, o processo é catalisado por enzimas chamadas de celulases, complexo enzimático que atacam as fibras de celulose, e coquetéis de α -amilase e gluco-amilase, que são usadas para liquefação e sacarificação, respectivamente, do amido (HAMELINCK et al., 2005, WANGPOR, J. et al., 2017).

A bioconversão de lignocelulósicos em etanol tem como ponto mais importante a eficiência da sacarificação enzimática, e esta é afetada por vários fatores, como a cristalinidade da celulose, eficiência do processo de pré-tratamento, escolha de enzimas no coquetel, entre outros. Vários estudos têm sido realizados com lignocelulósicos para produção de etanol por diferentes abordagens de sacarificação e fermentação, no entanto, a literatura sobre a utilização dessas biomassas de lignocelulose-amido, tais como resíduo da fabricação da pamonha, cascas de raízes e vegetais, contendo amido, além de celulose e hemicelulose, é escassa. Muitos desses resíduos gerados de atividades domésticas causam problemas ambientais resultantes de seu descarte irregular e abrigando pragas, insetos e microrganismos (MITHRA et al., 2018).

Embora o amido presente em matérias-primas, como milho, batata ou mandioca seja facilmente convertido em glicose por enzimas, as biomassas contendo também holocelulose (celulose + hemicelulose), como um polissacarídeo principal requerem diferentes estratégias de pré-tratamento e hidrólise. Neste contexto, estudou-se o resíduo do processamento da pamonha composto de amido e materiais lignocelulósicos, buscando a otimização das condições de hidrólise dessa biomassa.

1.1.Objetivos

1.1.1. Objetivo geral

Estudar a hidrólise enzimática do resíduo da fabricação de pamonha, contendo pericarpo do milho (*Zea mays*) e amido.

1.1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar o resíduo da fabricação de pamonha;
- Aplicar um pré-tratamento eficiente neste resíduo;
- Estudar as interações das enzimas amilolíticas e celulolíticas na hidrólise;
- Maximizar os resultados das condições de hidrólise enzimática do resíduo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa

A biomassa lignocelulósica tem como principal componente a celulose. Por ser um recurso muito abundante e totalmente bio-renovável torna-se um grande potencial de produção sustentável de produtos químicos e biocombustíveis (ZHOU et al., 2011). Com isso, tem-se tornado necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam o uso dessas fonte celulósica, proporcionando maior rendimento específico por área de cultivo (PALACIO et al., 2012).

Como descrito no trabalho de Perdices et al. (2012), a biomassa pode ser utilizada para fins energéticos baseado em resíduos primários (agrícolas e florestais), resíduos secundários, (de origem das indústrias madeireiras, moveleira, resíduos de processamento de alimentos, da produção de carvão vegetal, da criação de animais, entre outros) e os resíduos terciários, (proveniente do consumo de alimentos e materiais).

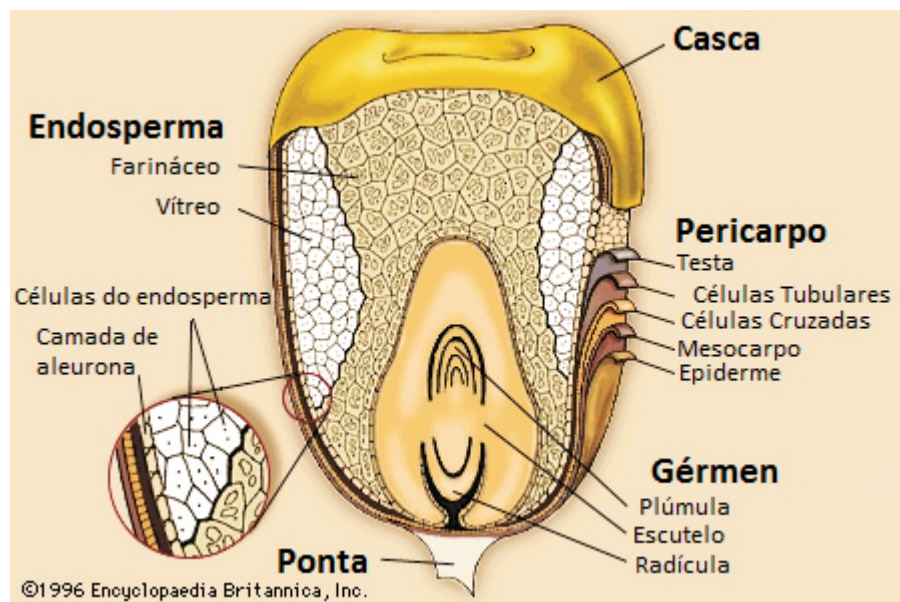
De acordo com Hinrichs et al. (2010), as biomassas podem ter utilidade como combustíveis sólidos (lascas de madeira), líquidos (produzidos a partir da ação química ou biológica sobre a biomassa sólida e/ou da conversão de açúcares vegetais em etanol ou metanol), e gasosos (produzidos por meio do processamento com alta temperatura e alta pressão). Ainda para os mesmos autores, o sabugo e palha de milho e outros produtos que normalmente seriam descartados, são exemplos de fontes potenciais de biomassa para obtenção de combustível líquido.

Uma das principais fontes de biomassa são os resíduos de produções agroindustriais, pois é possível produzir mais a partir de uma mesma área plantada, além de não competir com a produção de alimentos (ROSILLO-CALLE, 2010). O aproveitamento de resíduos agrícolas como uma alternativa de produção de etanol de segunda geração (2G) visa a diminuição da degradação ambiental já que a utilização deste biocombustível é um dos principais mecanismos de redução dos gases do efeito estufa, pois parte das emissões de gás carbônico é reabsorvida pelas plantações no processo de fotossíntese (ANP, 2015).

2.1.1. O Milho e seus resíduos

O milho (*Zea mays spp.*) tem origem no México (CABRAL et al., 2012) e é conhecido botanicamente como cariopse. O grão de milho possui quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo e ponta, como mostra a Figura 1, as quais se diferem em composição química e organização dentro do grão (PAES, 2006). O milho é considerado como uma das 'culturas inteligentes', pois tem o potencial para produzir alimentos, ração animal e combustível (NDIMBA et al., 2013). O principal destino da safra do milho são as indústrias de rações para animais e para alimentação humana (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2015).

Figura 1: Principais componentes estruturais do grão de milho



Fonte: Enciclopédia Britânica, 1996

O Brasil é o 3º maior produtor de milho do mundo, com uma produção de 95000 mil t no ano de 2017, atrás apenas dos EUA (362094 mil t) e da China (215000 mil t). Os estados que mais produzem milhos são Mato Grosso, Paraná, Goiás, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Neste último, o milho possui uma forte tradição que têm trazido bons ganhos em produtividade (6472 kg/ha), as principais regiões mineiras que mais produziram milhos foram o Alto Paranaíba (7436kg/ha), o Triângulo Mineiro (6717 kg/ha) e o Sul de Minas (6706 kg/ha) (SEAPA/MG, 2018).

O etanol produzido a partir do milho apresenta vantagens como a facilidade de armazenamento da matéria-prima, ciclo de reprodução reduzido e pode ser fornecido no período de entressafra da cana-de-açúcar, destacando também o potencial da região do presente trabalho. Ademais, é um produto que possui baixo custo quando nas regiões produtoras do milho, viabilizando a produção de etanol por questões de logística e transporte. (TREVISAN et al, 2016).

Atualmente admite-se que as unidades produtoras de etanol de milho são majoritariamente *flex* (já em operação), as quais permitem aproveitar as baixas do preço do milho, visto que os custos logísticos do transporte da região Centro-Oeste impactam a competitividade do produto no mercado internacional. Existe apenas uma unidade dedicada em grande escala, instalada em 2017, que possui planos de expansão. Estima-se que a produção de etanol de milho alcance 900 milhões de litros em 2026. O investimento estimado é de cerca de R\$700 milhões, sendo que R\$450 milhões já foram aplicados na planta dedicada existente (MME/EPE, 2017).

O processo e produção do etanol de milho se diferencia do processo com a cana de açúcar, pois, por se tratar do amido como fonte de açúcares fermentescíveis, são necessárias as etapas de gelatinização e liquefação, antecedendo a sacarificação (TREVISAN et al, 2016). Após a utilização dos grãos de milho são gerados os resíduos (palha e sabugo), os quais podem ser aproveitados como matéria-prima não só para produção de novos produtos, mas também atribuir outra finalidade, como por exemplo, a palha de milho, que geralmente é incinerada ou utilizada como cama nos criadouros de aves nas propriedades rurais brasileiras (PAES et al., 2015). No caso da palha e até mesmo o sabugo, podem ser utilizados para um fim mais nobre (CABRAL et al., 2012), como a produção de etanol 2G, pois possuem açúcares disponíveis em sua composição.

Um outro processo interessante, e que faz parte da culinária brasileira, é a produção de pamonha. A quantidade de resíduos é grande pois, além de palha e sabugo, restam o resíduo proveniente do peneiramento da massa do produto, que é composto basicamente pela casca do milho (pericarpo) e amido não dissolvido, assim como na produção de óleo e etanol de milho. Resíduo esse que pode ser utilizado para diversos fins, como ração animal e, ainda não estudado, produção de biocombustível. Em suma, o milho é um cereal cultivado em boa parte do mundo, tornando-se uma importante fonte de utilização (CARVALHO, 2016).

2.1.2. Pamonha

A pamonha (Figura 2) é um produto herdado da cultura indígena e obtido a partir do milho verde moído. Na sua receita mais tradicional é adicionado de açúcar cristal, sal, margarina, óleo de soja e como opcionais, o queijo, o creme de leite, e cozida dentro da palha de milho (URU, 2007).

Figura 2: Pamonha

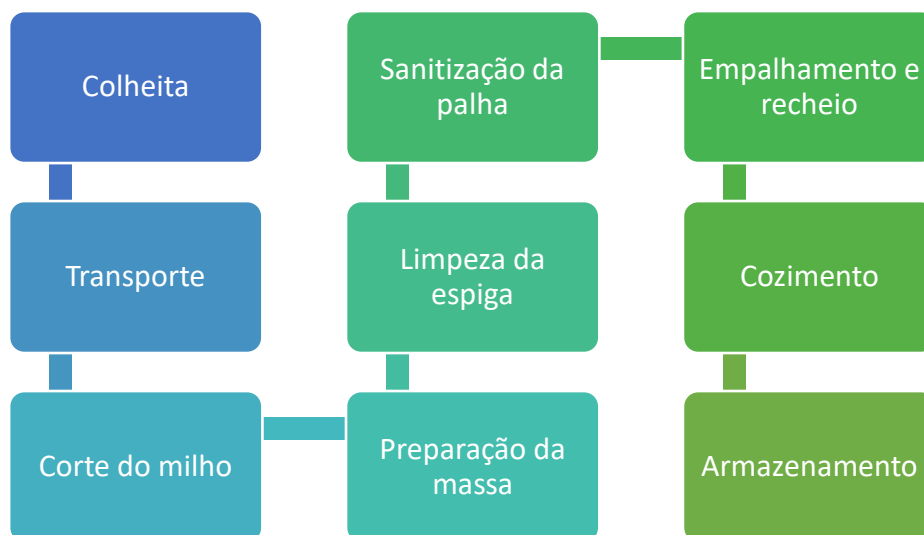


Fonte: URU, 2007

O processo de produção da pamonha, de acordo com a empresa produtora (Aguinaldo das Pamonhas, Patos de Minas), é representado na Figura 3, e se inicia com o milho colhido na lavoura e transportado em caminhões até o estabelecimento, em seguida é cortado e as palhas esterilizadas. O milho passa por um processo de limpeza e por fim é ralado e filtrado. No processo de filtração, gera-se o resíduo utilizado neste trabalho.

Após a filtração a massa é colocada num recipiente para ser temperada. Posteriormente, as pamonhas são empalhadas adicionando o recheio, que pode ser queijo ou carnes desfiadas, entre outros. Após, as pamonhas são cozidas e armazenadas em caixas térmicas ou congeladas.

Figura 3: Fluxograma de produção da pamonha



Fonte: Próprio autor

O consumo da iguaria é elevado principalmente nos estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais. De acordo o produtor de pamonhas de Patos de Minas, proprietário da Aguinaldo das Pamonhas, diariamente é produzido de 800 a 1000 pamonhas, consumindo aproximadamente 2400 espigas no mesmo período, gerando 1 tonelada de resíduo por dia. Desse resíduo, os sabugos são secos e colocados como fonte de energia na caldeira da fábrica, a palha não utilizada para a produção e o resíduo da massa da pamonha são utilizados apenas como alimentação secundária para gados.

O engenheiro agrônomo responsável pela Pamonharia Gourmet, em São Paulo, apresenta dados semelhantes, onde a produção diária é de 900 a 100 pamonhas. Segundo o mesmo, o gasto de espigas é menor, sendo aproximadamente 1 espiga por pamonha, gerando diariamente 500 kg de resíduo.

Com isso, surgiu o interesse em estudar esse resíduo composto de casca de milho e amido, que é gerado em grande quantidade na região do Alto Paranaíba, grande produtora de pamonha, buscando identificar as melhores condições de hidrólise e posterior produção de biocombustíveis.

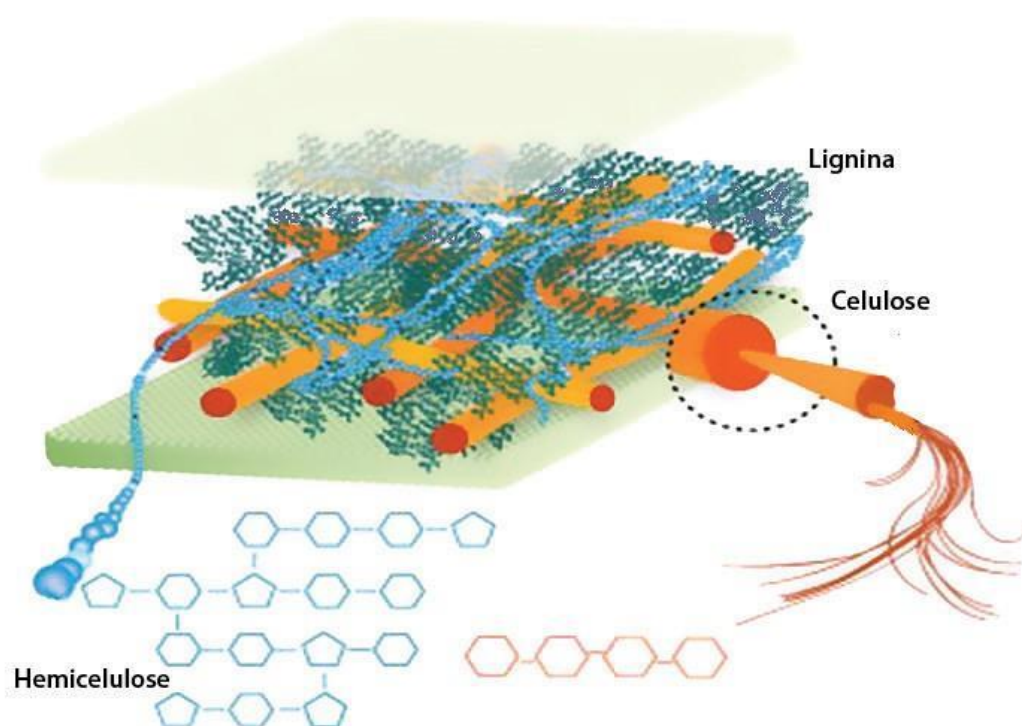
2.2.Caracterização da biomassa

A biomassa, resíduo da produção agroindustrial, é composta de materiais lignocelulósicos e, no caso da biomassa de milho, possui também amido em sua constituição.

2.2.1. Composição lignocelulósica

A parede celular da biomassa é composta principalmente por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e vários compostos inorgânicos, estruturas estas que são responsáveis por criar uma barreira natural contra a ação de microrganismos e sendo, também, resistência das plantas às intempéries, exemplificados na Figura 4 (TAHERZADEH e KARIMI, 2007; LUCIA, 2008; CARLI, 2011; KAHR et al., 2013; LANGAN et al., 2014).

Figura 4: Esquema da parede celular de uma planta



Fonte: IMBROISI, 2015

A quantidade desses componentes varia de acordo com o tipo de biomassa e se encontram nas proporções de 40 a 60% de celulose, 15 a 50% de hemicelulose, 10 a 30% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (LORA et al., 2012; CARLI, 2011; SANTOS et al., 2012), como mostra a Tabela 1. Os processos de hidrólise e fermentação sofrem forte influência nos rendimentos dependendo da estrutura e composição da biomassa (SILVA, 2010).

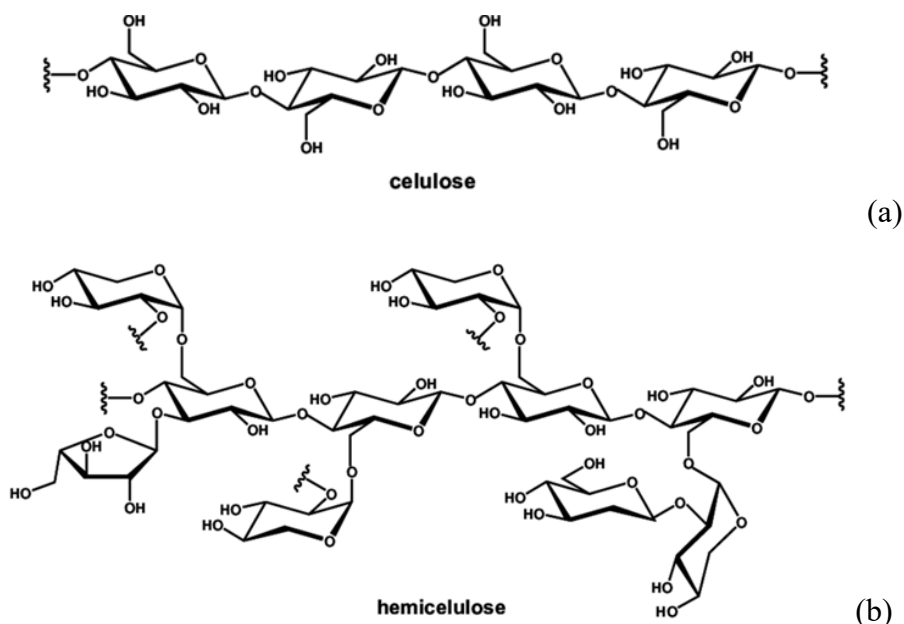
Tabela 1: Composição química parcial de alguns materiais lignocelulósicos

| Material lignocelulósico | Celulose (%) | Hemicelulose (%) | Lignina (%) |
|----------------------------|--------------|------------------|-------------|
| Farelo de cevada | 23,0 | 32,7 | 24,4 |
| Sabugo de milho | 31,7 | 34,7 | 20,3 |
| Folhas de milho | 37,6 | 34,5 | 12,6 |
| Bagaço de cana | 40,2 | 26,4 | 25,2 |
| Palha de arroz | 43,5 | 22,0 | 17,2 |
| Palha de trigo | 33,8 | 31,8 | 20,1 |
| Palha de sorgo | 34,0 | 44,0 | 20,0 |
| Casca de aveia | 30,5 | 28,6 | 23,1 |
| <i>Eucalyptus grandis</i> | 40,2 | 15,7 | 26,9 |
| <i>Eucalyptus globulus</i> | 46,3 | 17,1 | 22,9 |

Fonte: Adaptado de SILVA, 2010.

A celulose (Figura 5a) é um polímero linear de alta massa molecular constituído unicamente por unidades α -D-glucose ligados entre si pela ligação 1,4. A hemicelulose (Figura 5b) também é um polissacarídeo, mas é constituído por vários tipos de unidades de açúcar, resultando em um polímero ramificado e de cadeia curta. A hemicelulose e a celulose têm a função de material de suporte nas paredes celulares (SJÖSTRÖM, 1981; BROWNING, 1967).

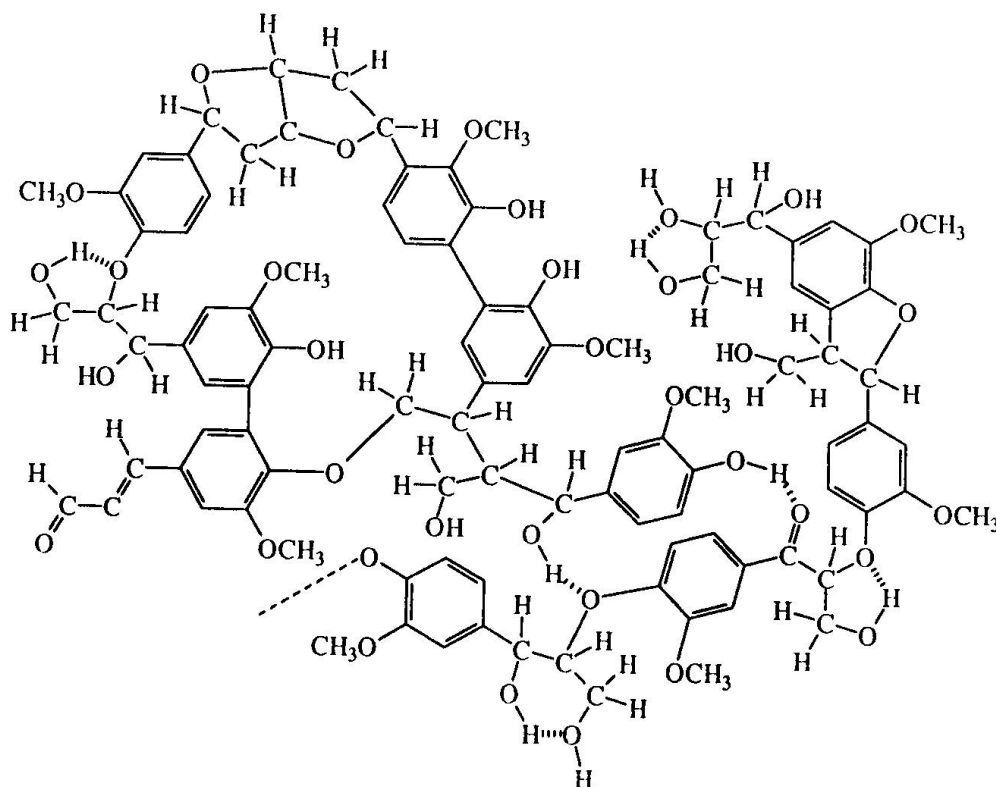
Figura 5: Estrutura molecular da celulose (a) e hemicelulose (b)



Fonte: FENGEL et al., 1983

A lignina (Figura 6) é constituída de um sistema aromático composto de unidades fenil-propanóides. É de natureza amorfa e geralmente insolúvel em solventes comuns. A lignina difere dos polissacarídeos por sua resistência à hidrólise ácida e sua grande reatividade frente a oxidantes e outros reagentes. A lignina está localizada entre as paredes celulares e é responsável pela rigidez destas paredes (SJÖSTRÖM, 1981; BROWNING, 1967).

Figura 6: Estrutura molecular da lignina



Fonte: BROWNING, 1967

A holocelulose é o produto obtido ao se fazer uma deslignificação (máxima remoção de lignina possível) de modo que todos os polissacarídeos sejam preservados (FENGEL et al., 1983).

Os extrativos são as substâncias que são removidas pela extração com solventes neutros. Os extrativos são considerados como partes não-essenciais das paredes celulares. Aparentemente estes extrativos não desempenham nenhum papel vital para as plantas, e desta forma, estes extrativos são tratados como produtos de um metabolismo secundário (BROWNING, 1967). Estes extrativos são classificados como compostos aromáticos polifenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois, substâncias inorgânicas e outros componentes menores, como hormônios, etc. Foram classificados em 1939 por Kurth (1933) como materiais que seriam solúveis em éter etílico, álcool etílico e água.

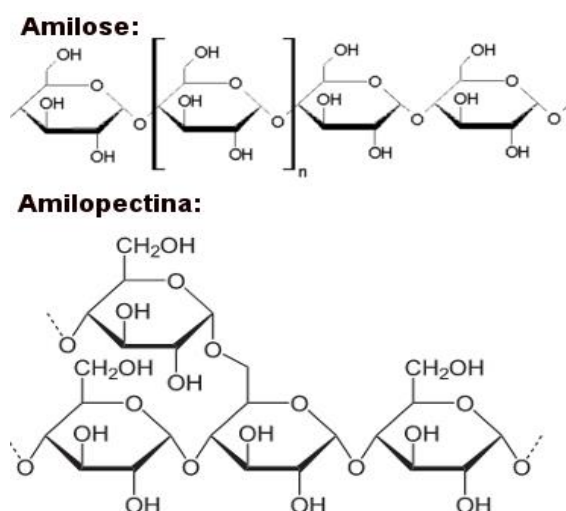
2.2.2. Amido

O amido, um polissacarídeo ramificado de unidades de D-glicose, é a principal reserva de alimento das plantas, sendo sintetizado na forma de grânulos aparentemente esféricos, constituído por duas partes distintas (Figura 7) (CORRADINI et al., 2005):

- Amilose: polímero linear ligações do tipo α -1,4 entre as unidades de glicose e que corresponde tipicamente a 15-30 % da massa total do amido;

- Amilopectina: região ramificada do amido, devido a presença de ligações do tipo α -1,6.

Figura 7: Estrutura dos componentes do amido.



Fonte: CINELLI, 2012

A cristalinidade do amido é dada, principalmente, pela estrutura organizada na forma de aglomerados da amilopectina, na qual é alternada regiões altamente ordenada, de cadeias paralelas, e regiões menos ordenadas, nas porções ramificadas. A amilose é vista como uma porção independente, que se dispõe aleatoriamente nos grânulos entre as regiões amorfas e cristalinas da amilopectina, como uma fração móvel (OATES, 1997).

Componentes secundários também são encontrados na estrutura do amido, divididos em três principais categorias (BULEON et al., 1998):

- (i) Provenientes de fragmentos da parede celular;
- (ii) Componentes superficiais;
- (iii) Componentes internos.

Esses componentes são, principalmente, lipídeos, fósforo, proteínas, minerais e sais, além de serem encontrados enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos na superfície (BULEON et al., 1998; HOOVER, 2001).

2.3. Pré-tratamento

Para facilitar a bioconversão e aumentar o rendimento da fermentação, algumas técnicas de pré-tratamentos têm sido propostas e são vistas como pré-requisitos para viabilizar a conversão total do processo. Tais técnicas são baseadas em processos físicos, químicos, biológicos ou na combinação destes (CARVALHO, 2011). O pré-tratamento tem a finalidade de quebrar as barreiras morfológicas, dinâmicas e mecânicas facilitando o acesso das enzimas aos polissacarídeos, para então obter uma eficiente conversão em açúcares fermentescíveis (LANGAN et al., 2014; RABELO et al., 2010; SILVA, 2011). Para isso, o pré-tratamento deve ser seletivo e de acordo com a biomassa, pois certamente é a etapa que interfere diretamente em todo o processo produtivo. Além disso, o pré-tratamento deve diminuir a formação de inibidores da hidrólise enzimática, facilitar a utilização de uma menor carga de enzimas para completa hidrólise, evitar a perda de açúcares durante o processo, permitir a recuperação da lignina e de outros compostos significativos para a conversão de outros produtos e minimizar o uso de energia (ROCHA et al., 2016). Os principais pré-tratamentos são:

- **Biológicos:** São métodos seletivos que consistem na degradação biológica da lignina, usando fungos como microrganismo que produzem enzimas para solubilizar a lignina, bem como a liberar a hemicelulose. A principal vantagem desse processo é o baixo consumo de energia e condições ambientais moderadas. Por outro lado, é um procedimento caro, com baixos rendimentos e longos tempos de reação (HAMELINK et al., 2005; BALAT et al., 2008).

- **Físicos:** Tem a finalidade de diminuir a granulometria da biomassa, aumentando superfície de contato e facilitando a etapa de hidrólise. Tais como a moagem, o ultrassom, entre outros (BAUDEL, 2006; PERDICES et al., 2012).

- **Químicos:** São mais baratos e efetivos, destacando a utilização de ácido diluído que solubiliza e remove a hemicelulose, tornando a celulose mais acessiva (SAHA et al., 2005; SANTOS et al., 2012), e os alcalinos que operam com parâmetros de temperatura e pressão

mais moderados e são usados no tratamento de materiais com reduzido teor de lignina (KIM e HOLTZAPPLE, 2005).

- Físico-químicos: São métodos que combinam outros tipos de pré-tratamento, como processos hidrotérmico, a extração por amônia, e a explosão a vapor, onde a biomassa é exposta ao contato com o vapor e mantido por determinado intervalo de tempo, temperatura e pressão a fim de promover a deslignificação, diminuindo o grau de cristalinidade e grau de polimerização da celulose e parcial ou completa hidrólise da hemicelulose e aumentar a área superficial da biomassa (PERDICES et al., 2012).

A escolha do método de pré-tratamento depende do material a ser utilizado, observando sua natureza física, composição química e propriedades, bem como as modificações que se pretende fazer (ROCHA et al, 2016).

Rocha et al. (2016) propuseram um estudo dos pré-tratamento de resíduo do milho, onde foram avaliados os fatores tempo, temperatura e concentração de ácido sulfúrico (H_2SO_4 aq), encontrando como melhor resposta, em teores de açúcares redutores, os ensaios a 120°C, 15 min e 0,5% de H_2SO_4 e 110°C, 7 min e 2% de ácido. Com essas condições, foi realizado a hidrólise enzimática e fermentação, onde o maior rendimento da fermentação foi dado na condição a 120°C, 15 min e 0,5% de H_2SO_{4aq} , sendo este 70,8% para o sabugo e 92,9% para a palha de milho.

Li, P. et al. (2016) estudaram o pré-tratamento de diferentes partes do milho utilizando H_2SO_{4aq} na concentração de 2% e a espiga obteve o melhor rendimento em glicose (94,2%). Carvalho (2016), em seu estudo da hidrólise e fermentação da palha e do sabugo do milho, utilizou o pré-tratamento sugerido por Rocha (2016), 120°C, 15 min e 0,5% de H_2SO_{4aq} , e obteve um rendimento mássico de 74% para a palha do milho e 73% para o sabugo, sua fermentação teve eficiência de 90,97%.

2.4. Hidrólise

Como os materiais lignocelulósicos não contêm monossacarídeos disponíveis para a bioconversão é necessário hidrolisá-los para tornar os açúcares fermentescíveis, a hidrólise pode ser via ácida ou enzimática (CARDONA et al., 2010). A hidrólise ácida da celulose apresenta o inconveniente de requerer o emprego de elevadas temperatura e pressão, levando à destruição de parte dos carboidratos e à obtenção de produtos de degradação potencialmente tóxicos aos microrganismos. A hidrólise enzimática se mostra com um maior potencial para

desenvolvimento por ser mais seletiva, devido a especificidade das enzimas, por operarem em condições brandas de pH e temperatura, evitando problemas de danificação dos equipamentos, gerando economia de energia e necessitando de equipamentos menos rigorosos do que à ácida (LYND et al., 2002).

Visando a melhoria do rendimento e velocidade de reação, surge vários estudos que visam otimizar o processo de hidrólise, bem como a atividade enzimática dos complexos utilizados (SOUZA, 2016).

O complexo enzimático ideal deve ser constituído por enzimas responsáveis pela degradação dos materiais lignocelulósicos que são as celulasas, hemicelulase, xilanases e pectinases e pela quebra do amido, que podem ser as alfa e beta amilases e amiloglucosíades. Segundo GUSAKOV et al. (2007) o complexo celulolíticos ideal deve consistir em um coquetel constituído por essas enzimas. Essas composições que determinam as condições de pH, temperatura, tempo de reação, concentração de enzima e quantidade de biomassa utilizadas, devem ser estudadas, determinadas e otimizadas para cada caso em que for aplicado (RABELO, 2010).

2.4.1. Enzimas celulolíticas

A estrutura da celulose pode ser quebrada por intermédio de um complexo enzimático que recon heça ligações β -1,4 glicosídicas entre moléculas de glicose, denominadas celulasas (CAO e TAN, 2002). Essas enzimas, altamente específicas, agem em sinergia e podem ser classificadas dependendo do local de ação no polímero de celulose, como endoglucanases (endo 1,4-D-glucanohidrolase), as exoglucanases/celobiohidrolase (1,4- β -D-glucanacelobiohidrolase) e as β -glucosíades (ZHANG e LYND, 2004; CASTRO, 2006; FERREIRA, 2010; ARANTES e SADDLER, 2010).

As endoglucanases iniciam a hidrólise da celulose nas regiões menos cristalinas (amorfas) diminuindo o comprimento das mesmas e conseqüentemente gerando outras extremidades livres. O grupo das exoglucanases (EC 3.2.1.91), é constituído por celobiohidrolase (CBH) e glucanohidrolase (GH), que são capazes de liberar glicoses diretamente da fibra celulósica. E as β -glucosíades (EC 3.2.1.21), que representam um grupo de grande expressão dentre as enzimas hidrolíticas, atuam nos resíduos de celodextrina (GP<7) e celobiose hidrolisando-os a glicose (DASHTBAN, et al., 2009; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

As enzimas celulolíticas atuando em substratos insolúveis são caracterizadas como reações heterogêneas, e podem ser descritas em 3 etapas (ZHNAG; LYND, 2004):

1. Mudanças físicas e químicas na celulose ainda insolúvel;
2. Etapa que libera os oligômeros solúveis, ocorre com a ação das endoglucanases e exoglucanases na interface sólido-líquido;
3. Etapa em que os intermediários solúveis são quebrados em glicose, pela β -glicosidase.

SOUZA (2016) estudou o efeito das enzimas comerciais Cellic Cetc® 2 e Accellerase® 1500 nas frações celulósicas da palha de cana-de-açúcar, bem como as possíveis variáveis que influenciam no processo e obteve como melhores resultados o complexo enzimático Cellic Cetc® na concentração de 13 FPU/g_{biomassa}, uma carga de sólidos de 15% e experimentos sendo realizados em reatores. Santos (2014) também utilizou a Accellerase® 1500 em seus experimentos para avaliar a eficiência dos pré-tratamentos que aplicou nos resíduos de milho e, com carga de sólido de 1% e 2 mL de enzima, obteve valores de 34,3% a 83,3% para conversão enzimática e valores de 56,3% a 92,9% de eficiência de fermentação alcoólica.

2.4.1.1. Accellerase® 1500

Um complexo enzimático produzido com uma estirpe modificada de *Trichoderma reesei* destinado à biomassa lignocelulósica utilizadas em indústrias de processamento, incluindo combustíveis renováveis e produtos químicos. Este complexo possui uma combinação eficaz de enzimas que modificam e digerem, efetivamente, carboidratos não-amiláceos, sendo que contém múltiplas atividades enzimáticas: exoglucanase, endoglucanase, hemicelulase, betaglicosidase e outros, sendo indicada pelo fabricante as condições de temperatura de 50°C e o pH 4,8. O desempenho da hidrólise de biomassa deste complexo enzimático é um resultado sinérgico do efeito de todas as atividades contidas nele (DUPONT, 2011).

2.4.2. *Enzimas amilolíticas*

Assim como os lignocelulósicos, o amido também necessita de quebras em sua estrutura para que possa se tornar viável para fermentação. Para a conversão eficiente do amido em compostos menores é necessária uma ação coordenada de enzimas específicas.

A primeira é a gelatinização, onde ocorre um rompimento da ordem das moléculas do amido com mudanças irreversíveis nas propriedades do mesmo (BENINCA, 2008). Nas altas temperaturas de gelatinização as ligações de hidrogênio entre amilose e amilopectina se rompem, reduzindo a cristalinidade e possibilitando o inchaço dos grânulos devido a entrada de água (HOOVER, 2001).

Após a gelatinização, a hidrólise do amido segue e pode ser realizada por via ácida ou enzimática. A especificidade da hidrólise enzimática é a principal característica frente a hidrólise química, tanto à reação, quanto ao substrato (EL-DASH et al., 1982; OBEL, 2001).

As enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias, conforme sua ação:

- As endoamilases, que atuam nas ligações glicosídicas do tipo α -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido, resultando na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias.

- As exoamilases, que hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais menores (GUPTA et al., 2003).

Mesmo com inúmeras tentativas de padronização, a atividade enzimática dos complexos é específica de cada fabricante, sendo que cada uma tem seus substratos, temperaturas e pH diferentes (TORRES, 2009).

Usualmente, a fermentação do amido de milho é feita em conjunto com a hidrólise enzimática, o que dificulta e encarece o processo, com isso Trevisan et al. (2016) propuseram uma avaliação desses processos separadamente, utilizando complexos enzimáticos comerciais. Parazzi (2017) testou a viabilidade de hidrolisar o amido do caldo de cana de açúcar para aumentar o rendimento da fermentação na produção de etanol.

Em estudos com biomassas menos comuns, Urbano (2017) trabalhou com enzimas amilolíticas comerciais visando hidrolisar o amido de mandioca para produção de etanol. Kowalsk et al. (2017) estudaram as enzimas comerciais na hidrólise amido do caroço de abacate, obtendo um rendimento de 33,83% na fermentação.

Levando em consideração o resíduo de estudo do trabalho, que possui em sua composição celulose, hemicelulose e amido, é possível analisar o trabalho de Lesiecki et al. (2012), que estudaram complexos enzimático amilolíticos, celulolíticos e peptídicos para a polpa de batata, verificando a possibilidade de trabalhar em conjunto ou separado.

2.4.2.1. Liquozyme® Supra 2.2X

Uma α -amilase termoresistente otimizada, produzida a partir do *Bacillus licheniformis*, para diminuir o comprimento da cadeia do amido antes da sacarificação e da fermentação com levedura, hidrolisando ligações (1,4)-alfa-D-glicosídeo. Esta enzima trabalha com temperaturas próximas a 90°C e a atividade enzimática declarada pelo fornecedor é de 300 KNU/g (KNU - Unidade de kilo novo de alfa-amilase, é a quantidade de enzima que decompõe 5,26 g de amido por hora, pelo método padrão da Novozymes). Utilizada na chamada fase de liquefação da produção do etanol, a Liquozyme® quebra os amidos complexos em cadeias de dextrina menores, reduzindo a viscosidade da solução, preparando-o para processamento na etapa seguinte (NOVOZYMES, 2008b).

2.4.2.2. AMG® 300

Uma amiloglicosidase de grau alimentício, produzida a partir de uma cepa selecionada de *Aspergillus niger*, hidrolisa as ligações (1,4) e (1,6)-alfa-D-glicose nas extremidades não-redutoras do amido após o processo de liquefação. A AMG® tem atividade enzimática declarada de 300 AGU/mL (AGU – Unidade de amiloglicosidase é definida como a quantidade de enzima que cliva 1 μ mol de matose por minuto sob condições de ensaio padrão utilizando concentração de substrato 10 mg/ml, 37°C, pH 5,0 por 30 minutos) e é recomendada para sacarificação do amido na produção de glicose (NOVOZYMES, 2008a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais utilizado no desenvolvimento experimental do trabalho, bem como as metodologias empregadas.

3.1. Material

Os ensaios e análises químicas foram realizados nos Laboratórios do Curso de Engenharia de Alimentos, no Campus Patos de Minas – Universidade Federal de Uberlândia e em laboratórios de outros Institutos parceiros, na mesma Universidade. Os reagentes utilizados foram todos de pureza analítica. Os complexos enzimáticos comerciais utilizados foram: Accellerase[®] 1500 da DuPont, Liquozyme[®] Supra 2.2X e AMG[®] 300 da Novozymes e gentilmente doados por LNF Latino Americana Cons. Ass. Imp. Ltda.

A biomassa, resíduo da fabricação de pamonha (Figura 8), foi fornecida por um dos principais produtores da região, Aguinaldo das Pamonhas, situado na Rodovia MG354, Km 9,5 – Patos de Minas/MG.

Figura 8: Biomassa *in natura*.



Fonte: Próprio autor

3.2. Métodos

Todas as amostras e experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.1. *Determinação da atividade enzimática pelo método das taxas iniciais*

Foi utilizado o complexo enzimático celulolíticos comercial Accellerase® 1500 da Dupont. Para a determinação da atividade real do complexo comercial foi realizado um estudo da atividade enzimática de celulase total (FPase), a atividade foi avaliada como a velocidade de hidrólise da celulase proveniente do papel filtro, segundo metodologia de Ghose (1987). Onde a atividade foi analisada pela concentração de enzima que libere 2,0 mg de açúcares redutores a partir de 50 mg de papel filtro Whatman nº1 durante 60 minutos e a quantificação dos açúcares redutores é realizada pelo método que utiliza o ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Para os complexos enzimáticos amilolíticos, Liquozyme® Supra 2.2X e AMG® 300, foram realizadas análises de taxas iniciais como método para determinação de sua atividade enzimática, respeitando as etapas de gelatinização (banho maria a 90°C por 15 min), liquefação (0,16 µL/mL de Liquozyme® Supra 2.2 X, pH 5,5 a 90°C por 15 min com pontos de 3 em 3 minutos) e sacarificação (2,50 µL/mL de AMG® 300, pH 4,8 a 50° por 45 min com pontos de 5 em 5 minutos), e coletando pontos para a obtenção de uma curva em valores de concentração de glicose, analisados por de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.2. *Análise das concentrações de açúcares*

As concentrações de açúcares foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (CLAE). O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. As amostras foram diluídas e filtradas, em filtro 0,22 µm, e injetadas no equipamento marca Shimadzu, modelo LC-20ª Prominence, equipado com coluna SUPELCOGEL K. As concentrações de açúcares foram determinadas por detector de índice de refração. As análises foram realizadas utilizando fosfato de potássio dibásico (15 mM) como fase móvel, vazão da bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 85°C e volume de injeção de 20 µL.

3.2.3. *Caracterização da biomassa*

A caracterização da biomassa se faz importante para que se tenha conhecimento do potencial da mesma como fonte de carboidratos fermentáveis, bem como para que se possa avaliar a eficiência dos processos posteriores.

3.2.3.1.Determinação da umidade

A determinação da umidade existente na amostra foi feita com a amostra *in natura* em Estufa de Secagem, marca Tecnal, a 105°C por 2 horas ou até que o peso da amostra ficasse constante e determinado a perda de massa, baseado na metodologia de IAL (2005).

3.2.3.2.Determinação de cinzas

O teor de cinzas da biomassa deve ser conhecido para que este não seja quantificado como produto em algumas análises executadas. O percentual é calculado a partir da massa inicial. A determinação das cinzas foi feita com amostra *in natura* em Forno Mufla, marca Lucadema, a 550°C por 6 horas ou até que só reste cinzas no cadinho e o teor calculado pelo perda de massa (IAL, 2005).

3.2.3.3. Granulometria

A granulometria foi realizada em um Vibrador de Peneiras, marca TPL – Tamis Produtos de Laboratórios, com a biomassa seca em estufa à 70 +/- 3°C por 16 h, utilizando peneiras de 6 a 35 Tyler, afim de avaliar melhor o material a ser estudado com a finalidade de obter a distribuição granulométrica e o tamanho de partícula, em seguida calculado o percentual retido em cada peneira.

3.2.3.4.Preparação da amostra

A biomassa foi seca em estufa microprocessada com circulação e renovação de ar, marca Quimis, à 70°C por 16 h, moída em Macromoinho de facas, marca Fortinox, caracterizando o primeiro pré-tratamento físico da biomassa, como mostra a Figura . Em seguida, a biomassa foi peneirada e as frações que ficaram retidas em 40 e 80 Tyler, foram armazenadas e utilizadas no decorrer do trabalho.

Figura 9: Pré-tratamento físico da biomassa.



Fonte: Próprio autor

3.2.3.5. Análise Elementar

A análise foi realizada em Analisador Elementar CHNSO Perkin Elmer 2400 do Laboratório Multiusuário do Instituto de Química – UFU. O equipamento permite a determinação da porcentagem em massa de Carbono, Hidrogênio, Nitrogênio e Enxofre em amostras sólidas e líquidas, com precisão de aproximadamente 0,5% (RAMOS E PAULA, et al. 2011).

3.2.3.6. Determinação de Proteína

A quantidade de proteína presente na amostra foi determinada pelo método Kjeldahl, onde a biomassa sofre processos de digestão com ácido sulfúrico concentrado. A amostra digerida é destilada e ao final utiliza uma titulação para quantificar o nitrogênio presente na amostra, sendo este convertido em proteína (IAL, 2005).

3.2.3.7. Determinação de amido

Foi medido cerca de 200 mg de biomassa e acrescentado 42 mL de água destilada, em seguida, a mistura foi submetida a aquecimento a 90°C para gelatinização do amido. Quando essa temperatura foi atingida, foi adicionado 1 mL da enzima α -amilase (Liquozyme® Supra) e a mistura foi mantida nessa temperatura por 15 min, para hidrólise da cadeia linear do amido.

Logo após, a temperatura foi reduzida para 60°C e o pH foi ajustado com tampão citrato 0,1M pH 4,8 (condição ótima para enzima glucoamilase) para que a enzima glicoamilase pudesse atuar, assim 1 mL da enzima (AMG® 300) foi adicionada. Essa temperatura foi mantida por 1 h, a fim de que as dextrinas produzidas pela primeira enzima pudessem ser hidrolisadas em monômeros de glicose. Ao final, as enzimas foram inativadas a 100°C por 5 min e o sobrenadante submetido a análise em HPLC para quantificar a concentração de glicose, que é multiplicada pelo fator de conversão 0,9 (IAL, 2005).

3.2.3.8.Preparação da biomassa livre de extrativos

A preparação foi realizada segundo o método da NREL/TP-510-42619, onde uma amostra de 2,0 a 10,0 g de biomassa seca foi colocada em um cartucho de papel-filtro e adaptado a um extrator do tipo Soxhlet (Figura 10). Foi realizada uma extração com aproximadamente 190 mL de etanol 95% por 16 horas. Em seguida, o material vegetal livre de extrativos foi retirado do equipamento e deixado em estufa a 50°C até a evaporação completa do solvente. Para quantificação desses extrativos foi utilizado a diferença de massa do cartucho com a amostra.

Figura 10: Extrator tipo Soxhlet.



Fonte: Próprio autor

3.2.3.9. Determinação de açúcares e lignina – NREL/TP-510-42618

3.2.3.9.1. Hidrólise ácida

A hidrólise é necessária para que a biomassa apresente uma estrutura com maior facilidade de quantificação. Assim, com as amostras moídas e secas, cerca de 300 mg de amostra foram transferidas para tubos de ensaio e tratadas com 3,0 mL solução de H₂SO_{4aq} 72% (v/v). A reação foi realizada em banho termostaticado à 30°C por 60 minutos, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, a mistura foi diluída com 84 mL de água destilada e transferida quantitativamente para um frasco de erlenmeyer de 250 mL. Para que a hidrólise acontecesse de forma completa, os frascos de erlenmeyers foram fechados e autoclavados por 60 minutos a 121°C (2 bar). Após a hidrólise, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e filtrados em papel de filtro qualitativo de faixa preta (previamente pesado). Foi reservado parte do filtrado para a determinação da lignina solúvel e a outra para a quantificação dos carboidratos por CLAE. A fração sólida retida no papel filtro foi lavada com 2,0 L de água destilada, e determinada a lignina insolúvel.

3.2.3.9.2. Determinação de lignina insolúvel em ácido

O material retido no papel filtro da hidrólise do item 3.2.2.9.1 foi colocado em cadinho previamente pesado e seco em estufa a 105°C até peso constante e pesado. Em seguida, foi levado para mufla onde ficou por 18 horas a 575°C, sendo, ao final, pesado e obtido o percentual de lignina através da Equação 1.

$$\% \text{Lignina Insol} = \frac{(M1 - M0) - (M2 - M0) - M3}{M} * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo que:

M0 = massa do cadinho seco

M1 = massa do cadinho após o tempo na estufa

M2 = massa do cadinho após o tempo na mufla

M3 = massa de proteína na amostra

MI = massa inicial de amostra

3.2.3.9.3. Determinação de lignina solúvel

O filtrado da solução da metodologia do item 3.2.9.2 foi diluído com água para que a absorvância ficasse entre 0,7 e 1,0 formando assim uma segunda solução. Assim, com essa nova solução foi possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia ultravioleta (UV) no comprimento de onda 320nm e calculado pela Equação 2.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \frac{\text{Abs} * \text{V filtrado} * \text{Diluição}}{\epsilon * M * \text{Caminho ótico}} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo que:

V filtrado = 86,73 mL

Diluição = 2

ϵ = 30 L/g.cm

MI = massa inicial

Caminho ótico = 1 cm

3.2.3.9.4. Carboidratos estruturais

A quantificação dos carboidratos presentes na amostra foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.10. Determinação da holocelulose

Os teores de holocelulose, hemicelulose A e B e α -celulose foram determinados pelos métodos descritos por Browning (1967).

Em um erlenmeyer de 1,0 L foram adicionados cerca de 4,0 g de amostra livre de extrativos. Em seguida, adicionados 110 mL de água destilada, 3,0 mL de ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{COOH}_{\text{aq}}$), 22 mL de solução de acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2_{\text{aq}}$) a 20% e 9,0 mL de clorito de sódio ($\text{NaClO}_2_{\text{aq}}$) a 40%. O sistema foi homogeneizado com agitação, tampada e colocada em banho-maria a 75°C por 60 minutos em agitação frequente. A adição dos reagentes foi repetida até que a holocelulose apresentasse a coloração branca. Em seguida, a solução foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado de porosidade média (nº 2) sob vácuo. O filtrado foi lavado com cerca de 1 L de água destilada, em seguida com duas porções pequenas de acetona

(cerca de 10 mL cada porção) e filtrada até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto foi seco em estufa até a massa permanecer constante e o rendimento calculado por diferença de massa.

3.2.3.10.1. Determinação de hemicelulose e α -celulose

Três gramas de holocelulose obtida no procedimento do item 3.2.2.10 foram pesadas e transferidas para um frasco de erlenmeyer de 250 mL em atmosfera de nitrogênio e em seguida adicionados 100 mL de hidróxido de potássio (KOH_{aq}) a 24%, a 25°C. A solução foi homogeneizada, o frasco vedado e colocado em banho-maria a 25°C por 120 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. O sistema foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado de porosidade média previamente tarado, recolhendo-se o filtrado em um frasco kitassato de 500 mL e lavada sucessivamente com 25 mL de solução de KOH 24%, 50 mL de água destilada, 25,0 mL de ácido acético a 10% e 100 mL de água destilada e, então, transferida para um vidro de relógio e seca em estufa até massa constante. O precipitado obtido foi α -celulose e as hemiceluloses foram calculadas por diferença de massa entre a holocelulose e a celulose.

3.2.4. *Pré-tratamento da biomassa*

A metodologia utilizada foi baseada no estudo que maximizou os resultados do pré-tratamento em resíduos de milho no estudo de Rocha et al. (2016). Uma quantidade significativa de amostra foi colocada em erlenmeyer juntamente com solução de H_2SO_4 0,5% na proporção de 1:10 (massa de sólido/volume de solução ácida). O procedimento foi conduzido em autoclave à 121°C durante 15 minutos. Após autoclavagem, toda a suspensão foi filtrada em papel de filtro. A fração sólida resultante foi então recolhida e mantida em estufa a 50°C, com o propósito de se obter um material seco (<10% de umidade). De posse do material pré tratado (Figura 11), foram realizadas análises de amido (item 3.2.3.7), holocelulose (item 3.2.3.10), hemicelulose e α -celulose (item 3.2.3.10.1) afim de contabilizar a eficiência do tratamento.

Figura 11: Amostra pré-tratada.



Fonte: Próprio autor

3.2.5. *Estudo preliminar da hidrólise enzimática da biomassa utilizando somente a Accellerase®*

Os estudos da hidrólise enzimática foram realizados utilizando o tampão Citrato 0,1M pH 4,8 (GHOSE, 1987), em Incubadora Shaker, modelo SL-223, marca Solab, com agitação de 150 rpm e temperatura controlada para cada experimento. A concentração de açúcares foi determinada por CLAE e apresentada em conversão de açúcares em glicose.

3.2.5.1. Estudo da influência do pré-tratamento na hidrólise da biomassa com coquetel enzimático

Afim de se obter uma maior quantidade de açúcares fermentescíveis, foi proposto um estudo das melhores condições de hidrólise da biomassa.

O estudo foi realizado com a biomassa pré-tratada, conforme item 3.2.3, e com amostra sem pré-tratamento, com concentração de 1% de substrato, fixando a concentração de enzima Accellerase® em 89 FPU/g de substrato, um volume de solução de 100 mL em tampão citrato 0,1M – pH 4,8, a temperatura de 50°C a 150 rpm.

3.2.5.2. Estudo da concentração de enzimas celulolíticas empregadas

O experimento foi realizado com objetivo de determinar a possível influência do tempo e da quantidade de enzimas celulolíticas (Accellerase® 1500) empregada na hidrólise. Assim, realizou-se um planejamento fatorial simples com 2 variáveis, conforme a Tabela 2, fixando a quantidade de biomassa pré-tratada em 0,1 g, um volume de solução de 10 mL em tampão citrato – pH 4,8, a temperatura de 50°C a 150 rpm. A escolha da temperatura e pH teve como referência as especificações técnicas da enzima comercial utilizada.

Tabela 2: Planejamento fatorial do uso de Accellerase®

| Fatores | -1 | +1 |
|--|----|----|
| [Accellerase® 1500] (FPU/g de biomassa) | 10 | 20 |
| Tempo (horas) | 24 | 48 |

3.2.6. Estudo da hidrólise da biomassa utilizando complexos celulolíticos e amilolíticos de maneira simultânea (a) ou em separados (b)

Foram avaliados os complexos enzimáticos Accellerase® 1500, Liquozyme® Supra 2.2X e AMG® 300 utilizadas na hidrólise, visto que, devido à presença de amido e de lignocelulósicos na biomassa, seriam necessárias enzimas amilolíticas e celulolíticas. Sendo assim, o teste mediu a eficiência de hidrólise na etapa de sacarificação da amostra frente a utilização das enzimas separadamente e a utilização simultânea dos complexos enzimáticos.

Devido a presença do amido, a amostra precisou passar pelo processo de gelatinização (banho maria a 90°C por 15 min) e liquefação (0,16 µL/mL de Liquozyme® Supra 2.2 X em 100 mL de solução, 90° a 45 min) para que então pudesse ser feito a sacarificação (XU et al., 2018).

Durante a etapa de sacarificação manteve-se a quantidade de Accellerase® 1500 em 20 FPU/g de biomassa e a AMG® 300 em 2,5 µL/mL (XU et al, 2018), a temperatura de 50°C, pH 4,8, a agitação em 150 rpm.

Na etapa de sacarificação foi analisado a utilização dos complexos enzimáticos Accelerase® e AMG® de forma separadas (a) e simultâneas (b).

- a) No teste utilizando as enzimas separadamente, acrescentou nos erlenmeyers, previamente liquefeitos, 2,5 µL/mL de AMG® em pH 4,8, a 50°C por 5 h e posteriormente adicionado 20 FPU/g de biomassa de Accelerase®, mantido por 24 h (Xu, et al, 2018). Nos quais foram analisados concentração de glicose, por CLAE, nos tempos de 5 h, após a hidrólise do amido, e em 24 h, após a hidrólise da celulose, sendo que as enzimas foram inativadas a 100°C por 5 min.
- b) No teste das enzimas utilizadas de forma simultânea, os complexos enzimáticos foram adicionados juntos, sendo 2,5 µL/mL de AMG® e 20 FPU/g de biomassa de Accelerase® em pH 4,8, e mantidos em reação por um período de 24h. Após esse período as enzimas foram inativadas a 100°C por 5 min e a quantificação de glicose foi obtida por CLAE.

Os resultados das duas formas de hidrólise da biomassa pré-tratada foram comparados entre si.

3.2.6.1. Estudo do tempo de sacarificação utilizando os complexos enzimáticos AMG® e Accelerase® simultaneamente

De acordo com a melhor forma de utilização dos complexos enzimáticos, foi possível estudar a hidrólise total da biomassa em relação ao tempo de sacarificação. Assim, foram feitas as etapas de gelatinização (banho maria a 90°C por 15 min), liquefação (0,16 µL/mL de Liquozyme® Supra 2.2 X em 100mL de solução, 90° a 45 min). Após esse período foi analisado o tempo de sacarificação das amostras nos respectivos tempos de reação: 24h, 48h, 72h e 96h.

3.2.7. *Delineamento composto central rotacional (DCCR)*

A favorável utilização dos complexos enzimáticos amilolíticos e celulolíticos simultâneos motivou a realização de um estudo da sacarificação realizando um Delineamento composto central rotacional (DCCR), para estudar a influência da concentração de biomassa, pH e temperatura no processo de sacarificação. Este estudo foi realizado em *shaker* com rotação de 150 rpm após as etapas de gelatinização e liquefação fixas (banho maria a 90°C por

15 min, em seguida 0,16 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Liquozyme® Supra 2.2 X, 90° por 45 min), em um volume de solução de 10 mL e tempo de reação em 72h, condições estas encontradas como satisfatórias nos testes preliminares.

Este delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado com três variáveis independentes, com três repetições no ponto central, totalizando dezessete ensaios, com objetivo de maximizar os resultados da sacarificação da biomassa pré-tratada. A Tabela 3 apresenta os valores utilizados no delineamento com os respectivos níveis. A resposta avaliada para o planejamento foi a conversão da biomassa em glicose (%) obtida no final do processo.

Tabela 3: Fatores e níveis estudados no DCCR para a hidrólise do resíduo da pamonha.

| Fatores | -1,68179 | -1 | 0 | +1 | + 1,68179 |
|-----------------------|----------|-----|-------|-------|-----------|
| (X1) Biomassa (%) | 3,12 | 7,4 | 13,04 | 18,03 | 21,12 |
| (X2) pH | 2,61 | 3,5 | 4,8 | 6,1 | 6,98 |
| (X3) Temperatura (°C) | 29,8 | 36 | 45 | 54 | 60,1 |

As Equações de codificação para a concentração de biomassa (X_1), pH (X_2) e temperatura (X_3) são mostradas, respectivamente, nas Equações (3, 4, e 5).

$$X1 = \frac{B - 13,04}{15,32} \quad (\text{Equação 3})$$

$$X2 = \frac{pH - 4,8}{1,30} \quad (\text{Equação 4})$$

$$X3 = \frac{T - 45}{9} \quad (\text{Equação 5})$$

Destaca-se que os níveis das variáveis foram escolhidos de forma coerente, levando em consideração limitações ou valores previamente conhecidos, além de respeitar as limitações do

Shaker e utilizar informações fornecidas pelos fabricantes dos complexos enzimáticos (SOUZA, 2016; OGEDA et al, 2010; SILVA, 2015; WEICIEHOWSKI et al, 2002; KOWALSKI et al, 2017, PARAZZI et al, 2017).

Os resultados obtidos foram ajustados por regressão múltipla, em software Statistic® 7.0 e realizada uma avaliação estatística da estimação dos parâmetros por meio dos valores de *t* de *Student*, sendo eliminados aqueles com nível de significância (valor-p) superior a 5%. Assim, com os parâmetros significativos obteve-se uma equação que representa os efeitos das variáveis em determinado estudo.

Com os resultados do DCCR foi possível construir as superfícies de resposta para verificar a existência de uma região que maximiza a conversão dos açúcares da biomassa em glicose, na qual se encontra uma faixa de combinação das variáveis estudadas.

3.2.8. *Estudo do tempo de sacarificação na condição obtida no DCCR*

Nas condições de concentração de biomassa de 18.03%, pH de 5.45 e temperatura de 60°C foi estudado a influência do tempo de sacarificação de 24 a 144 h, utilizando Accelerase® 1500 em 20 FPU/g de biomassa e a AMG® 300 em 2,5 µL/MI, em *shaker* de agitação 150 rpm e controle de temperatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Determinação das atividades enzimáticas

As atividades dos complexos enzimáticos utilizados para a hidrólise do material, conforme item 3.2.1.

4.1.1. *Accellerase*® 1500 (Filter Paper Activity)

Neste ensaio foi possível determinar a atividade das celulasas presente no complexo por meio da sacarificação da celulose do papel filtro.

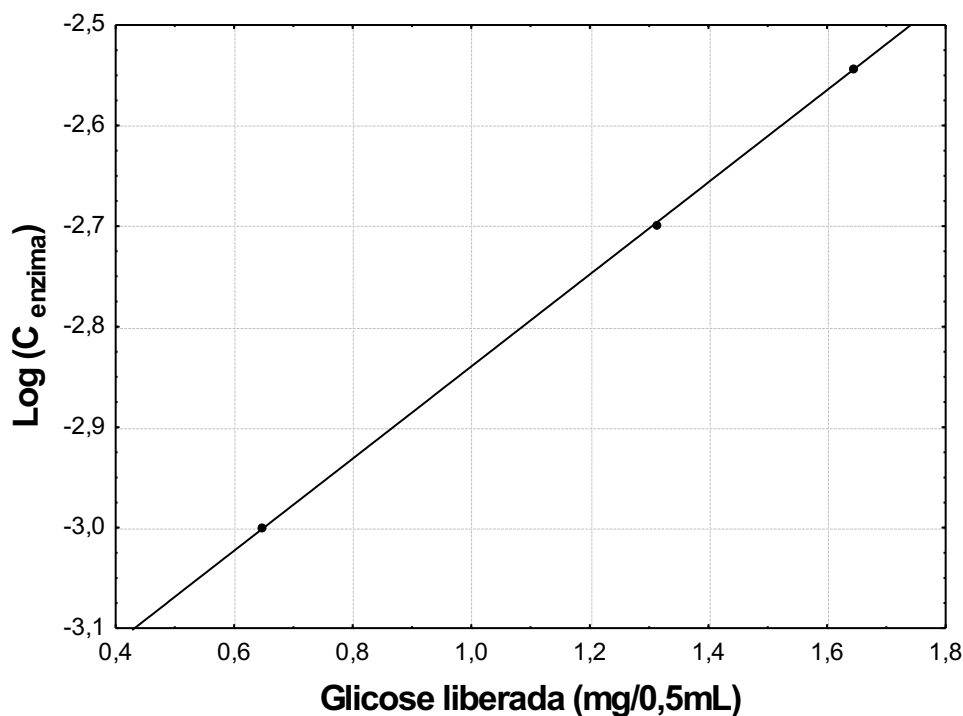
A Tabela 4 mostra a diluição enzima, sua concentração e a quantidade de glicose liberada com 0,5 mL de enzima.

Tabela 4: Valores de diluição e concentração de enzima e a quantidade de glicose liberada por 0,5 mL de enzima.

| Diluição da enzima | Concentração da enzima (mL Enzima/mL total) | Concentração de glicose liberada por 0,5 mL de enzima (mg/0,5mL) |
|---------------------------|--|---|
| 1000 | 0,001 | 0,65 |
| 500 | 0,002 | 1,31 |
| 350 | 0,00286 | 1,64 |

Com base nos resultados da Tabela 4 foi possível avaliar o comportamento da enzima para determinação de sua atividade, conforme mostra a Figura 12.

Figura 12: Concentração de glicose liberada por 0,5 mL de enzima diluída em função do log da concentração de enzima.



De acordo com Ghose (1987), uma unidade de atividade de enzima é baseada na liberação de 2,0 mg de glicose por 0,5 mL de solução de enzima diluída em 60 minutos de reação. Sendo assim, com a equação da reta (Equação 6) obtida pelo ajuste de regressão linear, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,99, foi possível determinar a concentração de enzima necessária para liberar exatamente 2,0 mg de glicose.

$$\text{Log } C = 0,4582 \times (\text{ART}) - 3,2979 \quad (\text{Equação 6})$$

Onde: C = concentração de enzima ($\text{mL}_{\text{enz}}/\text{mL}$)

ART = açúcares redutores totais (mg/0,5 mL)

Logo, a concentração de enzima é 0,004154321. Sabendo-se deste valor foi possível calcular a atividade do complexo pela Equação 7 (GHOSE, 1987).

$$FPU = \frac{0,37}{0,004154321} \text{ uni dade. mL}^{-1} = 89,06 \text{ FPU. mL}^{-1}$$

(Equação 7)

De posse deste valor, foi possível estimar a quantidade de enzima que será utilizada no estudo da hidrólise do material.

4.1.2. *Liquozyme® Supra 2.2X e AMG® 300 (Taxas iniciais)*

Devido à complexidade do material trabalhado, enzimas amilolíticas também foram utilizadas. Para tanto, conforme item 3.2.1, as avaliações de suas atividades foram realizadas por meio de taxas iniciais. As Figuras 13 e 14 que correspondem, respectivamente, aos gráficos obtidos pelos ensaios com os complexos enzimáticos *Liquozyme® Supra 2.2X* e *AMG® 300*, onde o coeficiente angular da reta representa a unidade (U) de atividade. Sendo que U é quantidade de glicose (g/L) liberada pela ação da enzima por minuto de reação.

Figura 13: Concentração de glicose (g/L) liberada pela ação da *Liquozyme®* por tempo (min)

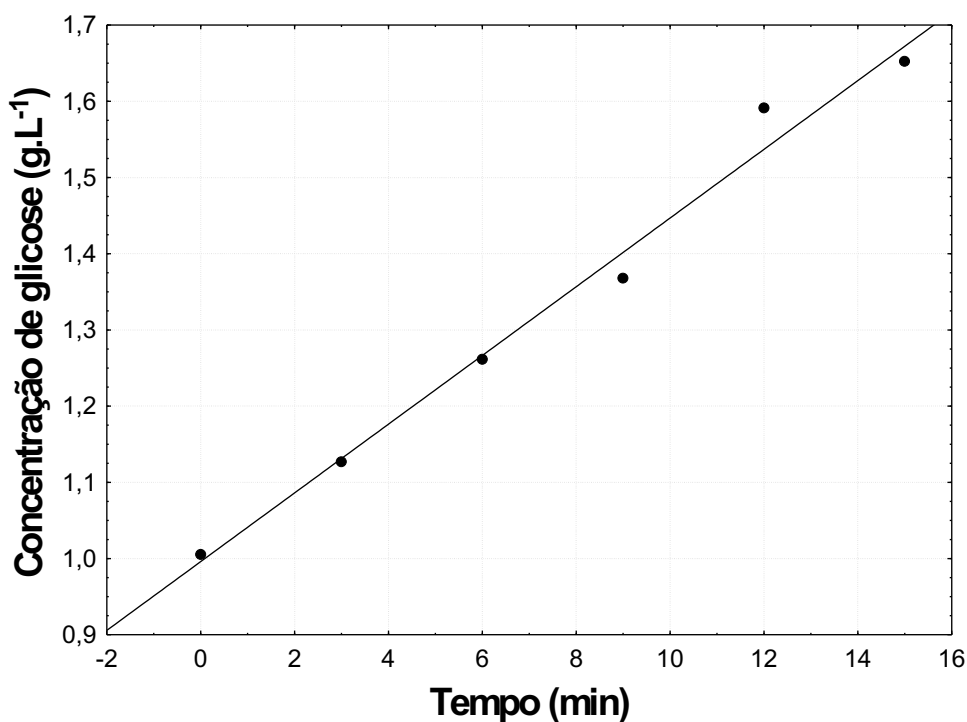
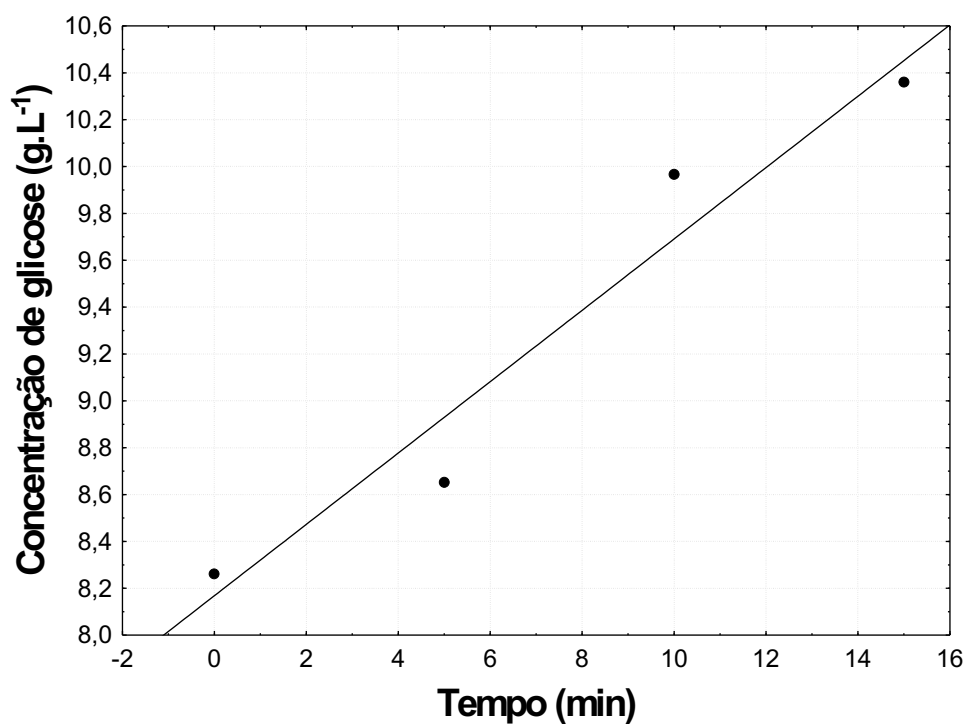


Figura 14: Concentração de glicose (g/L) liberada pela ação da AMG® por tempo (min)



A regressão linear aplicada aos dados da Figura 10 e 11 resultou nas Equações (8 e 9) com coeficientes de determinação de 0,99 e 0,94, respectivamente.

$$[Glicose]_t = 0,996 + 0,0451 t$$

(Equação 8)

$$[Glicose]_t = 8,1681 + 0,1523 t$$

(Equação 9)

Assim, a atividade enzimática dos complexos amilolíticos é determinada sendo que em 1 mL de enzima é capaz de liberar 0,0451 g/L de glicose por minuto de reação para a Liquozyme® Supra 2.2X e de 0,1523 g/L para AMG® 300.

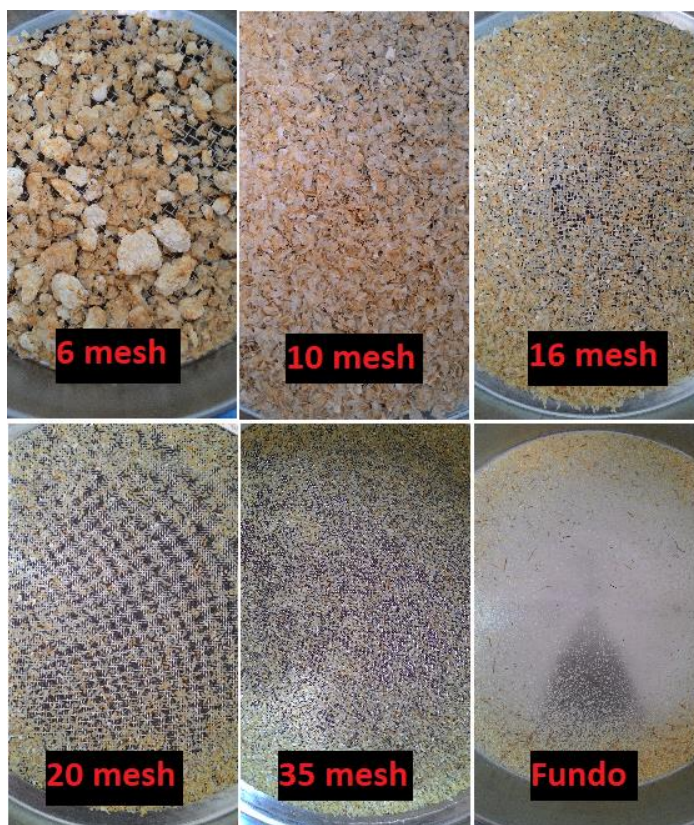
4.2. Caracterização da biomassa

4.2.1. Umidade e granulometria

A umidade da biomassa deve ser determinada a fim de que a água existente nela não seja quantificada como produto em algumas análises executadas. O teor de umidade da amostra *in natura* foi de 22%, o que mostra a diferença deste resíduo para outros resíduos do milho, onde a umidade encontrada geralmente é menor de 10%, e sugere um tratamento que visa melhorar as condições de armazenamento, pois a alta umidade pode causar problemas na biomassa, como a deterioração por microrganismos (SANTOS, 2014; CASARA et al, 2017).

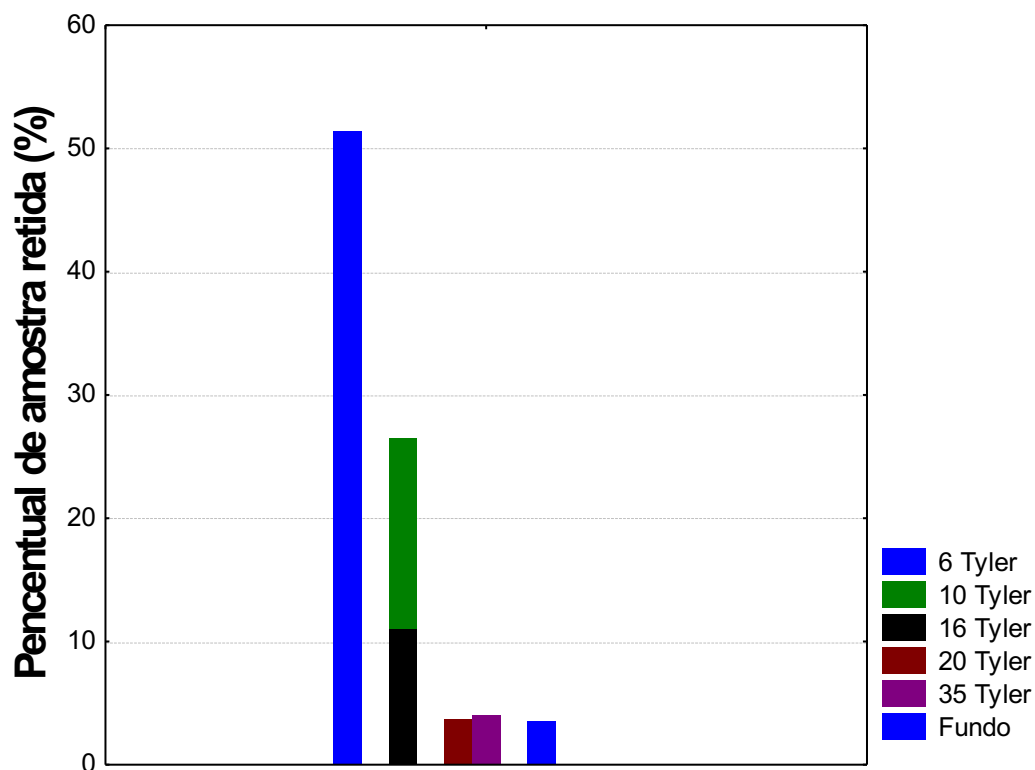
Para caracterizar as partículas da biomassa seca sem pré-tratamento físico foi utilizado o teste de granulometria com as peneiras moleculares e o resultado obtido é mostrado qualitativamente na Figura 15 e quantitativamente na Figura 16.

Figura 15: Imagens das peneiras com o material retido no peneiramento.



Fonte: Próprio autor

Figura 16: Histograma de análise da granulometria do resíduo da pamonha.



Observando as Figuras 15 e 16 é nota-se uma amostra muito heterogênea, onde na peneira de 6 Tyler encontra-se grãos maiores e alguns aglomerados do material, na de 10 Tyler concentra-se pedaços prováveis da casca do milho, na de 16 Tyler partículas menores prováveis da casca, na de 20 Tyler e na de 35 Tyler partes ainda menores da biomassa e no fundo, recipiente final de coleta, tem-se um pó bem fino.

Com isso, afim de melhorar a homogeneidade, aumentar a superfície de contato da amostra com os sistemas nos experimentos e facilitar caracterização da biomassa, a amostra foi moída (pré-tratamento físico) e as partículas que ficaram entre as peneiras de 40 e 80 Tyler foram utilizadas nas análises posteriores. Somente na análise de cinzas a amostra utilizada foi *in natura*.

4.2.2. Composição macromolecular.

Na Tabela 5 encontra-se os valores da composição macromolecular da biomassa caracterizada quimicamente conforme item 3.2.3, antes e após o pré tratamento, bem como valores obtidos por estudos semelhantes.

Tabela 5: Composição percentual de resíduos de milho

| Composição macromolecular | Amostra sem pré tratamento (Próprio autor) | Amostra com pré tratamento (Próprio autor) | Palha <i>in natura</i> (Santos, 2014) | Palha (Casara et al, 2017) | Palha (Ramos e Paula et al, 2014) | Folha (Casara et al, 2017) | Folha (Ramos e Paula et al, 2014) |
|----------------------------------|---|---|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| Extrativos | 21,83 ± 1,63% | --- | 11,60 ± 0,50 | 22,61 ± 2,54 | 5,85 | 25,46 ± 2,17 | 10,51 |
| Lignina Total | 17,07 ± 0,26% | | 14,00 ± 0,10 | 11,03 | 9,29 | 18,93 | 19,26 |
| α -celulose | 23,25 ± 1,59% | 18,48 ± 0,71% | 36,70 ± 0,20 | 11,51 | ---- | 11,56 | ---- |
| Hemicelulose | 54,93 ± 2,95% | 14,34 ± 1,01% | 34,20 ± 0,10 | 0,27 | ---- | 0,17 | ---- |
| Holocelulose | 71,52 ± 1,53% | 31,8 ± 1,70% | ---- | ---- | 83,23 | ---- | 66,70 |
| Cinzas | 0,79 ± 0,00% | | 2,34 ± 0,30 | 3,15 ± 0,13 | 1,58 | 5,79 ± 0,12 | 3,53 |
| Amido | 6,08 ± 0,01% | 6,22 ± 0,33% | ----- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Proteína | 10,60 ± 0,43% | | 4,90 ± 0,00 | ---- | ---- | ---- | ---- |

É possível observar nitidamente a diminuição da α -celulose, hemicelulose e holocelulose com o uso do pré-tratamento, confirmando a eficiência deste, que apresentou um rendimento mássico de $49,45 \pm 0,89\%$. Esse fato também pode ser verificado levando em consideração os resultados de caracterização de outros trabalhos com resíduos do milho, como a palha, haste, folha e espiga, como o estudo de Rocha et al. (2016). Tem-se que o resíduo da produção de pamonha se assemelha a palha do milho, resultados observados nos trabalhos de Ramos e Paula et al. (2011), Santos (2014) e Casara et al. (2017), apresentados na Tabela 5.

O resíduo da pamonha apresentou (Tabela 5) valores de extrativos iguais a $21,83\% \pm 1,63$, os quais se aproximam dos valores para palha do milho no trabalho de Casara et al (2017) que obteve a quantidade de $22,61\% \pm 2,54$.

O teor de lignina total, $17,07\% \pm 0,26$, encontrado na biomassa do presente trabalho, pode ser comparado ao valor encontrado por Casara et al (2017) para folhas de milho, 18,93%. Os teores de hemicelulose e α -celulose (Tabela 5) quando comparados apresentam uma divergência quanto a outros resíduos de milho, representando a particularidade do resíduo da pamonha.

O resíduo da pamonha apresentou baixa quantidade de cinzas $0,79 \pm 0,004\%$, quando comparado com os resultados dos estudos apresentados na Tabela 5, o que indica ser um material que possui baixo teor de minerais.

A quantidade de amido presente no resíduo da pamonha (Tabela 5) de $6,22 \pm 0,331$ mostrou-se interessante pela possibilidade deste se tornar açúcares fermentescíveis com o processo de hidrólise da biomassa.

4.2.3. Açúcares

Após a realização da hidrólise ácida na etapa de caracterização da amostra (item 3.2.3.9.1) e quantificação da lignina, foi possível quantificar os carboidratos estruturais. As amostras foram analisadas por CLAE e as concentrações de açúcares obtidas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6: Teores de açúcares.

| Açúcares | g/g de biomassa |
|-----------------|------------------------|
| Glicose | $0,43 \pm 0,00$ |
| Xilose | $0,16 \pm 0,00$ |
| Arabinose | $0,07 \pm 0,01$ |
| Total | $0,66 \pm 0,01$ |

Nota-se que a amostra apresenta pouca quantidade de açúcares livre para a fermentação, o que requer uma hidrólise eficiente para obtenção de maiores concentrações desses açúcares, principalmente pela quantidade de amido e celulose apresentada na Tabela 5.

4.2.4. Análise elementar

Os resultados obtidos pela análise elementar estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado da análise elementar

| %C | %H | %N | %S |
|-------|------|------|------|
| 43,32 | 6,62 | 1,85 | 1,00 |

Comparando os valores da análise elementar da biomassa do resíduo da pamonha de milho apresentada na Tabela 7 com os valores do trabalho de Ramos e Paula, et al, 2011, apresentados na Tabela 8, a biomassa do presente trabalho apresenta teores de carbono e hidrogênio condizentes com amostras de milho e valores de nitrogênio e enxofre maiores que os encontrados em outras partes do milho, provavelmente pela amostra apresentar maior teor de proteína (Tabela 5).

Tabela 8: Análise elementar das partes do milho (RAMOS E PAULA et al, 2011)

| Material | %C | %H | %N | %S |
|----------|------|-----|-----|-----|
| Tronco | 45.6 | 6.5 | 0.9 | 0.3 |
| Folha | 45.4 | 6.8 | 0.9 | 0.3 |
| Palha | 44.8 | 6.8 | 0.3 | 0.1 |
| Sabugo | 45.5 | 6.7 | 0.5 | 0.3 |

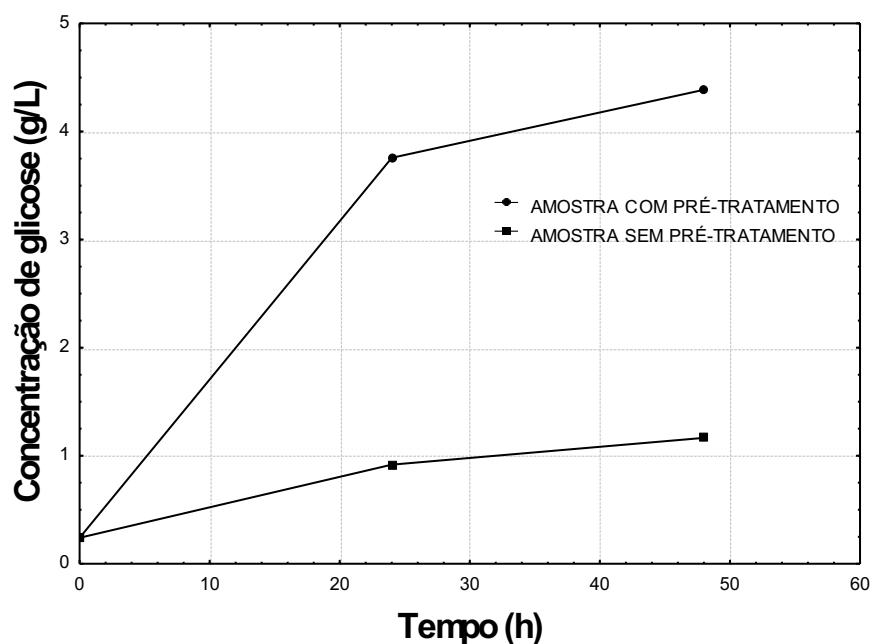
4.3.Hidrólise enzimática da biomassa

Os testes preliminares influenciam diretamente o estudo estatístico da hidrólise, que visa encontrar a melhor condição para o aproveitamento proposto da biomassa em questão. Os resultados foram obtidos e analisados pela concentração de glicose e conversão da biomassa em glicose apresentada no final da reação.

4.3.1. Estudo da influência do pré-tratamento na hidrólise da biomassa por enzimas celulolíticas

O teste (Item 3.2.5) foi realizado para verificar o perfil de hidrólise, sob a ação do complexo enzimático Accellerase® 1500, utilizando a biomassa sem e com pré-tratamento ácido, indicado na Figura 17.

Figura 17: Teor de glicose (g/L) em resíduo com e sem pré tratamento obtido pela ação da Accellerase® 1500



O resíduo pré-tratado apresentou uma quantidade significativa no valor da conversão em glicose, sendo cerca de 4 vezes maior que o resíduo sem pré-tratamento, o que mostra que os estudos devem seguir com o material tratado, o que acontece com a maioria dos trabalhos que utilizam resíduos agroindustriais para a obtenção de açúcares fermentescíveis, pois o pré-tratamento rompe as barreiras protetoras da parede celular da biomassa disponibilizando os carboidratos da mesma (RAMOS E PAULA, et al., 2011; SANTOS, 2014; SOUZA, 2016; CASARA et al., 2017).

4.3.2. Efeito da concentração de enzimas celulolíticas e do tempo de hidrólise na sacarificação da biomassa

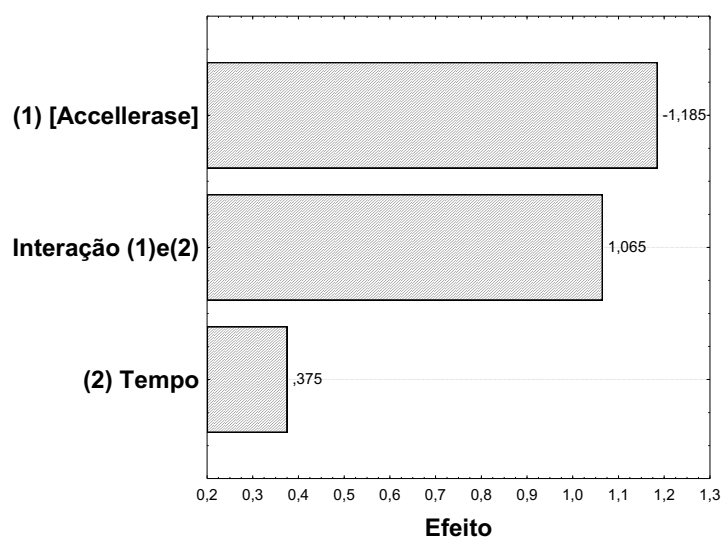
Para prosseguir com a hidrólise foi necessário verificar a concentração de complexo enzimático celulolítico (Accellerase® 1500) mais eficiente na etapa de sacarificação da amostra. Os resultados foram obtidos e analisados através da conversão da celulose em glicose ao final dos tempos de hidrólise, os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do estudo do planejamento fatorial.

| Variáveis | | Resposta |
|-------------------------------------|-----------|-----------------------------|
| Accellerase® (FPU/g de biomassa) | Tempo (h) | Conversão em Glicose (%) |
| 10 (+1) | 48 (+1) | 7,41 |
| 10 (+1) | 24 (-1) | 5,97 |
| 20 (-1) | 48 (+1) | 8,22 |
| 20 (-1) | 24 (-1) | 7,53 |

Os resultados acima mostram que a concentração de Accellerase® de 20 FPU/g de biomassa obteve maior conversão de celulose em glicose nos dois tempos estudados e o gráfico de Pareto da Figura 18 mostra quão maior é a significância da quantidade de enzima frente ao tempo. Observa-se também que a concentração de glicose não aumentou significativamente dobrando o tempo de hidrólise, utilizando a maior concentração de enzima, assim o trabalho seguiu utilizando 20 FPU/g de biomassa de concentração desta enzima.

Figura 18: Gráfico de Pareto para planejamento fatorial



4.3.3. Uso das enzimas celulolíticas e amilolíticas na hidrólise da biomassa

O resultado da caracterização mostrou que a biomassa apresenta um teor considerável de amido, que não é um açúcar diretamente fermentescível. Por isso, para aproveitamento máximo dos açúcares deste resíduo, é necessário também realizar a hidrólise do amido. Nesta

etapa do trabalho, a partir dos dados da literatura (XU et al., 2018) para hidrólise enzimática de amido, foi realizado um estudo para avaliar o comportamento da etapa de sacarificação com os complexos enzimáticos celulolíticos e amilolíticos simultâneos e separados.

Os resultados foram expressos em conversão de celulose e amido à glicose (%). Nestes testes, foram mantidas as mesmas condições de gelatinização e liquefação do amido apresentadas no item 3.2.6. A Tabela 10 apresenta os resultados das conversões em glicose a partir da biomassa obtidas após os períodos de hidrólises.

Tabela 10: Conversão em glicose após as etapas de hidrólise utilizando os complexos enzimáticos simultâneos e separados.

| | Conversão em Glicose (%) |
|---|---------------------------------|
| Inicial | 4,38 |
| Gelatinização | 4,71 |
| Liquefação (Liquozyme) | 4,52 |
| Passo 1 -Sacarificação (AMG) | 40,82 |
| Passo 2 - Sacarificação (Accell após AMG) | 51,15 |
| Sacarificação Simultânea (AMG + Accell) | 68,64 |

Os valores da conversão em glicose foram obtidos em todas as etapas do processo. Como as etapas de gelatinização e liquefação foram mantidas em todos os testes, observa-se pelos resultados que houve um aumento considerável de glicose após a etapa de sacarificação utilizando enzimas separadas (Passo 1 e 2) e após a sacarificação utilizando as enzimas simultaneamente.

Os valores apresentados pelo teste acima mostram que a sacarificação com apenas a AMG (Passo 1) apresentou, como esperado, um menor valor de conversão em glicose, 48,82% em comparação a obtida pelo próximo passo que constituiu o Passo 2, aumentando mais 24 horas e utilizando o outro complexo enzimático Accellerase.

Quando compara-se os resultados das concentrações de açúcares obtidas após o Passo 2 da sacarificação em etapas separadas com a sacarificação simultânea dos dois complexos enzimáticos observa-se um aumento de concentração de glicose neste segundo processo de sacarificação, cerca de 17,49% a mais de conversão em glicose. Assim, o resultado indica ser mais favorável a utilização de complexos enzimáticos simultaneamente para a sacarificação,

pois a concentração de glicose ao final do Passo 1 pode ter inibido as celulases, que começaram a hidrólise com uma velocidade reduzida, que diminuiu os tempos e o custo do processo.

Lesiecki et al. (2012) realizaram experimentos semelhantes, utilizando complexos enzimáticos celulolíticos, amilolíticos e pectinolíticos, obtendo uma eficiência de 90% quando utilizados simultaneamente na hidrólise.

Mithra, et al. (2018) estudaram a hidrólise de materiais lignocelulose-amidos para hidrólise e fermentação separadas e simultâneas resultando em um maior teor de etanol (g/L) para biomassas pré-tratadas com ácido diluído e fermentadas separadamente.

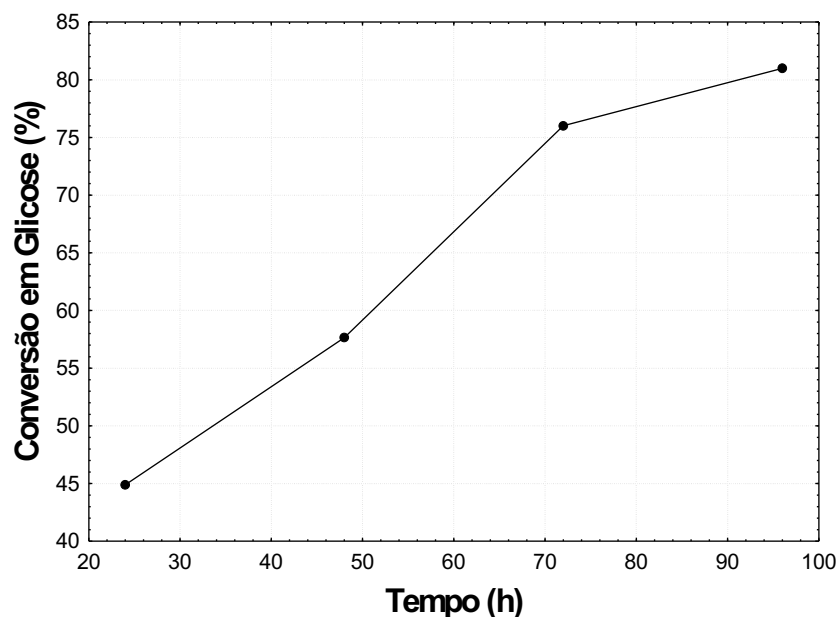
4.3.4. Estudo de tempo de sacarificação utilizando enzimas celulolíticas e amilolíticas

Nas amostras pré-tratadas, após o processo de gelatinização e liquefação, foi utilizado o complexo enzimático Accellerase® na concentração de 20 FPU/g de biomassa e 2,5 µL/mL AMG® simultaneamente, para avaliar o tempo de reação de sacarificação em 24h, 48h, 72h e 96h.

A Figura 19 apresenta um gráfico obtido a partir das conversões do amido e da celulose presentes no resíduo trabalhado em glicose das soluções de hidrólise ao final de cada tempo de sacarificação.

Com base nos resultados da Figura 19, a quantidade de glicose obtida após a etapa de sacarificação da biomassa pré-tratada aumenta com o aumento do tempo de sacarificação. O resultado obtido após o período de 96h de sacarificação apresentou um aumento de conversão de apenas 4% a mais em relação ao de 72h, assim optou-se pelo menor tempo nos estudos subsequentes (SOUZA, 2016; SANTOS, 2017; NREL), tempo este, eficiente em promover a liberação de açúcares fermentescíveis pós-hidrólise.

Figura 19: Conversão da biomassa em glicose (%) após tempo de sacarificação



4.4. Delineamento Composto Central Rotacional

Um Delineamento Composto Central Rotacional DCCR foi proposto para estudar a influência da quantidade de biomassa (X1), do pH (X2) e da temperatura (X3) na sacarificação do resíduo da pamonha pré-tratado, gelatinizado e liquefeito utilizando os complexos enzimáticos celulolíticos e amilolíticos simultaneamente, objetivando o aumento da conversão do material lignocelulósico e do amido em glicose. Os resultados de conversão variaram de 33,56% a 100%, conforme a Tabela 11.

É possível observar que os maiores valores de conversão em glicose obtidos foram nos experimentos 8, 14 e 9 que correspondem respectivamente a: 80,89%, 92,33% e 100,00%. O menor valor de conversão foi 33,56%, no experimento 11, sendo a concentração de biomassa de 15%, o pH 2,61 e temperatura 45°C. Nos experimentos 15, 16 e 17 (pontos centrais), com uma concentração de biomassa de 15%, o pH 4,8 e temperatura 45°C obteve-se resultados aproximados, indicando uma boa reprodutibilidade dos dados.

Os resultados experimentais de conversão do amido e da celulose do material em glicose foram ajustados por regressão múltipla, utilizando o software Statistica®7.0. Na Tabela 12 são apresentados os coeficientes de regressão obtidos através dos resultados do DCCR. Com exceção dos fatores biomassa e temperatura quadráticos e a interação do pH e temperatura (X2

X3), todos os demais parâmetros do modelo foram significativos, podendo-se elaborar um modelo com as variáveis codificadas (Equação 3, 4 e 5):

$$Y1 = 71.93 - 11.52(X1) + 5.08(X2) - 9.69(X2)^2 + 8.68(X3) + 4.49(X1X2) + 4.76(X1X3)$$

(Equação 10)

Tabela 11: Matriz do DCCR com os valores de conversão (%) em glicose e sua respectiva concentração (g/L)

| Experimentos | Biomassa (%) X1 | PH X2 | T (°C) X3 | Conversão (%) | Concentração de glicose (G/L) |
|---------------------|------------------------|--------------|------------------|----------------------|--------------------------------------|
| 1 | 7,40 (-1) | 3,5 (-1) | 36 (-1) | 71,67 | 15,73 |
| 2 | 7,40 (-1) | 3,5 (-1) | 54 (+1) | 79,29 | 17,41 |
| 3 | 7,40 (-1) | 6,1 (+1) | 36 (-1) | 73,09 | 16,05 |
| 4 | 7,40 (-1) | 6,1 (+1) | 54 (+1) | 77,04 | 16,91 |
| 5 | 18,03 (+1) | 3,5 (-1) | 36 (-1) | 38,54 | 23,27 |
| 6 | 18,03 (+1) | 3,5 (-1) | 54 (+1) | 56,99 | 34,41 |
| 7 | 18,03 (+1) | 6,1 (+1) | 36 (-1) | 49,73 | 30,03 |
| 8 | 18,03 (+1) | 6,1 (+1) | 54 (+1) | 80,89 | 48,84 |
| 9 | 3,12 (-α) | 4,8 (0) | 45 (0) | 100,00 | 8,99 |
| 10 | 21,12 (+α) | 4,8 (0) | 45 (0) | 52,40 | 38,50 |
| 11 | 13,04 (0) | 2,61 (-α) | 45 (0) | 33,56 | 13,82 |
| 12 | 13,04 (0) | 6,98 (+α) | 45 (0) | 54,42 | 22,40 |
| 13 | 13,04 (0) | 4,8 (0) | 29,8 (-α) | 58,22 | 23,97 |
| 14 | 13,04 (0) | 4,8(0) | 60,1 (+α) | 92,33 | 38,01 |
| 15 | 13,04 (0) | 4,8 (0) | 45 (0) | 75,65 | 31,14 |
| 16 | 13,04 (0) | 4,8 (0) | 45 (0) | 69,72 | 28,70 |
| 17 | 13,04 (0) | 4,8 (0) | 45 (0) | 70,60 | 29,06 |

Os parâmetros considerados significativos foram aqueles com nível de significância menores que 5% ($p < 0,05$). O coeficiente de determinação R^2 foi de 0,97, demonstra que 97% da variabilidade dos dados pode ser explicada pela Equação (10) obtida por regressão linear dos resultados do DCCR.

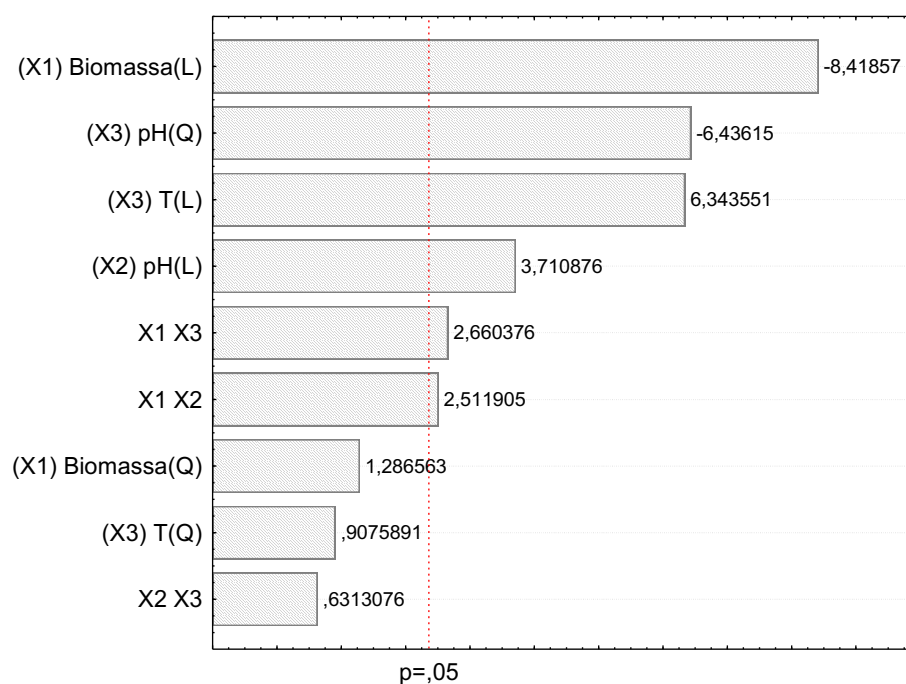
Tabela 12 – Resultados da regressão múltipla com todos os parâmetros significativos para a conversão em glicose

| FATORES | Coefficiente de Regressão | Erro padrão | Nível de significância p |
|---------|---------------------------|-------------|--------------------------|
| Média | 71,93 | 2,913602 | 0,000000 |
| X1 (l) | -11,52 | 2,736504 | 0,000066 |
| X2 (l) | 5,08 | 2,736504 | 0,007546 |
| X2 (q) | -9,69 | 3,011922 | 0,000355 |
| X3 (l) | 8,68 | 2,736504 | 0,000388 |
| X1 X2 | 4,49 | 3,575415 | 0,040285 |
| X1 X3 | 4,76 | 3,575415 | 0,032449 |

$R^2 = 0,97$

O gráfico de Pareto apresentado na Figura 20 confirma os parâmetros significativos e o efeito de cada fator sobre a conversão da biomassa em glicose. Sendo visível o maior efeito apresentado pela concentração da biomassa, sendo que uma maior concentração de biomassa diminui o valor da conversão.

Figura 20 – Gráfico de Pareto da regressão do DCCR em função da conversão em glicose.



A Figura 21 apresenta os valores preditos em função dos observados e a Figura

22 a distribuição dos resíduos em torno do zero, que indica a normalidade para a resposta conversão da biomassa em glicose.

Figura 21: Valores experimentais em função dos valores previstos para conversão de biomassa em glicose

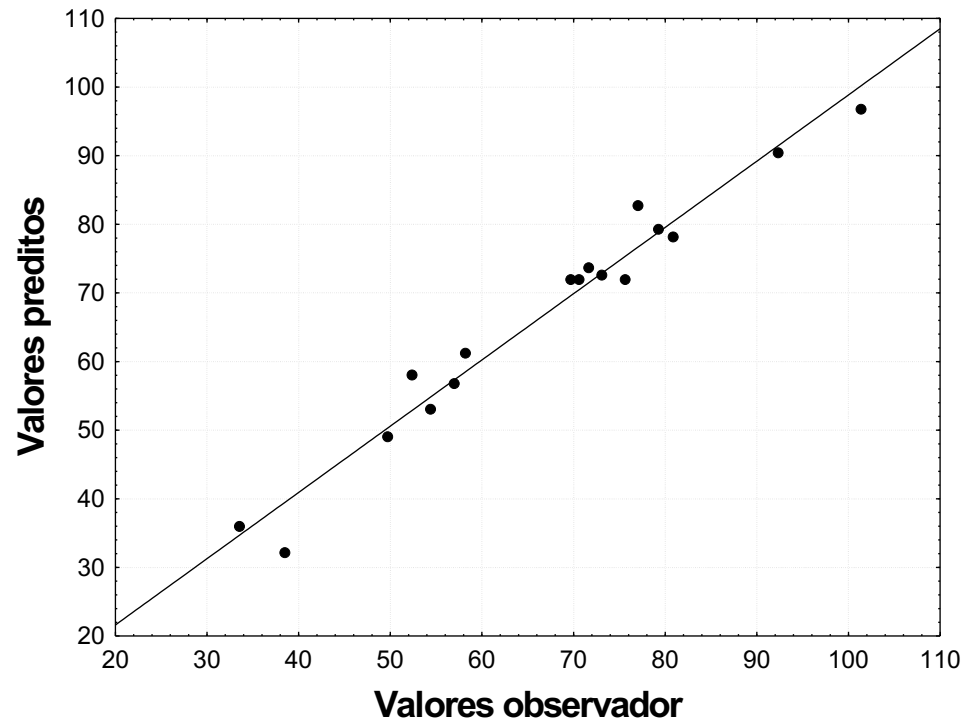
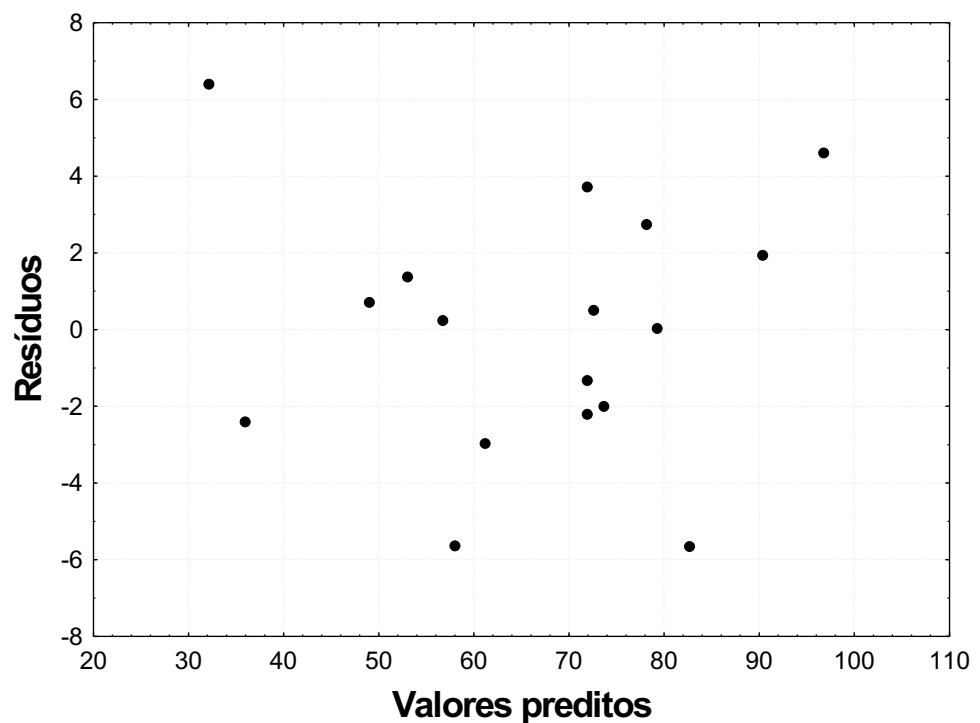


Figura 22: Distribuição dos resíduos em torno do zero



Conforme observado na Figura 21, as respostas experimentais obtidas para a conversão em glicose apresentaram valores bem próximos aos fornecidos pela Equação empírica (10) e na Figura 22, é possível verificar que a distribuição dos resíduos esta aleatoriamente em torno do zero, não apresentando tendência quanto à sua distribuição.

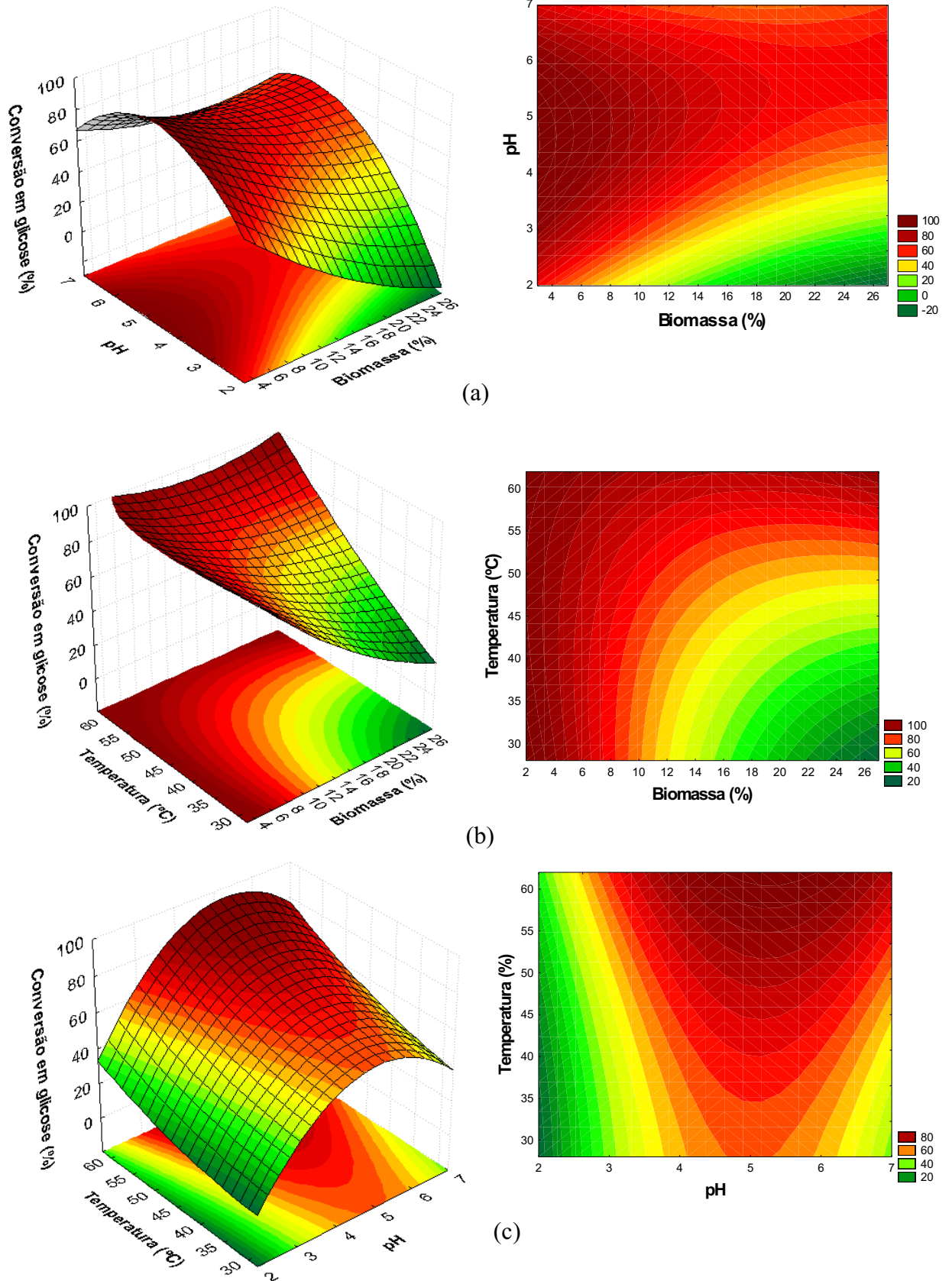
Com o modelo obtido da regressão múltipla do DCCR, foi possível construir as superfícies de resposta e verificar a influência da quantidade de biomassa, do pH e da temperatura na conversão do amido e da celulose em glicose. As superfícies de resposta e as curvas de contorno estão representadas na Figura 23.

Pelas superfícies de respostas (Figura 23) é possível observar que as melhores conversões em glicose foram obtidas com a concentração de biomassa de menor valor, pH entre o ponto central e o valor do nível superior e temperaturas mais altas. De acordo com a Figura 23 (b) a temperatura, utilizando baixas concentrações de biomassa, não influencia na conversão, mas observando as Figuras 23(a) e 23(c) fica claro que temperaturas maiores favorecem os resultados.

Para maximizar a conversão em glicose, o uso da baixa concentração de biomassa (3,12%) resulta em uma baixa concentração de glicose no final da hidrólise de 8,99 g/L (Tabela 11) o que torna, em um processo industrial, inviável economicamente. Como o presente trabalho foi realizado em escala laboratorial utilizando erlenmeyers, acredita-se que se for realizado em condições de processo industrial, com biorreatores de maior volume, estes podem auxiliar no aumento da conversão com uma maior concentração de biomassa, pois no biorreator a transferência de massa é facilitada pelo tamanho e agitação permitindo maior contato da enzima com o substrato (biomassa) (SALLES, 2013). Ao analisar as figuras, ainda é possível utilizar um valor de biomassa maior e alcançar conversões maiores empregando-se a temperatura adequada, que a Figura 23(b) mostra que deve próxima do ponto axial superior. de 60,1°C (PARAZZI, 2017).

A fim de se obter o ponto estacionário que maximiza a resposta de conversão em glicose, implementou-se a Equação 10 no *software* MATLAB (Math Works Inc). Os valores encontrados para a mais alta resposta foram concentração de biomassa 3,12%, pH 4,59 e temperatura de 29,8°C. Porém, visando uma maior concentração de glicose no final do processo de hidrólise implementou ao modelo a concentração da biomassa em 18,03%, pH 5,45 e 60°C e obteve uma conversão de 91,69%. Para a validação do modelo empírico foi realizado três experimentos nestas condições obtendo a conversão de 94,51±1,60%, sendo muito próximo ao valor predito pelo modelo.

Figura 23: Superfícies de resposta e curvas de contorno para conversão em glicose em função da biomassa e pH (a), da biomassa e temperatura (b) e do pH e temperatura (c).



Carvalho (2016), estudou a hidrólise, com o complexo enzimático Cellic Ctec 2[®], de resíduos lignocelulósicos do milho, a palha e o sabugo, analisando a quantidade de biomassa (1g e 5g) e o tempo de hidrólise (24h e 48h). Seu melhor resultado (30,98 g/L de açúcar redutor) foi obtido para a palha do milho quando a concentração de biomassa estava em maior quantidade e o tempo em 48h. Como apresentado no item 4.2.2, o resíduo analisado no presente trabalho se assemelha a palha de milho, o que comprova que maiores concentrações de biomassa, em tempos maiores resultam em uma maior concentração de açúcares fermentescíveis.

Nos estudos de Santos (2014), no qual foi utilizado 1 g de biomassa (palha e sabugo de milho) pré-tratados com 0,5% de H₂SO_{4aq} à 120°C por 15 minutos, utilizando o coquetel enzimático Accellerase[®] 1500 à 50°C, 150 rpm por 72hs obteve concentração de açúcares redutores de 19,6g/L e 6,1g/L para a palha e sabugo, respectivamente. Um valor abaixo do obtido neste trabalho, onde a temperatura utilizada (60°C) e maior quantidade de biomassa (18,03%) influenciaram positivamente no aumento da quantidade de glicose.

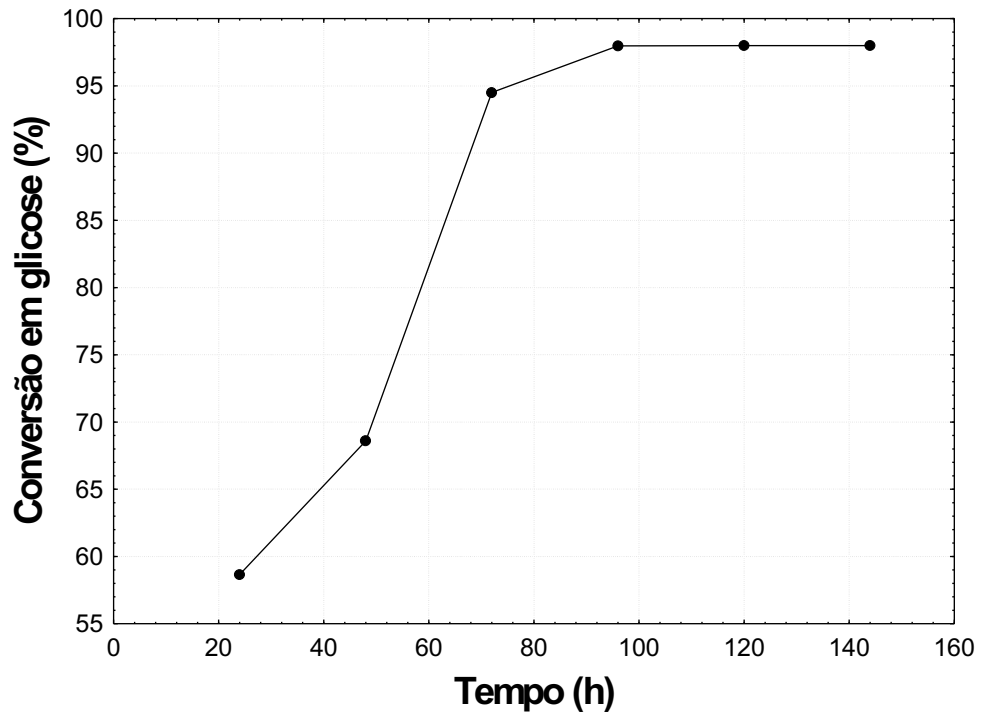
O resíduo da pamonha também se mostra mais promissor do que com o bagaço de cana-de-açúcar estudado por Gomes (2015). O autor utilizou o pré-tratado com 0,5% de H₂SO_{4aq} à 120°C por 15 minutos e para o processo de hidrólise usou 1g de bagaço e 1mL de Cellic Ctec 2[®] à 50°C, 150rpm por 72hs obtendo 13,70g/L de ART.

Cinelli (2012) estudou extratos enzimáticos produzidos a partir da torta do babaçu avaliando a sacarificação simultânea à fermentação da farinha de babaçu, composta em sua maioria de amido granular. Obteve como resultados a agitação mecânica, favorecendo a homogeneidade do sistema, a carga enzimática e de substrato e a temperatura como efeito positivo sobre a conversão de glicose (quanto maior os valores, maior a conversão) sendo que ao final foi alcançado 87,0% de conversão em glicose no tempo de 72h.

4.5. Análise do tempo de sacarificação condição de validação do modelo empírico do DCCR

A Figura 24 apresenta os resultados da relação do tempo de sacarificação do processo de hidrólise com a conversão em glicose utilizando 18,03% de biomassa, pH 5,45 e temperatura controlada em *Shaker* de 60°C, condições de validação do modelo do DCCR.

Figura 24: Conversão da glicose (%) após tempo de sacarificação.



É possível observar que a conversão aumentou apenas 3,47 pontos percentuais de 72h para 96h, confirmando os resultados do teste preliminar apresentado no item 4.3.4. Após o tempo de 96h observa-se uma estabilidade no percentual de conversão. Wangpor et al. (2017) encontrou melhores resultados em seu trabalho, quando estudou a hidrólise do amido da mandioca, no tempo de 72h, utilizando uma carga de sólido de 30% (m/v).

Silva (2015), avaliou a hidrólise-fermentação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado afim de obter maior concentração de açúcares fermentescíveis e, conseqüentemente, maior quantidade de etanol. Neste trabalho os melhores resultados foram alcançados com uma maior carga de substrato (15%) e um maior tempo (72h) para hidrólise e fermentação simultâneas.

5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos ao longo do trabalho, é possível dizer que o resíduo da fabricação da pamonha possui características importantes como um bom fornecedor de açúcares fermentescíveis. Por apresentar em sua composição lignocelulósicos e amido, proporcionou um interessante estudo da hidrólise enzimática utilizando os coquetéis enzimáticos específicos para cada componente de maneira simultânea, resultando em um inovador e efetivo processo para a conversão dessa biomassa em glicose.

A região do Alto Paranaíba, onde o trabalho foi desenvolvido, é uma região onde o plantio do milho e a fabricação de pamonha é muito comum. Assim, o resultado desse trabalho agrega valorização de um resíduo da região de desenvolvimento do presente trabalho, uma vez que possibilita aos produtores da iguaria uma outra destinação ao resíduo produzido durante o processo de fabricação. Sendo assim, pode-se concluir que:

- A caracterização do resíduo apresentou resultados expressivos quanto as concentrações de lignina, hemicelulose, celulose e amido, que permitiram classificar o material como uma fonte para o estudo da hidrólise de amido e celulose simultaneamente;
- A biomassa submetida ao pré-tratamento com ácido sulfúrico proporcionou uma maior conversão em glicose do resíduo em quatro vezes;
- A utilização de complexos enzimáticos celulolíticos e amilolíticos simultaneamente na etapa de hidrólise promoveu melhores resultados quando comparado ao uso separado destas enzimas; e o tempo com maior viabilidade foi de 72h de reação.
- Com o estudo do delineamento composto central rotacional (DCCR) foi possível determinar condições que maximizam a resposta de conversão da biomassa em glicose, sendo que experimentos utilizando 18,02% de biomassa, 5,45 de pH e 60°C proporcionaram $94,51\% \pm 1,60$ de conversão.
- O modelo empírico obtido foi validado experimentalmente apresentando uma diferença de apenas 2,8 pontos percentuais, dentro do MATLAB.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo para aumentar as concentrações de açúcares redutores nos resíduos hidrolisados
- Estudo da fermentação alcóolica dos resíduos simultaneamente com a hidrólise;
- Estudo da fermentação alcóolica dos resíduos após o processo de hidrólise e o aumento da concentração de açúcares disponíveis para aumentar a concentração de etanol produzido.

AGRADECIMENTOS

À Fapemig pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio do projeto Demanda Universal APQ-02079-16.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Biocombustíveis no Brasil**, 2015. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>. Acesso em: 23 de Dezembro de 2016.

AOAC. **Official Methods of Analysis of The Association Analytical Chemists**. 18.Ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 4, 2010. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-4>

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. Progress. In: **Energy and Combustion Science**. v. 34, n. 25, p. 551-553, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2007.11.001>

BAUDEL, H. M. **Pré-Tratamento e Hidrólise**. In: III Workshop tecnológico sobre Hidrólise para a produção de etanol. Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol, São Paulo - SP, 2006.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termo analíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. (Mestrado). UEPG, Ponta Grossa, 2008.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood chemistry**. New York: Interscience, v. 2. 1967. 496p.

BULEON, A., COLONNA, P., PLANCHOT, V. e BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.23, n.2, p.85-112. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00040-3)

CABRAL, A. C., THEODOROVITZ, A. V., SOUZA, S. N. M., JUNIOR, A. M., CABRAL, C. Milho (*Zea mays*) uma cultura energética. **Acta Iguazu**. Cascavel, v1, n.4, p. 47-54, 2012.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, 15p, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>

CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrates. Research**, v. 337, p. 1291-1296, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00134-9)

CARDORNA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4756-4766, 2010.

CARLI, C. M. **Hidrólise e fermentação do bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada para produção de etanol 2G**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos – SP, 2011.

CARVALHO, M. L. **Estudo Cinético da Hidrólise Enzimática de Celulose de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2011. 102p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

CARVALHO, L. L. M. **Estudo da Hidrólise e Fermentação dos Resíduos de Milho (*Zea Mays*) Para a Produção de Etanol de Segunda Geração**. 2016. 39P. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

CASARA, V. P.; DRESCH, A. P.; FOGOLARI, O.; MIBIELLI, G. M. e BENDER, J. P. Caracterização química do resíduo lignocelulósico da produção de milho. **Jornada Científica Tecnológica** – UFFS, 2017.

CASTRO, A. M. **Produção e Propriedades de Celulases de Fungos Filamentosos obtidas a partir de Celulignina de Bagaço de Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp*)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

CINELLI, B. A. **Produção de Etanol a partir da Fermentação Simultânea à Hidrólise do Amido Granular de Resíduo Agroindustrial**. 2012. 200p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

CORRADINI, E., LOTTI, C., MEDEIROS, E. S. D., CARVALHO, A. J. F., CURVELO, A. A. S. e MATTOSO, L. H. C. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, p.268-273. 2005.

DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H. e QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences** p.578-595, Canadá, 2009.

DUPONT. Ficha do produto **Accellerase® 1500**, 2011.

EL-DASH, A. A.; CAMARGO, C. O.; DIAZ, N. M. **Fundamentos da tecnologia de panificação**. São Paulo: Governo do Estado de São Paulo, 1982. 349 p.

FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. New York: Walter de Gruyter, 1984. 613 p.

FERREIRA, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMG 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, 114p, 2010.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*, v. 59, p. 257-268, 1987. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>

GOMES, M. A. **Destoxificação de hidrolisados Lignocelulósicos visando à Obtenção de Etanol 2G**. Dissertação de Mestrado. Univesidade Federal de Alagoas, Maceió. 2015.

GUPTA, R., GIGRAS, P., MOHAPATRA, H., GOSWAMI, V. K. e CHAUHAN, B. Microbial α - amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, n.11, p.1599-1616. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0)

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p.1028–1038, 2007. <https://doi.org/10.1002/bit.21329>

HAMELINCK, C. N., HOOIJDONK, G. V., FAAIJ, A. P. C. Etanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2004.09.002>

HINRICHS, R. A., KLEINBACH, M., REIS, L. B. **Energia e Meio Ambiente**. São Paulo: Cengage Learning. 4ª edição, Cap. 17, p. 623-656, 2010.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, v.45, n.3, p.253-267. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00260-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00260-5)

IMBROISI, B.A. **Uso de bambu acreano *Guadua weberbaueri* Pilger para o desenvolvimento de um carvão funcional em um sistema de baixo custo**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Acre, 2015.

INSTITUTO ADOLF LUTZ (IAL). 2005. *Métodos Químicos para Análise de Alimentos*. 4 ed. São Paulo.

KAHR, H., WIMBERGERA, J., SCHURZA, D., JAGERA, A. Evaluation of the biomass potential for the production of lignocellulosic bioethanol from various agricultural residues in Austria and Worldwide. **Energy Procedia**. (40), p. 146 – 155, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.08.018>

KIM S.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1994 – 2006, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.01.014>

KOWALSKI, R. L.; SHNEIDER, V. S.; MORETTO, J. e GOMES, L. F. S. Produção de etanol de segunda geração a partir de caroço de abacate (*Persea americana* Mill.) **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. v.6, n.4, p. 665-677, 2017. <https://doi.org/10.5380/rber.v6i4.49073>

KURTH, E. F.; RITTER, G. J. Holocellulose, total carbohydrate fraction of extractive-free maple wood its isolation and properties, **Ind. Eng. Chem. Madison**, v. 25, p. 1250, 1933.

<https://doi.org/10.1021/ie50287a016>

LANGAN, P., PETRIDIS, L., O'NEILL, M., PINGALI, S. V., FOSTON, M., NISHIYAMA, Y., SCHULZ, R., LINDNER, B., HANSON, B. L., HARTON, S., HELLER, W. T., URBAN, V., EVANS, B. R., GNANAKARAN, S., RAGAUSKAS, A., SMITH, J. C., DAVISON, B. H. Common processes drive the thermochemical pretreatment of lignocellulosic biomass. **Green Chemistry**. (16), p. 63 – 68, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3GC41962B>

LESIECKI, M., BIALAS, W., LEWANDOWICZ, G. Enzymatic Hydrolysis of Potato Pulp. **Technol. Aliment.** 11(1), 53-59, 2012.

LI, P., CAI, D., LUO, Z., QIN, P., CHEN, C., WANG, Y., ZHANG, C., WANG, Z., TAN, T., Effect of acid pretreatment on different parts of corn stalk for second generation ethanol production, **Bioresource Technology**, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.077>

LORA, E. E. S., PALACIO, J. C. E., ROCHA, M. H., VENTURINI, O. J., BROCE, L. M. O futuro dos biocombustíveis: biorrefinarias e biocombustíveis a partir de algas e células microbianas. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 16, p 1035, vol 2, 2012.

LUCIA, L. A. Lignocellulosic biomass: a potential feedstock to replace petroleum. **BioResources**. 3(4), p. 981-982, 2008.

LYND, L.R.; WEIMER, P.L.; van ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 66, n.3, p.506-577, 2002. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 9, p 426- 428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acessado em: 23 de Dezembro de 2016.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. Cenário de Oferta de Etanol e Demanda do Ciclo Otto 2018-2030. Rio de Janeiro, Maio, 2018.

MITHRA, M. G.; JEEVA, M. L.; SAJEEV, M. S.; PADMAJA, G. Comparison of ethanol yield from pretreated lignocellulo-starch biomass under fed-batch SHF or SSF modes. **Heliyon** 4 (2018) e00885. doi: 10.1016/j.heliyon.2018. e00885

NDIMBA, B. K., NDIMBA, R. J., JOHNSON, T. S., SIRISATTHA, W. R., BABA, M., SIRISATTHA, S., SHIRAIWA, Y., AGRAWALI, G. K., RAKWALI, R. Biofuels as a sustainable energy source: An update of the applications of proteomics in bioenergy crops and algae. **Journal of Proteomics**. (93), p. 234 – 244, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.05.041>

NREL. Glossary of Biomass Terms. The National Renewable Energy Laboratory. U.S. Department of Energy: Disponível em: <http://www.nrel.gov/biomass/glossary.html>. Acesso em Setembro, 2017.

NOVOZYME(a). Ficha do produto **AMG® 300**, 2008.

NOVOZYME(a). Ficha do produto **Liquozyme® Supra 2.2X**, 2008.

OATES, C. G. Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. **Trends in Food Science & Technology**, v.8, n.11, p.375-382. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01090-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01090-X)

OBEL, L. B. Putting enzymes to work in bakery applications. **Cereal Foods World**, v. 46, n. 9, p. 396-399, 2001.

OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1549-1558, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

PALACIO, J. C. E., LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J., OLMO, O. A. Biocombustíveis, meio ambiente, tecnologia e segurança. In: LORA, E. E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 1, p 2 - 46, vol 1, 2012.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grao de Milho. (**Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75**). Sete Lagoas, MG: Dezembro, p.6. 2006

PAES, M. C. D., TEIXEIRA, F. F., MARTINS, I. S. Composição Química da Palha de Milho com Qualidade para Artesanato. Disponível em:
<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/30081/1/Composiçao-quimica.pdf>>
Acessado em: 08 de Março de 2018.

PARAZZI, C.; PAPIN, L.; BELLUCO, A. E. de S. Hidrólise enzimática do amido do caldo de cana-de-açúcar na fermentação alcoólica. *Ciência, Tecnologia e Ambiente*. Vol. 5, No. 1, 15-22, 2017. <https://doi.org/10.4322/2359-6643.05104>

PAULY, M.; KEENGSTRA, K. Plant cell wall polymer as precursors for biofuels. *Current Opinion in Plant Biolology*. 13:304-311, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.009>

PERDICES, M. B., ARCAYA, G. E. A., CORAL, D. S. O., MENDOZA, M. A. G.; NUNES, C. L. Bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos pela rota da hidrólise. In: LORA, E. S., VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência. Cap. 8, p 536 - 588, vol 1, 2012.

PHITSUWAN, P; SAKKA, K; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 390-405, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.08.027>

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; PÉREZ-MEJÍA, N.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; COSTA-URDAPILLETA, L.; FOLCH-MALLOL, J. Evaluation of different ignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. **Biodegradation**. 22:565–572, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9428-y>

RABELO, S. C., COSTA, A. C., ROSSEL, C. E. V. Aproveitamento de resíduos industriais. In: SANTOS, F., BORÉM, A., CALDAS, C. **Bioenergia, Açúcar e Álcool: tecnologias e perspectivas**. Viçosa – MG. Cap 17, p 465 – 486, 2010.

RAMOS, L. P. et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded sugarcane bagasse using high total solids and low enzyme loadings. **Bioresource Technol**, v. 175, p. 195-202, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.087>

RAMOS E PAULA, L. E.; TRUGILHO, P. F.; NAPOLI, A.; BIANCHI, M. L. Characterization of residues from plant biomass use in energy generation. **Cerne**, Lavras, v. 17, n. 2, p. 237-246, 2011

ROCHA, M. S. R. S.; SILVA, M. C. S.; PIMENTEL, W. R. O.; ALMEIDA R. M. R. G. Pré-tratamento ácido de resíduos de milho para produção de etanol de segunda geração. **Engevista**, V. 18, n. 2, p. 412-423, 2016. <https://doi.org/10.22409/engevista.v18i2.770>

ROSILLO-CALLE, F. Alimentos versus combustíveis: podemos evitar o conflito? In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P & D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher, Cap. 11, p. 101 – 114, 2010.

RUIZ, H. A. et al. Evaluation of a hydrothermal process for pretreatment of wheat straw-effect of particle size and process conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 88-94, 2011. <https://doi.org/10.1002/jctb.2518>

SAHA, C. B. L.; ITEN, L. B; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 3693–3700, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.04.006>

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recente developments. **3 Biotech**, v. 5, p. 337-353, 2015.

SANTOS, F. A., QUEIRÓZ, J. H., COLODETTE, J. L., FERNANDES, S. A., GUIMARÃES, V. M., REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v.35, n.5, p. 1004 – 1010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SANTOS, M. S. R. **Estudo de Pré-Tratamentos de Palha e Sabugo de Milho Visando a Produção de Etanol 2G**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió - Alagoas, 2014.

SEAPE/MG – SECRETARIA ESTADUAL DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MG. Subsecretaria de Agronegócios. [http://www.reformaagraria.mg.gov.br/imagens/documentos/perfil_milho_jan_2019\[1\].pdf](http://www.reformaagraria.mg.gov.br/imagens/documentos/perfil_milho_jan_2019[1].pdf). Acesso em 23 de janeiro de 2019.

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

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do Bagaço de Cana de Açúcar com Amônia Aquosa para Produção de Etanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – São Paulo, 2011.

SILVA, G. M. Ethanol production for sugarcane using SSF and thermotolerant yeast. **Transactions of ASABE**. V 58(2), 2015.

SJÖSTRÖM, E. *Wood chemistry: fundamentals and application*. London: Academic Press, 1981. 223 p.

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana de açúcar**. Tese de Doutorado (pós-graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, 2016.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis process for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, p. 707-738, 2007.

TORRES, L. M.; LEONEL, M. Avaliação do processo de hidrólise enzimática para obtenção de açúcares a partir de gengibre (*Zingiber officinale*). Botucatu, vol. 25, n.3, 2010, p.68-78

TREVISAN, A. T. A. et al. Produção de etanol a partir de milho com reciclo de levedura. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal (SP), v. 8, Número Especial, 2016.

URBANO, L. H. et al. Estudo cinético e fermentativo do amido de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 13, nº 1, p. 46-55, 2017.

URU, P. M. S. B. Do Milho à Pamonha. Monografia , Universidade Federal de Brasília, 2007.

WANGPOR, J. et al. Bioethanol production of casaba starch by enzymatic hydrolysis, fermentation and ex-situ nanofiltration. **Energy procedia**. 138, p883-888, 2017.

WEICIECHOWSKI, A. L. et al, Acid and enzymatic hydrolysis to recover reducing sugars from Cassava bagasse: a economic study. **Brazilian Archives of biology and technology**. V45, n.3, p393-400, 2002

XU A Y., ZHANG M., ROOZEBOOM K., WANG D., Integrated bioethanol production to boost low-concentrated cellulosic ethanol without sacrificing ethanol yield. *Bioresource Technology* 250 (2018) 299–305.

ZHANG, Y.I.P.; LYND, L.R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulase systems. **Biotechnol. Bioeng**, v. 88, p. 797–824, 2004.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LUI D. Biomassa recalcitrant, Part 1: the chemical composition and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, bioproducts and biorefining**. 6:465-482, 2012.

ZHOU, C. H., XIA, X., LIN, C. X., TONGA, D. S., BELTRAMINIB, J. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chen Soc Rev**. p 5588 – 5617, 2011.

