



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**Faculdade de Engenharia Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos**

**PRODUÇÃO DE CELULASES EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A  
PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**Adam Gonçalves Arruda**

**Patos de Minas**  
**2019**

**Adam Gonçalves Arruda**

**PRODUÇÃO DE CELULASES EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO A  
PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de mestrado acadêmico  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Engenharia de  
Alimentos na Universidade Federal de  
Uberlândia *campus* Patos de Minas  
como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de mestre em  
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Zanella Guidini

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Líbia Diniz Santos

**Patos de Minas**

**2019**

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

---

A779p  
2019 Arruda, Adam Gonçalves, 1992-  
Produção de celulasas em fermentação em estado sólido a partir de  
resíduos agroindustriais [recurso eletrônico] / Adam Gonçalves Arruda. -  
2019.

Orientadora: Carla Zanella Guidini.

Coorientadora: Líbia Diniz Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.357>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Alimentos - Indústria. 2. Resíduos agrícolas. 3. Enzimas -  
Aplicações industriais. 4. Fermentação. I. Guidini, Carla Zanella, 1983-  
(Orient.). II. Santos, Líbia Diniz, 1978- (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos. IV. Título.

---

CDU: 664

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS, EM 19 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:

*Carla Zanella Guidini*

Profª Dra. Carla Zanella Guidini  
Orientadora (PPGEA/UFU)

*Líbia Diniz Santos*

Profª Dra. Líbia Diniz Santos  
Co-orientadora (PPGEA/UFU)

*Maurieleme*

Profª. Dra. Maurieleme Guterres Dalcin  
Professora (ICT/UNIFAL)

*Gilvan Caetano Duarte*

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte  
Professora (INGEB/UFU)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE TABELAS .....	iv
LISTA DE SÍMBOLOS .....	v
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1. Etanol.....	4
2.2. Etanol de segunda geração .....	6
2.3. Resíduos agroindustriais para produção do complexo enzimático .....	7
2.3.1. Bagaço de cana-de-açúcar .....	8
2.3.2. Resíduo do Milho.....	8
2.3.3. Resíduo do Arroz.....	10
2.3.4. Resíduo do Café.....	11
2.4. Fermentação em estado sólido .....	12
2.5. Complexo enzimático: composição e obtenção.....	12
2.5.1. Celulases.....	13
2.5.2. Fermentação alcoólica .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
3.1. Material .....	16
3.1.1. Microrganismos produtores de celulase.....	16
3.1.2. Biomassa .....	16
3.2. Métodos .....	18
3.2.1. Caracterização da biomassa .....	18
3.2.1.1. Preparo das amostras .....	18
3.2.1.2. Análise granulométrica .....	18
3.2.1.3. Determinação de extrativos.....	18
3.2.1.4. Determinação de carboidratos e lignina .....	19
3.2.1.5. Determinação de holocelulose .....	20
3.2.1.6. Determinação de hemicelulose e $\alpha$ -celulose .....	21
3.2.1.7. Determinação de sólidos totais .....	21

3.2.1.8.	Determinação de atividade de água ( $A_w$ ).....	22
3.2.1.9.	Determinação de cinzas .....	22
3.2.1.10.	Determinação de proteínas .....	22
3.2.1.11.	Determinação de extrato etéreo .....	23
3.2.2.	Seleção dos microrganismos .....	24
3.2.2.1.	Preparo do inóculo .....	25
3.2.2.2.	Fermentação em estado sólido .....	26
3.2.2.3.	Extração do complexo enzimático .....	26
3.2.3.	Análise do complexo enzimático .....	26
3.2.3.1.	Celulases .....	26
3.2.4.	Avaliação da fermentação em estado sólido com aeração .....	27
3.2.5.	Avaliação da composição do meio de fermentação .....	28
3.2.6.	Avaliação do tempo de FES com atividade enzimática .....	29
3.2.7.	Avaliação do complexo enzimático na produção de etanol .....	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.1.	Distribuição granulométrica das biomassas .....	31
4.2.	Caracterização química das biomassas .....	33
4.2.1.	Composição de carboidratos na biomassa .....	36
4.2.2.	Composição de sólidos totais, umidade e atividade de água ( $A_w$ ) .....	38
4.2.3.	Análise de extrato etéreo e proteínas .....	39
4.3.	Seleção dos microrganismos .....	41
4.4.	Avaliação da fermentação em estado sólido com aeração forçada .....	44
4.5.	Avaliação da composição do meio de fermentação .....	45
4.6.	Avaliação do tempo de FES com atividade enzimática .....	48
4.7.	Avaliação da produção de Etanol .....	48
5.	CONCLUSÕES .....	51
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8.	APÊNDICE .....	64

## RESUMO

O setor energético é um dos campos de grande relevância econômica no Brasil e em diversos países no mundo. Nesse sentido, os combustíveis fósseis são os mais empregados, mas geram grandes impactos ambientais, além de serem uma fonte não renovável. Para substituir e suprir a grande demanda por combustíveis, o etanol de segunda geração, que é produzido a partir de resíduos ou subprodutos, tem sido uma alternativa promissora. No entanto, as usinas possuem desafios para tornar viável esta operação em larga escala. A biomassa utilizada como substrato é composta por um complexo de celulose, hemicelulose e lignina, sendo a lignina uma macromolécula que confere rigidez e impermeabilidade às células vegetais. Após a etapa de pré-tratamento, responsável pela quebra da lignina, a biomassa requer a hidrólise da celulose e da hemicelulose para disponibilizar os açúcares fermentescíveis para a fermentação. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar oito cepas de fungos para produção de complexo enzimático através de fermentação em estado sólido e estudar as melhores condições de processo (sistema de aeração forçada, composição do meio e tempo de fermentação) para a produção de celulases utilizando resíduos agroindustriais de farelo da casca do milho, bagaço de cana-de-açúcar, farelo da palha do arroz e resíduo da torra e trituração do café. As melhores condições de produção das celulases foram alcançadas com sistema sem aeração forçada, composição de substrato com 40% de bagaço de cana, 30% de farelo da casca do milho e 30% de resíduo do café e tempo de 72 horas de fermentação, utilizando os microrganismos *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei*, obteve-se atividade enzimática (FPase)  $0,081 \pm 0,002$  FPU/mL e  $0,080 \pm 0,002$  FPU/mL, respectivamente. Com a utilização do complexo enzimático obteve-se uma produção de etanol celulósico para *Penicillium oxalicum* de  $3,13 \pm 0,21$  g/L e *Trichoderma reesei* de  $3,59 \pm 0,32$  g/L de etanol, em fermentação batelada com *Saccharomyces cerevisiae* em 48 horas a 35°C.

Palavras-chave: resíduos agroindustriais, enzimas, fermentação em estado sólido.

## ABSTRACT

The energy sector is one of the fields of great economic importance in Brazil and in several countries in the world. In this sense, fossil fuels are the most used, but generate large environmental impacts, besides being a non-renewable source. Second-generation ethanol, which is produced from waste or by-products, has been a promising alternative to replace and supply the great demand for fuels. However, the plants have challenges to make this operation viable on a large scale. The biomass used as substrate is composed of a complex of cellulose, hemicellulose and lignin, with lignin being a macromolecule that gives rigidity and impermeability to plant cells. After the pre-treatment stage, responsible for the breakdown of lignin, the biomass requires the hydrolysis of cellulose and hemicellulose to make fermentable sugars available. Thus, the objective of this work was to evaluate eight fungal strains for the production of enzymatic complex through solid state fermentation and to study the best process conditions (forced aeration system, medium composition and fermentation time) for the production of cellulases using agroindustrial residues from corn husk meal, sugar cane bagasse, rice bran meal and roast residue and coffee grinding. The best conditions of cellulase production were achieved with a non-aerated system, substrate composition with 40% sugarcane bagasse, 30% corn husk meal and 30% coffee residue and 72 hours fermentation time using the microorganisms *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma reesei*, enzymatic activity (FPase) was obtained  $0.081 \pm 0.002$  FPU/mL and  $0.080 \pm 0.002$  FPU/mL, respectively. With the use of the enzymatic complex, a cellulosic ethanol production for *Penicillium oxalicum* of  $3.13 \pm 0.21$  g/L and *Trichoderma reesei* of  $3.59 \pm 0.32$  g/L of ethanol was obtained in batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* in 48 hours at 35°C.

Keywords: agroindustrial waste, enzymes, solid state fermentation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Produção mundial de etanol.....	5
Figura 2.2 - Estimativa da produção de cana-de-açúcar no Brasil por região.....	5
Figura 2.3 - Estrutura da biomassa lignocelulósica. ....	7
Figura 2.4 - Comparativo dos principais produtores mundiais de milho 2016/2017. ....	9
Figura 2.5 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose. ....	14
Figura 3.1 - Fluxograma ilustrativo das etapas do trabalho. ....	15
Figura 3.2 - Resíduos utilizados como substrato na FES. ....	17
Figura 3.3 - Etapas na produção do complexo enzimático. ....	24
Figura 3.4 - Sistema de aeração utilizado durante a FES. ....	28
Figura 3.5 - Etapas na produção de etanol com hidrólise simultânea.....	30
Figura 4.1 - Distribuição granulométrica da Farelo da palha do arroz, Bagaço de cana-de-açúcar e Farelo da casca do milho, respectivamente.....	32
Figura 4.2 - Distribuição granulométrica do resíduo da torra e trituração do café.....	32
Figura 4.3 – Placas de Petri dos oitos fungos estudados após 3 dias de cultivo. ....	41
Figura 4.4 - Aspecto do inóculo ao final da preparação.....	42
Figura 4.5 - Fermentação em estado sólido com o inóculo e substrato. ....	42
Figura 4.6 – Aspecto do complexo enzimático. ....	43
Figura 4.7 – Atividade enzimática dos fungos avaliados. ....	43
Figura 4.8 – Influência da aeração forçada durante a FES na atividade enzimática. ....	44
Figura 4.9 - Atividade enzimática da avaliação do processo de gelatinização do farelo da casca do milho utilizando cepa de <i>Penicillium oxalicum</i> . ....	46
Figura 4.10 – Efeito da composição do substrato na atividade enzimática. ....	46
Figura 4.11 - Efeito do tempo de FES com a atividade enzimática.....	48
Figura 4.12 - Produção de etanol por hidrólise simultânea.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Produção de milho do Estado de Minas Gerais 2017.....	10
Tabela 2.2 - Microrganismos comumente empregados para obtenção de enzimas a partir de diferentes substratos lignocelulosicos. ....	13
Tabela 3.1 - Fungos utilizados para produção do complexo enzimático.....	16
Tabela 3.2 - Composição do Meio PDA .....	16
Tabela 3.3 Composição do meio <i>Czapek</i> .....	25
Tabela 3.4 – Composição dos meios de fermentação.....	29
Tabela 4.1 - Caracterização química de biomassa para produção de etanol de segunda geração. ....	33
Tabela 4.2 - Composições de extrativos em % de biomassa. ....	34
Tabela 4.3 - Celulose, hemicelulose e composição de lignina em % de biomassa...	35
Tabela 4.4 - Composição de cinzas em % de biomassa. ....	36
Tabela 4.5 - Concentração de monossacarídeos resultante da hidrólise .....	37
Tabela 4.6 - Composição de carboidratos em% de monossacarídeos .....	38
Tabela 4.7 - Quantidade de Sólidos totais, Umidade e Atividade de Água (Aw) na biomassa. ....	39
Tabela 4.8 - Composição de Gordura e Proteína na biomassa .....	40

## LISTA DE SÍMBOLOS

**CLAE** Cromatografia líquida de alta eficiência

**DNS** Ácido dinitro-salicílico

**E1G** Etanol de primeira geração

**E2G** Etanol de segunda geração

**FES** Fermentação em estado sólido

**FPU** Filter-paper Units

**PDA** Batata glicose agar (Potato dextrose agar)

**NREL** National renewable energy laboratory

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol é uma fonte de energia renovável e combustível alternativo ao uso de combustíveis fósseis, reduzindo problemas ambientais de emissão de dióxido de carbono e outros gases que contribuem para o efeito estufa (BIZZO et al., 2014; UNICA, 2017).

No Brasil, o uso do etanol como combustível iniciou-se no ano 1920 e foi consolidado com o decreto-lei Nº 737 de 1938, que tornou obrigatória a adição de álcool anidro nacional à gasolina. Em 1975, a criação do Programa Brasileiro de Etanol (Pró-álcool) incentivou o setor privado a investir na maior produção nas usinas, alavancando o setor (LEITE; LEAL, 2007). Os benefícios do uso do etanol e a viabilidade econômica mostram que esse modelo não tem sido utilizado apenas no Brasil mas também nos Estados Unidos, que em 2019 aprovou o aumento da mistura de etanol na gasolina, passando de 10% para 15%. No cenário brasileiro, no ano de 2015 a porcentagem de mistura passou de 25% para 27% segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA) (UNICA, 2017; UDOP, 2019).

O etanol também conhecido como etanol de primeira geração (E1G) a partir do caldo da cana-de-açúcar gera um grande volume de resíduos/subprodutos, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar, que correspondem a 25% e 16% da cana inteira, respectivamente (MENDES, et al., 2017). Atualmente, o bagaço de cana-de-açúcar é queimado em usinas para cogear energia elétrica utilizando as caldeiras, embora, também, gerando gases de efeito estufa e partículas em suspensão, enquanto a palha da cana-de-açúcar é deixada no campo. Por outro lado, a produção do etanol de segunda geração (E2G) a partir do bagaço e da palha é um exemplo de alternativa sustentável (MENDES, et al., 2017).

O grande volume de bagaço de cana-de-açúcar gerado no Brasil mostra que esse resíduo é uma fonte promissora de biomassa lignocelulósica devido a sua ampla disponibilidade. O ano safra de 2017/2018 no Brasil teve a produção de 633 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, uma redução de 3,6% com a safra passada. Um dos fatores para a redução é a ocorrência de clima mais chuvoso que reduz a velocidade tanto da colheita como da moagem (CONAB, 2018b).

Outros resíduos podem ser utilizados como fonte de biomassa lignocelulósica como do processamento do milho, o sabugo, o colmo (caule), as folhas e a palha, são matérias primas lignocelulósicas, que apresentam altos percentuais de celulose e hemicelulose, o que os tornam atrativos para a utilização na produção de etanol (SILVA, 2018).

O bagaço de cana-de-açúcar, assim como outras biomassas utilizadas como substrato, é composto por um complexo de celulose, hemicelulose e lignina. A lignina tem compostos não fermentescíveis sendo, portanto, necessário uma etapa de pré-tratamento para romper esse complexo (SANTOS et al., 2012).

Após o pré-tratamento de rompimento da estrutura lignocelulósica, a biomassa requer a hidrólise da celulose e da hemicelulose, liberando os açúcares fermentescíveis, para posterior fermentação, podendo ser utilizados ácidos ou enzimas na operação. Com o uso de hidrólise ácida podem ocorrer reações secundárias devido à baixa especificidade do catalizador ácido. Por outro lado, a hidrólise enzimática tem maior especificidade, mas o grande impasse para a indústria de biocombustíveis é o alto custo para produção destes coquetéis enzimáticos (LUCARINI et al., 2017).

A forma mais empregada comercialmente na sacarificação é a utilização de complexos enzimáticos compostos por celulasas. Estas enzimas são obtidas por fermentação em estado sólido (FES) ou semi-sólido e por microrganismos selecionados. Em sistemas de degradação de biomassa, vários fungos podem ser empregados, os mais comumente usados são o *Trichoderma reesei* e o *Aspergillus niger*. As enzimas desses fungos são de grande interesse industrial, sendo usadas como fonte de celulasas. Essas enzimas podem ser produzidas a partir de diferentes resíduos agroindustriais como substrato (GUPTA, 2016).

Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi avaliar diferentes cepas de fungos para obtenção de complexos enzimáticos a partir de resíduos agroindustriais nas melhores condições para posterior produção de E2G. Os objetivos específicos foram:

- Selecionar a melhor cepa quanto ao potencial hidrolítico para a produção de complexo enzimático em termos de celulase;

- Avaliar a utilização de sistema de aeração forçada durante a FES na produção de complexo enzimático;
- Avaliar a composição do substrato a partir da mistura de diversos resíduos agroindustriais, em diferentes proporções na FES;
- Avaliar a influência do tempo de FES com atividade enzimática;
- Aplicar o complexo enzimático na produção de E2G.

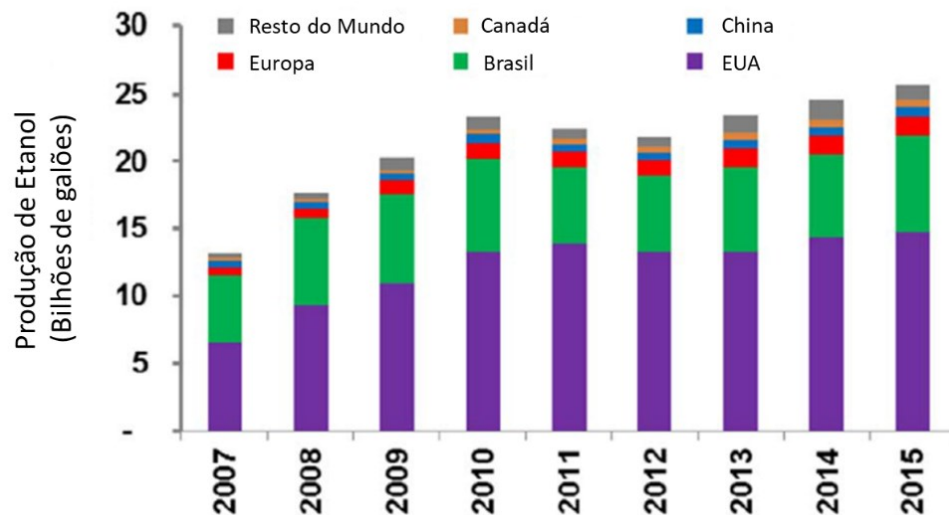
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Etanol

O etanol pode ser obtido a partir de diferentes fontes: cana-de-açúcar, milho, beterraba, mandioca, batata e de outras culturas dependendo do país. Neste contexto, as principais fontes de matéria-prima deste biocombustível são o milho e a cana-de-açúcar que apresentam as maiores produções no mundo (UNICA, 2017).

A produção de E1G, a partir da cana-de-açúcar, possui vantagem em comparação ao milho e a beterraba devido a sua autossuficiência energética no sistema produtivo, a cogeração de energia por meio da queima do bagaço. O consumo energético para produção de etanol de milho é ainda maior quando comparado ao etanol à base de sacarose, uma vez que são necessários passos adicionais para converter o amido em glicose. O etanol da cana-de-açúcar possui um custo econômico mais atrativo: cerca de 50-60% inferiores aos do etanol de milho e 20-30% inferiores aos do etanol da beterraba (MANOCHIO et al., 2017). Ainda que a cana-de-açúcar se apresente como a fonte mais conveniente para a produção de etanol, fatores políticos e econômicos tornam o etanol de milho e beterraba mais competitivo. Esse fato está principalmente relacionado ao subsídio oferecido (especialmente nos Estados Unidos e na União Europeia), proporcionando a liderança mundial da produção de etanol para os Estados Unidos, como apresentado na Figura 2.1. Isso acontece, mesmo sendo utilizada a matéria-prima menos sustentável (MANOCHIO et al., 2017; ZABED et al., 2017).

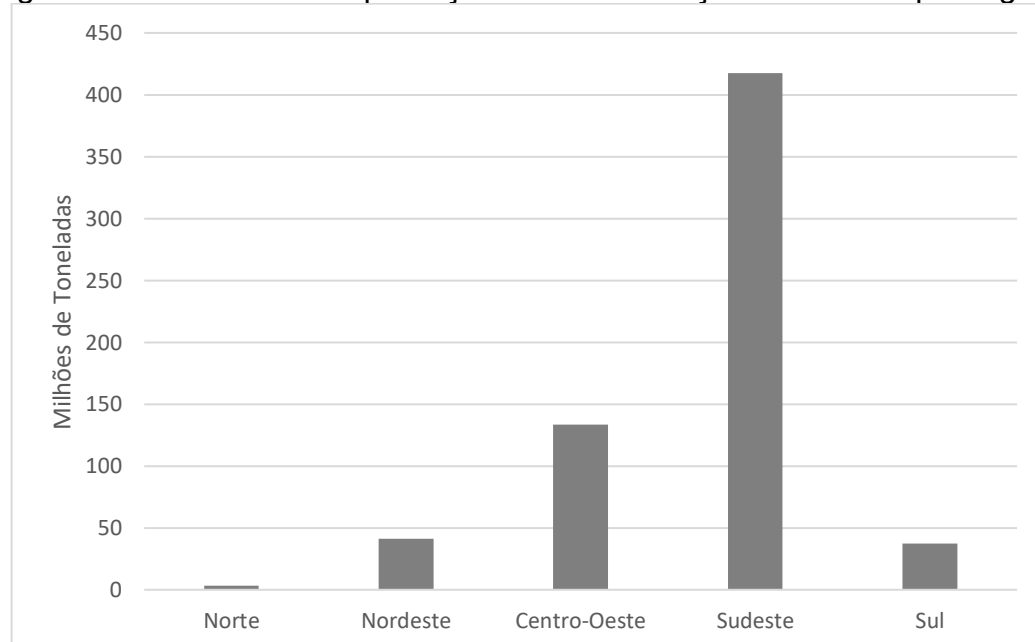
Figura 2.1 - Produção mundial de etanol.



Fonte: (adaptado de ZABED et al., 2017).

O Brasil se posiciona como o maior produtor de etanol a partir de cana-de-açúcar no mundo, permitindo a disponibilidade de um grande volume de resíduos gerados do sistema produtivo (CONAB, 2018b). O cenário brasileiro tem a concentração maior da produção de cana-de-açúcar na região sudeste e centro-oeste conforme apresentado na Figura 2.2.

Figura 2.2 - Estimativa da produção de cana-de-açúcar no Brasil por região.



Fonte: (adaptado de CONAB, 2018b).



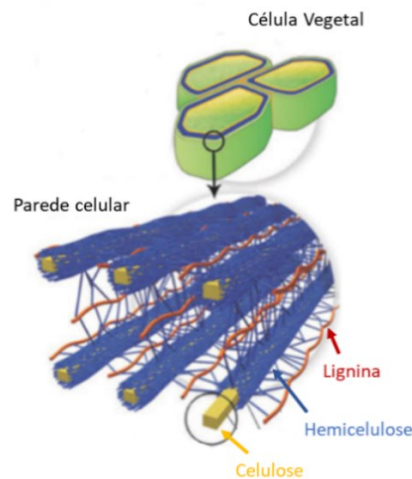
## **2.2. Etanol de segunda geração**

A biomassa é um recurso obtido a partir de matéria orgânica vegetal ou animal energia que é convertida a partir da fotossíntese, transformando energia solar em energia química, que pode ser utilizada posteriormente para a obtenção de eletricidade, combustível ou calor. A utilização da biomassa ocasiona um maior rendimento na quantidade de combustível produzido por área plantada, proporcionando um processo mais sustentável com o reaproveitamento dos resíduos (KOTARSKA et al., 2015).

Podem ser utilizadas diferentes biomassa para produção, tendo como um grande atrativo a possibilidade de utilizar resíduos ou subprodutos de diversos processos como matéria-prima para conversão. Diferentemente do E1G, as tecnologias envolvidas na conversão de biomassa em etanol ainda estão em fase de aprimoramento para tornarem-se economicamente viáveis em larga escala para produção comercial (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

A matéria-prima pode vir de plantas inteiras, palhas ou resíduos industriais com elevado conteúdo lignocelulósico, conforme apresentado na Figura 2.3. Os lignocelulósicos devem passar por um pré-tratamento e hidrólise para a obtenção de açúcares fermentescíveis que não estão diretamente disponíveis para a fermentação, presentes na celulose e hemicelulose (KOTARSKA et al., 2015; PHITSUWAN et al., 2016).

Figura 2.3 - Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte: (adaptado de SANTOS et al., 2012).

A biomassa é composta por microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos. Essa matriz é composta por dois tipos de polissacarídeos, chamados hemiceluloses e pectina, uma pequena quantidade de proteínas estruturais e lignina. As proporções destes compostos variam de acordo com a espécie vegetal, idade, tempo de colheita e outros fatores biológicos como diferenças genéticas dentro da mesma espécie, tecidos especiais e condições de crescimento (FARIAS, 2014).

### 2.3. Resíduos agroindustriais para produção do complexo enzimático

A biomassa utilizada é um fator importante e determinante para a produção de enzimas, pois induz a expressão da enzima celulolítica e permite que os microrganismos secretem enzimas (LEE et al., 2017). Com essa perspectiva, a caracterização da composição centesimal da fonte lignocelulósica se torna fundamental para sua utilização na produção. Para produção do complexo enzimático, diversas biomassas podem ser empregadas, onde se deve considerar: a sua

composição lignocelulósica, o volume de resíduo disponível e seus custos envolvidos com logística e transporte, principalmente.

### **2.3.1. Bagaço de cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar é uma planta que pertence à família das gramíneas do gênero *Saccharum*, composta por espécies perenes de grama alta e cultivada em países tropicais e subtropicais para obtenção de açúcar, etanol e bebidas destiladas. A composição da cana-de-açúcar é cerca de 86% a 92% de suco e de materiais fibrosos de 8% a 14% (BIZZO et al., 2014).

O bagaço-de-cana é obtido como resíduo remanescente da moagem da cana-de-açúcar, durante a extração do caldo da cana, do qual são produzidos açúcar e etanol. O grande volume produzido, tanto no processo de obtenção de açúcar como de etanol, gera uma elevada quantidade de bagaço. A composição do bagaço de cana-de-açúcar é representada por celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%) (LUCARINI, 2017).

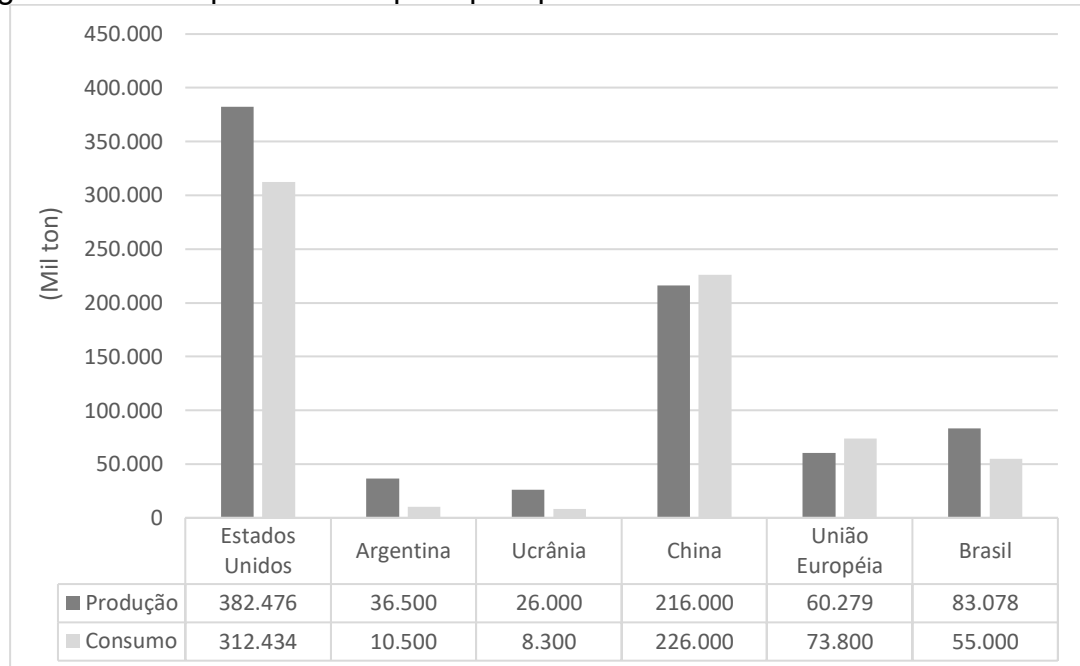
O bagaço de cana é empregado principalmente nas caldeiras da própria usina para geração de energia elétrica, o que reduz os custos do processo. No processamento da cana-de-açúcar, para cada tonelada da matéria-prima, 140 kg de bagaço em base seca são gerados. O grande volume de bagaço de cana gerado e sua composição o torna uma biomassa de grande interesse para a produção de etanol celulósico (SANTOS et al., 2014; CONAB, 2018b).

### **2.3.2. Resíduo do Milho**

A produção mundial de milho tem os Estados Unidos como o maior produtor, bem como o maior consumidor, seguido pela China e Brasil, conforme pode ser observado na Figura 2.4. A alta produção de milho está relacionada a melhorias genéticas das plantas, juntamente com técnicas agrícolas, tais como: métodos de cultivo, fertilizantes, máquinas e mecanização do processo produtivo, armazenamento de grãos e sementes, entre outros. Essas melhorias ao processo geram expressivos

ganhos de produtividade e minimização da exploração de novas áreas de cultivo (CONAB, 2017a).

Figura 2.4 - Comparativo dos principais produtores mundiais de milho 2016/2017.



Fonte: (adaptado de CONAB, 2017a).

No Brasil, a cultura do milho vem alcançando ganhos fantásticos de produtividade nestes últimos anos. Principalmente, nestas duas ou três últimas safras, a cultura do milho, experimentou um novo patamar de produtividade, só antes alcançado por países considerados desenvolvidos e detentores de alta tecnologia, a exemplo dos Estados Unidos. Hoje, no Brasil, é comum encontrarmos produtores com médias acima de 10.000 kg/ha e até 12.000 kg/ha, chegando a patamares de 15.000 kg/ha. Segundo dados da CONAB, para a safra 2017/18 a produção brasileira de milho, primeira e segunda safra, deverá ser de 25,6 e 63 milhões de toneladas, respectivamente, totalizando 88,6 milhões de toneladas. Devido à incidência de pragas, foi necessário introduzir controle via modificação genética e tecnologias ao setor de produção de milho no Brasil (PEIXOTO, 2018). A região do Alto Paranaíba se destaca com avanços no crescimento da produção de milho, que devido ao surgimento de novas tecnologias aplicadas no campo e o desenvolvimento de híbridos proporcionaram o aumento na produção regional conforme apresentado na Tabela 2.1 (SEAPA, 2018).

Tabela 2.1 - Produção de milho do Estado de Minas Gerais 2017.

REGIÃO	Produção (t)	%
Central	625.903	8,18
Rio Doce	85.577	1,12
Zona da Mata	207.763	2,72
Sul de Minas	1.508.173	19,71
Triângulo	1.421.431	18,58
Alto Paranaíba	1.731.382	22,63
Centro Oeste	524.657	6,86
Noroeste	1.301.611	17,01
Norte de Minas	213.940	2,80
Jequitinhonha/Mucuri	31.928	0,42
Minas Gerais	7.652.365	100

Fonte: SEAPA, 2018.

O milho tem uma utilização diversificada na alimentação animal, combustíveis, indústria de alimentos e outros seguimentos. Os resíduos agrícolas derivados da cultura do milho, que usualmente são subprodutos com certo valor agregado, podem ser classificados em sabugo, colmo, folha e palha (envolto da espiga). Estima-se que para cada tonelada de milho produzido são geradas 2,2 toneladas de biomassa, contendo umidade em torno dos 11% (MME, 2014).

### 2.3.3. Resíduo do Arroz

No Brasil, a produção de arroz é estimada em 12,1 milhões de toneladas (junho de 2017), sendo a região sul detentora de 81% da produção total brasileira e, com isso possui expressiva geração de resíduos. O Brasil é o maior produtor e consumidor de arroz fora da Ásia (CONAB, 2017b).

O processamento do grão de arroz tem como resíduos: palha do arroz, gerada durante o cultivo e que permanece no campo após a colheita do grão; e a casca do arroz, produzida durante as operações de beneficiamento do grão. A palha de arroz é um importante resíduo agroindustrial lignocelulósico produzido em todo o mundo, com uma disponibilidade estimada de 685 milhões de toneladas por ano. Essa biomassa pode ser empregada na produção de celulase para reduzir o custo de produção e reduzir os impactos ambientais envolvidos. Antes de ser utilizado como substrato para

a produção de celulase, a palha de arroz deve passar por um pré-tratamento para facilitar a atuação dos microrganismos (ZHENG et al., 2017).

A casca de arroz é resultado do processo de beneficiamento do arroz como um subproduto que representa cerca de 23% do total de arroz colhido (DELLA et al., 2001). A composição química pode variar conforme o processamento e condições de cultivo. Os açúcares de maiores concentrações obtidos da casca de arroz são a glicose (34,1%), xilose (12,7%) e arabinose (1,3%) (HICKERT et al., 2010).

#### **2.3.4. Resíduo do Café**

A produção Brasileira de café em 2018 estimou uma colheita de 59,9 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, possuindo os estados de Minas Gerais (arábica) e Espírito Santo (conilon) como os maiores produtores, sendo 80% da produção total de café arábica (CONAB, 2018a).

O processamento do café gera resíduos durante várias etapas do processo. Os resíduos do processamento podem ser classificados com o tipo de processamento utilizado, são dois tipos de processamentos, por via seca e por via úmida. O processo por via seca, em que se obtém o café em coco, os frutos da planta, são levados ao terreiro ou secador. Já no processo por via úmida, os frutos são descascados/lavados, despulpados ou desmucilados. Os sólidos residuais obtidos são denominados polpa, para os resíduos provenientes do processamento por via úmida e para os resíduos do processamento do café por via seca é denominado casca (CARMO, 2013).

Diversos resíduos sólidos são gerados durante o processamento de pós-colheita, tanto pela via úmida como pela via seca, como também durante o processo de torrefação, trituração e moagem do café (ÁVILA, 2017).

A etapa de torrefação em que o grão de café verde ainda contém a capa de pectina que reveste o grão, pois essa camada não é retirada por completo do grão no processo de secagem. Porém, durante a torrefação ela se desprende do grão gerando assim um grande volume de resíduo. Em seguida os grãos passam pelo triturador, no qual é feita a retirada da película prateada interna ao grão. Gerando assim, outro resíduo, a qual é direcionado a um tubo para descarte (ÁVILA, 2017).

## **2.4. Fermentação em estado sólido**

FES, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido refere-se ao processo de crescimento de microrganismos em meios com substratos sólidos contendo reduzida quantidade de água livre. A água contida nesses sistemas apresenta-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas. A FES tem como vantagem simular o meio natural de fungos na natureza, que podem levar a maior produtividade dos extratos enzimáticos, menor susceptibilidade à inibição e maior estabilidade das enzimas a variações de temperatura e pH (RODRIGUEZ-ZUNIGA et al., 2011).

A utilização da FES para a produção de enzimas tem fatores importantes no processo, por ser um ambiente natural dos fungos, condição na qual a esporulação ocorre mais facilmente do que em fermentação submersa. A FES caracterizada por meio de cultura com substratos sólidos, torna a umidade do processo um fator limitante (SHIRKAVAND et al., 2016).

## **2.5. Complexo enzimático: composição e obtenção**

Diferentes enzimas atuam na degradação dos materiais lignocelulósicos podendo destacar as celulasas, xilanases e pectinases. A composição do complexo enzimático é constituída da mistura de diferentes enzimas, que atuam durante a hidrólise do substrato, constituído de celulose e componentes de hemicelulose para liberação de açúcares fermentescíveis (RASTOGI e SHRIVASTAVA, 2017).

Para obtenção do complexo enzimático alguns microrganismos são comumente utilizados. Na Tabela 2.2 estão sumarizados alguns microrganismos e seus respectivos substratos lignocelulósicos para a maximização da produção de enzimas.

Tabela 2.2 - Microrganismos comumente empregados para obtenção de enzimas a partir de diferentes substratos lignocelulósicos.

Enzimas	Microrganismos	Substrato
Pectinases	<i>Lentinus enodes</i>	Resíduos de frutas
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus tamaraii</i>	Farelo de trigo/sabugo de milho/Bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de chá
	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de arroz
Proteases	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Casca de maracujá

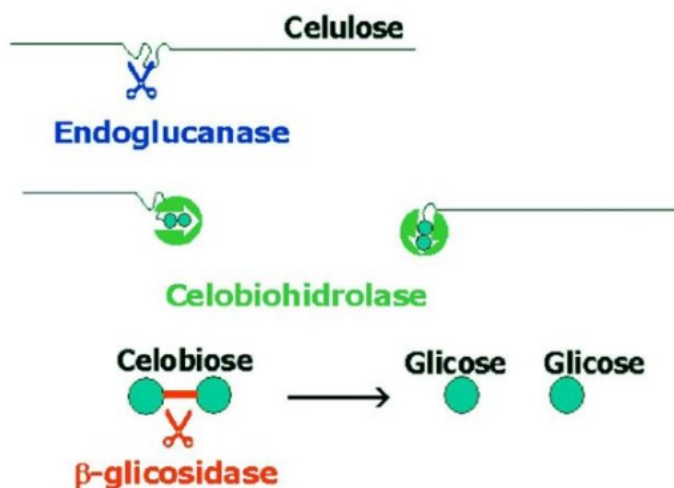
Fonte: (adaptado de ROCHA, 2010).

### 2.5.1. Celulases

As celulases são constituídas de exoglucanases ou celobiohidrolases, as endoglucanases ou celodextrinases, e as celobiasas ou  $\beta$ -glicosidases são empregadas na hidrólise da celulose. As exoglucanases funcionam como exoenzimas que agem no final das cadeias e liberam celobiose como produto principal; as endoglucanases agem de forma aleatória ao longo da cadeia e produzem novos sítios para ação das exoglucanases; e as  $\beta$ -glicosidases concluem o processo por meio da hidrólise da celobiose e outros oligossacarídeos, conforme apresentado na Figura 2.5 (SALES, et al., 2010).



Figura 2.5 - Representação esquemática da ação catalítica do complexo enzimático (celulase) sobre celulose com geração de glicose.



Fonte: (OGEDA; PETRI, 2010).

A celulase é o grupo de enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de ligações  $\beta$ -1,4 presentes na celulose para obter glicose. Esta hexose é utilizada por vias metabólicas de vários microrganismos para produzir vários bioprodutos. As celulasas são principalmente produzidas na natureza por plantas, fungos, bactérias e alguns protozoários, moluscos e nematoides (BISWAS et al., 2014).

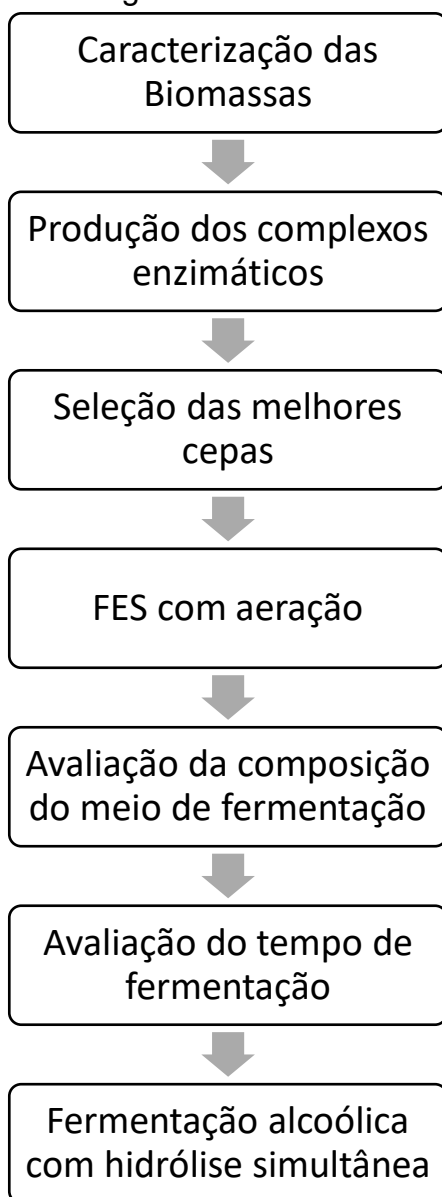
### 2.5.2. Fermentação alcoólica

A conversão de açúcares em etanol ocorre pela metabolização dos açúcares por meio de microrganismos capazes realizar o processo que resultam em etanol através de uma série de reações bioquímicas. Dentre esses microrganismos a levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui grande aplicação comercial. Polissacarídeos como amido e celulose não são metabolizados necessitando de enzimas que degradem esses compostos em açúcares mais simples. Para a produção de etanol lignocelulósico podem ser aplicadas na fase de fermentação algumas estratégias, como de hidrólise separada e fermentação; e hidrólise simultânea e fermentação (GONÇALVES et al., 2016; MANOCHIO et al., 2017).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

No Capítulo 3 serão apresentados os materiais utilizados nos experimentos, como microrganismos e resíduos agroindustriais, e a metodologia empregada em cada etapa experimental. Na Figura 3.1 está apresentado o fluxograma das atividades.

Figura 3.1 - Fluxograma ilustrativo das etapas do trabalho.



### 3.1. Material

#### 3.1.1. Microrganismos produtores de celulase

As cepas dos microrganismos utilizados foram obtidas da coleção estoque do laboratório de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química/UFU (Tabela 3.1). Os microrganismos foram preservados por repique contínuo com intervalo de 20 dias em meio de cultura Batata Glicose Agar (*PDA*), cuja composição é apresentada na Tabela 3.2, e armazenados em temperatura de refrigeração ( $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) (NOZAKI, CAMARGO e BARRETO, 2004).

Tabela 3.1 - Fungos utilizados para produção do complexo enzimático

Fungo	Nome
1	<i>Aspergillus ochraceus</i>
2	<i>Fusarium</i> sp
3	<i>Monilia sitophila</i>
4	<i>Mucor racemosus</i> Fresenius
5	<i>Penicillium oxalicum</i>
6	<i>Trichoderma asperellum</i>
7	<i>Trichoderma harzianum</i>
8	<i>Trichoderma reesei</i>

Tabela 3.2 - Composição do Meio PDA

Meio PDA	(g/L)
Batata	200
Glicose	20
Agar	20

#### 3.1.2. Biomassa

As biomassas utilizadas no desenvolvimento do trabalho, apresentadas na Figura 3.2, foram o farelo da palha de arroz, cedido gentilmente pela beneficiadora COCAL Cereais (Uberlândia/MG) pré-tratado fisicamente; bagaço de cana-de-açúcar, com tratamento de explosão a vapor de baixa severidade, cedido gentilmente pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Piracicaba/SP); farelo da casca do milho, cedido gentilmente pela empresa Cargill (Uberlândia/MG) pré-tratado fisicamente, e

resíduo da torra e trituração do café, cedido gentilmente pela empresa GeoCoffee (Patrocínio/MG). O armazenamento das biomassas utilizadas nos experimentos foi realizado em sacos plásticos vedados e mantidos em temperatura de refrigeração ( $7^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).

Figura 3.2 - Resíduos utilizados como substrato na FES.



- a) Bagaço de cana-de-açúcar; b) Farelo da palha de arroz; c) Farelo da casca do milho; d) Resíduo da torra e trituração do café. Fonte: o Autor.

### **3.2. Métodos**

Os experimentos foram realizados em triplicata para garantia de uma boa reprodutibilidade dos resultados.

#### **3.2.1. Caracterização da biomassa**

##### **3.2.1.1. Preparo das amostras**

Os resíduos utilizados nesse trabalho foram doados previamente tratados e em condições ideais para a realização dos experimentos, conforme recomendação proposta pela metodologia NREL (National Renewable Energy Laboratory). A caracterização do resíduo da torra e torrefação do café não foi realizada nesse trabalho pois já havia sido caracterizado no trabalho de Ávila (2017).

##### **3.2.1.2. Análise granulométrica**

A granulometria foi analisada através de um vibrador de peneiras, ao qual foram utilizados diferentes diâmetros (Tyler), sendo eles entre 10 (1,68 mm) a 35 mesh (420  $\mu\text{m}$ ). Foram colocadas amostras com aproximadamente 50 gramas, e após submetido a vibrações constantes entre um tempo de 10 a 20 minutos. Em seguida foram retiradas as amostras retidas nas peneiras e pesadas em balanças analíticas, possibilitando avaliar a distribuição granulométrica de cada amostra analisada (GOMIDE, 2008).

##### **3.2.1.3. Determinação de extrativos**

Para analisar o teor de extrativos presente nas amostras utilizou-se a metodologia descrita por SLUITER *et al.*, (2008c), realizando a extração por Soxhlet. Aproximadamente 4 gramas das amostras foram lavadas com água e logo após com etanol, com pureza de 99,9%. Foi utilizado um balão de fundo redondo e uma manta de aquecimento. Para a água ajustou a temperatura em  $100\pm 2^\circ\text{C}$ , já para o etanol foi

ajustado em  $78\pm 2^\circ\text{C}$ . Foram feitas as extrações com solvente água por aproximadamente 6 horas, e 16 horas com solvente etanol, ao fim de cada extração os solventes foram volatilizados. Para cada uma das lavagens foram adicionados aproximadamente 190 mL de água, e a mesma medida para o etanol. Após a volatilização dos solventes os balões foram deixados em repouso na estufa, por 24 horas, a  $40\pm 2^\circ\text{C}$  para a obtenção do rendimento de açúcares extraídos.

#### 3.2.1.4. Determinação de carboidratos e lignina

Para a análise de carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) e lignina, utilizou-se a metodologia proposta por Sluiter *et al.*, (2012). Nesta etapa as amostras estavam livres de extrativos. Foram pesados aproximadamente 0,25 g da amostra em tubos de ensaio, e adicionado 3 mL de ácido sulfúrico 72%. A mistura foi deixada em banho-maria a  $30\pm 2^\circ\text{C}$  por 1 hora, realizando agitação do tubo a cada 3 minutos. Em sequência foi diluído a concentração do ácido, adicionando 80 mL de água à mistura, sendo autoclavadas, a  $121^\circ\text{C}$  por 1 hora e com o auxílio de uma bomba a vácuo e cadinhos filtrantes foi realizada a filtração. Os cadinhos com a amostra retida foram secos em estufa para determinação da lignina insolúvel em ácido. Foi recolhida uma alíquota de 1 mL do filtrado para a determinação da lignina solúvel em ácido (LSA). Esta alíquota foi diluída em balões de 100 mL e realizado a leitura no espectrofotômetro ultravioleta a 240 nm, e assim calculado a porcentagem de lignina solúvel de acordo com Equações 3.1 e 3.2:

$$\% \text{LSA} = \frac{UV_{\text{abs}} \times V_{\text{filtrado}} \times D}{\varepsilon \times M \times C_c} \quad (3.1)$$

$$D = \frac{V_{\text{amostra}} + V_{\text{solvente}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (3.2)$$

Sendo:

$UV_{\text{abs}}$  = Absorbância média para a amostra no comprimento de onda apropriado.

$V_{\text{filtrado}}$  = Volume do líquido hidrolisado

$\varepsilon$  = Absortividade da biomassa em um comprimento de onda específico.

M = Peso da amostra em mg.

$C_C$  = comprimento do caminho da célula em cm UV-Vis.

A amostra residual foi hidrolisada com ácido sulfúrico e filtrada, sendo em sequência neutralizada com carbonato de cálcio até atingir o pH entre 5,5 e 6,0. Novamente filtrou-se a amostra com o auxílio de uma bomba a vácuo e transferido o filtrado para um balão de 200 mL.

Para a determinação do teor de carboidratos estruturais, 10  $\mu$ L foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). Realizadas no equipamento de marca Shimadzu, modelo LC-20<sup>a</sup> Pronience, equipado com coluna SUPELCOGEL K. As concentrações dos açúcares foram determinadas por detector de índice de refração. Para a fase móvel foi utilizado fosfato de potássio dibásico (15 mM), vazão da bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 85°C e volume de injeção de 10  $\mu$ L. Determinou-se as concentrações dos carboidratos de acordo com as Equação 3.3:

$$\% \text{Açúcares} = \frac{C_{\text{CLAE}} \times F_C \times V_{\text{filtrado}}}{M_L} \times 100 \quad (3.3)$$

Sendo:

$C_{\text{CLAE}}$  = Concentração de açúcar determinada por CLAE, mg/mL.

$F_C$  = Fator de correção de 0,88 para açúcares C-5 (xylose e arabinose) e correção de 0,90 para açúcares C-6 (glicose, galactose e manose).

$V_{\text{filtrado}}$  = Volume do filtrado, 86,73 mL.

$M_L$  = Massa utilizada livre de extrativos.

### 3.2.1.5. Determinação de holocelulose

A determinação de holocelulose seguiu a metodologia descrita por Manochio *et al.*, (2017). Foi adicionado 4 gramas de amostra livre de extrativos em um Erlenmeyer de 1 litro, 110 mL de água destilada, 3 mL de ácido acético glacial, 22 mL de solução de acetato de sódio a 20% e 9 mL da solução de clorito de sódio a 40%.

A mistura foi levada para manta de aquecimento sendo aquecida e agitada a  $75\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Essa etapa de adição dos reagentes (ácido acético e soluções de clorito e acetato de sódio) foi realizada por mais vezes até que se obtivesse uma solução branca. O produto foi filtrado com o auxílio de bomba a vácuo em cadinhos de vidro com porosidade de  $0,22\ \mu\text{m}$  e lavado com 500 mL de água destilada, e ao fim acrescentado 10 mL de acetona ao cadinho, finalizando a filtração. O filtrado foi levado a estufa a  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 horas. Com o material seco pode-se calcular o rendimento que equivale ao percentual presente de holocelulose.

#### **3.2.1.6. Determinação de hemicelulose e $\alpha$ -celulose**

Para a determinação destes componentes seguiu-se a metodologia descrita por Manochio *et al.*, (2017). Foi adicionado ao triturador 1 grama de holocelulose e 15 mL de solução de hidróxido de potássio a 17,5%. A mistura foi deixada por 2 minutos em contato com a solução e em seguida foi triturada por 8 minutos. Após essa etapa foi adicionado água destilada ao filtrado até que se obtivesse um pH neutro. Em sequência os mesmos foram levados para estufa a  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 18 horas. Ao fim com o material seco, estes foram pesados para calcular o rendimento equivalente a celulose presente.

#### **3.2.1.7. Determinação de sólidos totais**

Seguindo a metodologia proposta por Sluitter *et al.*, (2008b), foram separados pratos de alumínio e colocados em estufa a  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 4 horas, realizando a pré-secagem sem as amostras. Em sequência foi pesado 0,5 g de amostra e espalhadas por todo o prato no intuito de se obter uma secagem o mais uniforme possível. Para a secagem da amostra foi utilizado um analisador automático de umidade no infravermelho, onde foi ajustado a temperatura para  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ , e um ponto final de menos de 0,05% de alteração de sólidos em 1 minuto. Com a determinação dos sólidos totais, pode-se encontrar o percentual de umidade das amostras, seguindo a Equação 3.4:



$$\%Umidade = 100\% - \%Sólidos_{\text{totais}} \quad (3.4)$$

#### 3.2.1.8. Determinação de atividade de água ( $A_w$ )

Para a determinação da atividade de água ( $A_w$ ) em cada amostra foi necessário a utilização do aparelho medidor de atividade de água (AQUALAB). Pesou-se 0,5 g de cada amostra, uniformizando-a no recipiente e realizando a leitura. A temperatura para a medição da  $A_w$  foi em torno de 28,7°C.

#### 3.2.1.9. Determinação de cinzas

A determinação de cinzas foi realizada conforme proposto por SLUITER *et al.*, (2008a). Em forno mufla, foram colocados cadinhos contendo 2g das amostras. Em sequência as amostras foram levadas a uma manta de aquecimento para a realização da queima, esse procedimento só finalizou quando cessado a fumaça produzida. Logo em seguida os cadinhos, com as amostras, foram colocados em um dessecador para estabilizar a temperatura, e posteriormente colocados no forno mufla a aproximadamente 575±5°C por 18 horas para realizar a incineração. Concluída essa etapa, os cadinhos foram novamente esfriados e depois pesados para calcular o percentual de cinzas presentes, conforme Equação 3.5.

$$\%Cinzas = \frac{\text{Peso da amostra incinerada}}{\text{Peso da amostra adicionada}} \quad (3.5)$$

#### 3.2.1.10. Determinação de proteínas

Para a análise de conteúdo de proteínas foi utilizado o procedimento Kjeldahl, descrito por HAMES *et al.*, (2008). O procedimento consiste em três etapas: A primeira etapa é chamada de digestão: Pesa-se 0,1 grama de amostra homogeneizada, 1 grama de amostra catalítica e 5 mL de ácido sulfúrico e adiciona ao tubo de Kjeldahl. Em seguida é deixado o tubo no bloco digestor, em temperatura ambiente a 25±2°C, por 20 minutos. Em sequência essa temperatura foi aumentada de 50°C em 50°C a

cada 20 minutos até atingir a temperatura de  $400^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Chegando a essa temperatura as amostras ficaram por 8 horas, o qual foi o tempo suficiente para que estas atingissem uma coloração límpida e transparente. Em seguida o aquecimento foi cessado e deixado a amostra em descanso por 12 horas. A segunda etapa é chamada de destilação: Após as 12 horas de descanso, adicionou-se 30 mL de água e o tubo foi homogeneizado e acoplado ao destilador. Para realizar a destilação foi preparado uma solução de hidróxido de sódio 50%, que quando adicionado ao tubo deu uma coloração escura a mistura. Na outra ponta do destilador foi adicionado um Erlenmeyer contendo 25 mL do indicador ácido bórico 4%. A operação foi cessada quando a tonalidade do conteúdo no Erlenmeyer ficou com uma coloração esverdeada. A terceira etapa é a titulação. A amostra destilada foi titulada com ácido clorídrico 0,01 mol/L. A titulação foi realizada até o ponto em que se obteve uma coloração branca da mistura. A determinação do percentual de proteínas presentes foi calculada conforme Equação 3.6 e 3.7.

$$\% \text{Compostos Nitrogenados} = \frac{F \times 0,0014 \times 100 \times V \times N}{M} \quad (3.6)$$

$$\% \text{Proteína} = \% \text{Compostos Nitrogenados} \times N_F \quad (3.7)$$

Sendo:

F = Fator de correção da solução de HCl 0,01 N.

V = Volume da solução de HCl 0,01 N gastos na titulação.

N = Normalidade do ácido (HCl).

M = Massa em gramas de amostra utilizada.

$N_F$  = Fator de conversão de nitrogênio em proteína.

#### **3.2.1.11. Determinação de extrato etéreo**

Para analisar o teor de extrativos presente nas amostras utilizou-se a metodologia descrita por AOAC, 1995, realizando a extração por Soxhlet. Foi pesado 2,5 g de amostra e colocadas em um balão de fundo redondo e deixado por

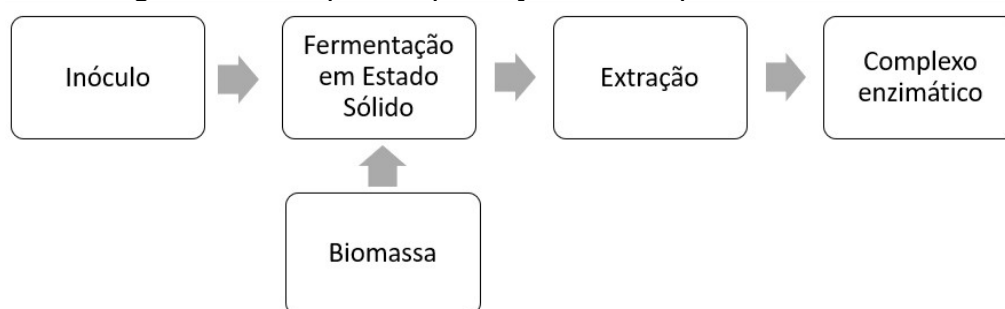
aproximadamente 6 horas, a  $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para realização da lavagem e consequentemente a extração da gordura presente nas amostras. A lavagem foi realizada com éter de petróleo com volume de 190 mL. Ao fim do procedimento, foi deixado todo o solvente volatilizar, no intuito de deixar apenas as gorduras no fundo do balão. O balão contendo gordura foi levado a estufa, a  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 8 horas para garantir que todo solvente residual fosse evaporado. Finalizando este procedimento o balão com a amostra foi esfriado, pesado e calculado o rendimento em percentual de gordura, conforme Equação (3.8).

$$\% \text{Gordura} = \frac{\text{Peso da gordura extraída}}{\text{Peso da amostra adicionada}} \quad (3.8)$$

### 3.2.2. Seleção dos microrganismos

Após a caracterização dos resíduos, utilizados nesse trabalho, foi realizada a seleção dos microrganismos em relação ao complexo enzimático produzido durante a FES. Os fungos foram avaliados em termos da atividade enzimática da celulase (*Fpase*), expressa em unidade de FPU/mL. A produção do complexo enzimático foi realizada por meio de FES, que consistia nas etapas apresentadas na Figura 3.3, de forma simplificada. A preparação do inóculo continha células de uma cepa, que posteriormente foram inoculadas em um reator estático contendo a biomassa como substrato. Ao término da fermentação foi realizado um processo de extração para obtenção do complexo enzimático e assim quantificado a atividade enzimática para cada cepa estudada.

Figura 3.3 - Etapas na produção do complexo enzimático.



As condições utilizadas para a seleção dos microrganismos, como tempo de fermentação, quantidade e proporção de substrato, foram fixadas seguindo condições otimizadas da produção do complexo enzimático encontrados na literatura. As condições foram: tempo de fermentação de 72h, 40 g de substrato (proporção de 60% de farelo de arroz e 40% de bagaço de cana) e 40 g de água como umidade do substrato (FISCHER et al., 2014).

### 3.2.2.1. Preparo do inóculo

As cepas dos microrganismos foram cultivadas em placas de Petri durante 3 dias em meio PDA, para a multiplicação celular. O meio de cultura para preparo do inóculo foi utilizado *Czapek* líquido com composição apresentada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Composição do meio *Czapek*

<i>Czapek</i> líquido	(g/L)
NaNO <sub>3</sub>	2,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,00
MgSO <sub>4</sub>	0,50
KCl	0,50
FeSO <sub>4</sub>	0,01
Glicose	20,00

O meio *Czapek* líquido foi esterilizado em autoclave a 1 atm por 20 minutos e posteriormente as células dos microrganismos foram inoculadas por meio de raspagem das células, que estavam em meio sólido cultivadas na placa de Petri. As células dos fungos em estudo foram inoculadas em 100 mL de *Czapek* líquido, em Erlenmeyer de 250 mL, com tampas de algodão envolto em gaze e tampados com papel kraft. Os Erlenmeyers com o inóculo permaneceram em mesa agitadora a 120 rpm, por 48 h em temperatura controlada (28±2°C). As células do inóculo foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, obtendo uma concentração na ordem de 10<sup>6</sup> esporos/mL, e ressuspensas em 40 gramas de água. As células geradas foram utilizadas na FES para obtenção do complexo enzimático.

### **3.2.2.2. Fermentação em estado sólido**

Utilizando as células obtidas do inóculo, as FES foram realizadas em reator estático (erlenmeyer de 500 mL de volume) com 40 g de biomassa previamente esterilizada e 40 g de água contendo as células do inóculo. Os reatores foram mantidos tampados com rolha de algodão envolto em gaze e temperatura controlada ( $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) durante 72h (FISCHER et al., 2014).

### **3.2.2.3. Extração do complexo enzimático**

O complexo enzimático foi obtido pela extração das enzimas do meio ao término da fermentação. Para a extração foi utilizado 100 mL de solução aquosa de Tween 80 (1%) e com auxílio de bastão de vidro o meio foi agitado por 5 min. Em seguida o meio filtrado foi centrifugado (10000 rpm, 10 min), obtendo o sobrenadante como extrato enzimático. Com o complexo enzimático obtido, foi realizado a análise *FPase* para se determinar a atividade enzimática em termos de celulase.

## **3.2.3. Análise do complexo enzimático**

### **3.2.3.1. Celulases**

A determinação da atividade enzimática total da celulase (*FPase*) dos complexos enzimáticos produzidos foram expressos em FPU (Filter-paper Units) por unidade de volume (mL). A análise determina a concentração de uma solução de enzima que libere 2,0 mg de açúcares redutores a partir de 50 mg de papel filtro Whatman n° 1 durante 60 minutos, utilizando 0,5 mL da solução de enzima (GHOSE, 1987). No tubo contendo o 0,5 mL de complexo enzimático foi adicionado 1 mL de solução tampão de citrato de sódio, com o pH 4,8 a 50 mM e uma tira de papel filtro de 50 mg e foi mantido em banho termostático a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 60 min. Ao final do tempo de incubação foi adicionado 3 mL de solução de DNS (ácido dinitro-salicílico) e mantido em banho fervente por 5 min. Em seguida os tubos foram colocados em

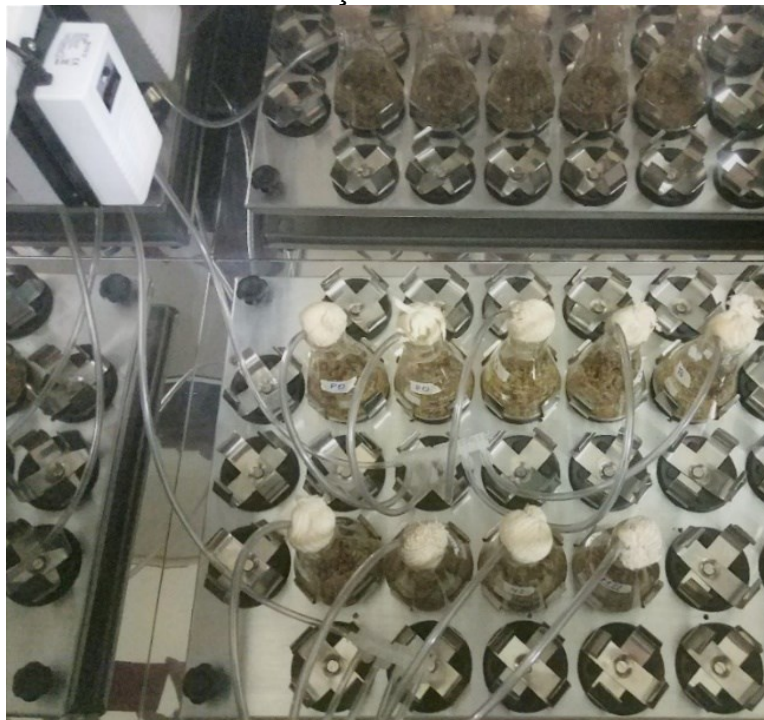
banho de gelo até atingirem temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se água até o menisco de 25 mL do tubo e agitou-se até completa homogeneização. As amostras então foram conduzidas para medida de absorbância em comprimento de onda 540 nm em espectrofotômetro (SANTOS-ROCHA et al., 2017). Com as leituras de absorbância, e juntamente com a construção previa das curvas padrão de glicose foram determinadas as atividades enzimáticas de cada amostra. Os cálculos da atividade enzimática são apresentados no apêndice (A1).

#### **3.2.4. Avaliação da fermentação em estado sólido com aeração**

Algumas das limitações para a utilização da FES podem ser minimizadas com alguns procedimentos operacionais de controle de temperatura do substrato, aeração forçada, controle de pH, dentre outros (PIROTA, 2014).

Com a seleção dos melhores microrganismos produtores do complexo enzimático foi realizado experimentos com a utilização da aeração forçada para melhoramento da fermentação. Foi utilizado um sistema de aeração, como apresentado na Figura 3.4, composto por um compressor e dutos de circulação de ar. Afonso (2012) empregou vazão de 0,125 mL/min para um aumento da produtividade da celulase em um sistema de reator de leito fixo. Pirola (2014) utilizou vazão de 0,2 mL/min para um sistema de aeração. Para este estudo, a vazão de ar empregada foi de 3 L/min (vazão mínima do equipamento utilizado) e os tempos de aeração foram de 24 h (primeiras 24 h das 72 h do tempo de fermentação; depois o sistema de aeração foi removido e a fermentação se manteve) e 72 h (durante toda a fermentação), mantendo o tempo de FES e demais condições iguais as utilizadas na seleção dos microrganismos, conforme item 3.2.2.

Figura 3.4 - Sistema de aeração utilizado durante a FES.



Fonte: o Autor.

### 3.2.5. Avaliação da composição do meio de fermentação

Selecionado os dois fungos mais promissores para a produção do complexo enzimático, foi avaliado a composição da biomassa utilizada na fermentação para se determinar qual a melhor composição de substrato. Os resíduos avaliados foram o bagaço de cana-de-açúcar, farelo da palha do arroz, resíduo da torra e trituração do café, e farelo da casca do milho nas proporções apresentadas na Tabela 3.4.

Para a utilização do farelo da casca do milho foi realizado o processo de gelatinização, que consiste no aquecimento de suspensões de amido em excesso de água atuando como um pré-tratamento, para tornar suscetível a degradação da estrutura lignocelulósica (MARQUES; CUNHA, 2008). O farelo da casca do milho foi avaliado comparando o processo de gelatinização e sem a gelatinização, apenas com a cepa de *Penicillium oxalicum*. O farelo da casca do milho foi colocado em erlenmeyer de 500 mL e mantido em aquecimento, em banho-maria, a 90°C durante 15 minutos, utilizando a proporção de 1 g de farelo da casca do milho por 1 g de água. As demais

condições para a produção do complexo enzimático foram mantidas iguais as utilizadas na seleção dos microrganismos, conforme o item 3.2.2.

Tabela 3.4 – Composição dos meios de fermentação.

Composições dos meios	Bagaço Cana-de-açúcar	Farelo Milho	Farelo Arroz	Resíduo Café
Meio 1	40%	60%	-	-
Meio 2	40%	-	60%	-
Meio 3	40%	-	-	60%
Meio 4	40%	30%	30%	-
Meio 5	40%	30%	-	30%
Meio 6	40%	30%	15%	15%

Fonte: o Autor.

### 3.2.6. Avaliação do tempo de FES com atividade enzimática

Foram avaliados os tempos de fermentação que maximizem a produção da atividade enzimática. Para o teste, foram escolhidos os tempos de FES com intervalo de 12 horas (36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas) utilizando os fungos e composição do meio de substrato selecionados nas etapas 3.2.2 e 3.2.5, respectivamente.

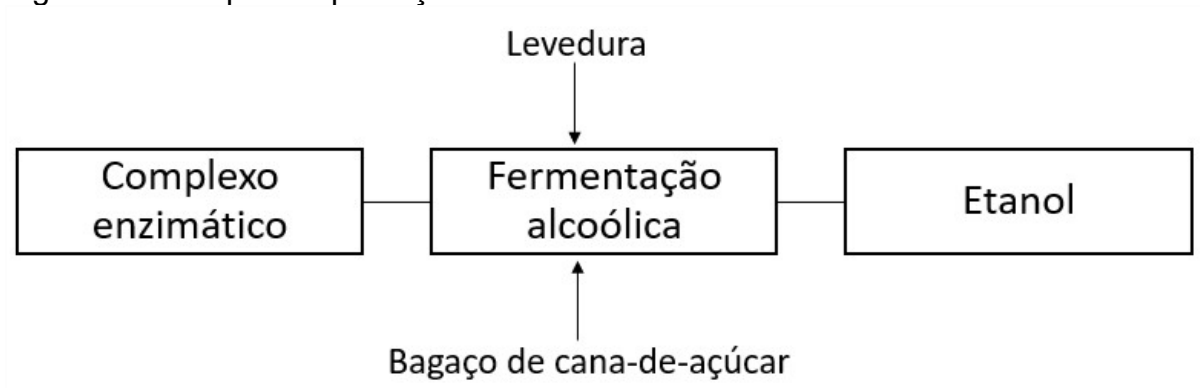
### 3.2.7. Avaliação do complexo enzimático na produção de etanol

Para a fermentação alcoólica utilizou-se os complexos enzimáticos (de *Trichoderma reesei* e *Penicillium oxalicum*) obtidos em 72 h na etapa 3.2.6. As fermentações foram realizadas simultaneamente com etapa de hidrólise, sendo 100 mL do complexo enzimático produzido, 25 g de substrato (bagaço de cana-de-açúcar), em reator batelada com agitação de 120 rpm, temperatura de  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ , pH inicial de 4,5, concentração do inóculo (*Saccharomyces cerevisiae* Y904) 30 g/L, e tempo de fermentação de 48 horas. O meio de fermentação foi suplementado com (g/L) 5,0



fosfatos de potássio monobásico, 1,0 sulfato de magnésio, 1,0 cloreto de amônio, 5,0 cloreto de potássio e 1,0 de extrato de levedura (FISHER et. al.,2014). O esquema ilustrativo do processo está apresentado na Figura 3.5.

Figura 3.5 - Etapas na produção de etanol com hidrólise simultânea.



## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No Capítulo 4 serão apresentados e discutidos os resultados da pesquisa realizada, com as etapas de caracterização das biomassas, obtenção do complexo enzimático e fermentação alcoólica.

### **4.1. Distribuição granulométrica das biomassas**

A distribuição granulométrica das partículas das biomassas estudadas, neste trabalho está apresentada na Figura 4.1 e do resíduo da torra e trituração do café (Ávila, 2017) na Figura 4.2. Das amostras utilizadas, pôde-se observar que para o farelo da palha do arroz e o bagaço de cana-de-açúcar houve uma melhor uniformidade em sua distribuição. A maior parte do farelo da palha do arroz se concentrou no fundo o que implica que a maioria das amostras tem diâmetro inferior a 420  $\mu\text{m}$ . Para o bagaço de cana-de-açúcar a maior parte ficou retida no MESH 10, mostrando que o diâmetro das amostras destes são superiores a 1,68 mm. O farelo da casca do milho apresentou partículas não uniformes, onde ficaram distribuídas em diâmetros distintos. Porém, sua maior parte ficou concentrada no MESH 35 (cerca de 42%), ou seja, maior parte da amostra é inferior a 420  $\mu\text{m}$ .

Figura 4.1 - Distribuição granulométrica da Farelo da palha do arroz, Bagaço de cana- de-açúcar e Farelo da casca do milho, respectivamente.

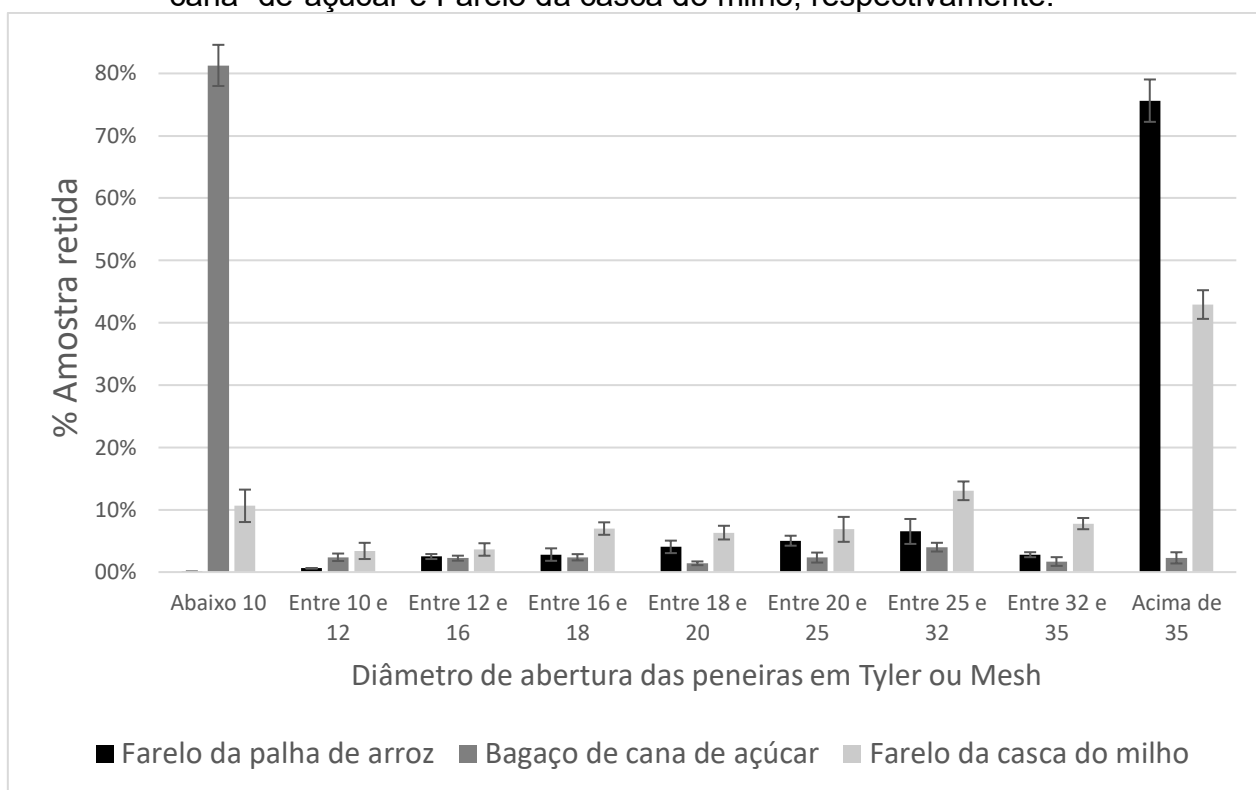
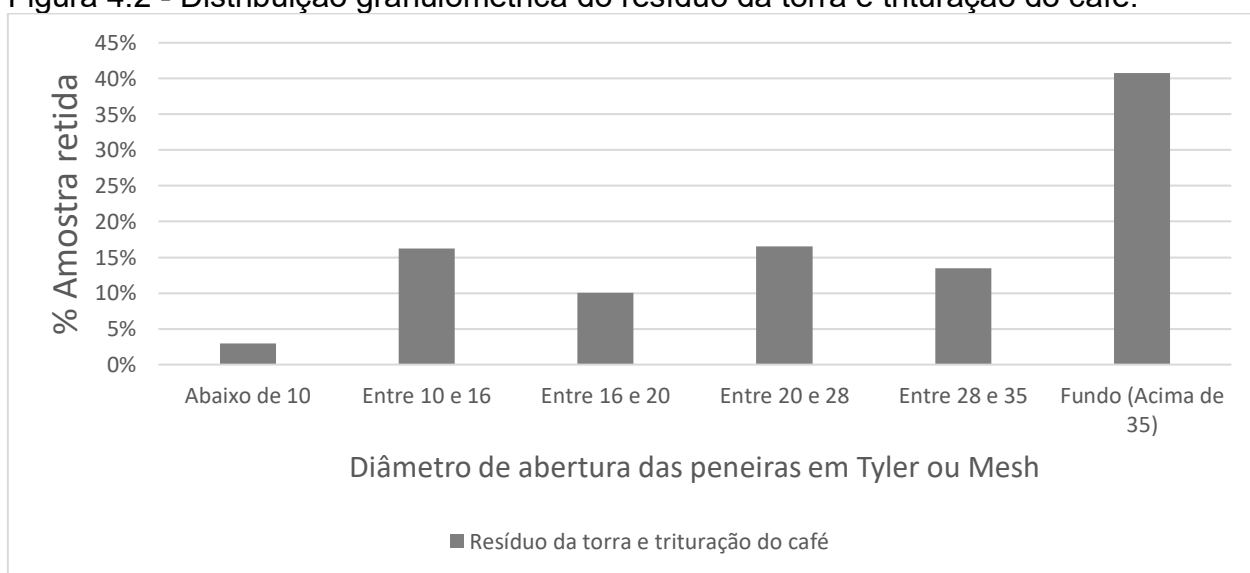


Figura 4.2 - Distribuição granulométrica do resíduo da torra e trituração do café.



Fonte: ÁVILA, 2017.

Através dos resultados para o resíduo da torra e trituração do café., pode-se observar que a maior parte das partículas ficaram retidas no fundo, MESH 35,

aproximadamente 40,78% do material, ou seja, com tamanho de partícula menores que 0,5 mm (ÁVILA, 2017).

A granulometria interfere diretamente na área de contato entre os reagentes químicos utilizados e a biomassa, principalmente quando se utiliza métodos químicos para a quantificação de componentes, quando comparado ao método por infravermelho (SLUITER, 2008a). Uma parte crítica nessa análise é quando as partículas se encontram sem uniformidade, o que acarreta uma dificuldade de se obter resultados mais próximos, elevando o desvio padrão dos resultados. Esta irregularidade pode atrapalhar a reprodutibilidade dos experimentos.

#### 4.2. Caracterização química das biomassas

Os resultados da caracterização química das biomassas estudadas estão apresentados na Tabela 4.1. O percentual para extrativos, celulose, hemicelulose e lignina são informações essenciais para a produção de E2G.

Tabela 4.1 - Caracterização química de biomassa para produção de etanol de segunda geração.

	Extrativos (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)
Farelo do arroz	4,82±2,73	38,33±0,96	19,73±0,96	19,01±0,83	7,99±0,17
Bagaço da cana-de-açúcar	18,70±1,83	27,09±2,99	5,61±2,99	15,30±1,34	2,70±0,06
Farelo do milho	12,82±0,06	55,75±2,40	12,93±2,40	9,84±0,22	3,47±0,17
Resíduo do café (Ávila, 2017)	-	32,30±0,12	25,64±1,34	37,9±0,45	-

Fonte: o Autor.

Os extrativos têm potencial forte de inibir atividades fermentativas dos microrganismos. Isso demonstra a grande importância de sua extração no processo para se obter um melhor rendimento na fermentação (da COSTA, 2016). As biomassas têm concentrações muito variantes de componentes, estes resíduos possuem em média valores aproximados de extrativos entre 5-20% (RABELO, 2007).

Como pode-se observar na Tabela 4.2, os valores encontrados na literatura estão próximos ao deste estudo. O teor de extrativos encontrados para as biomassas estudadas podem dificultar no processo de fermentação, ao qual se torna necessário fazer a extração destes antes de aplicá-los.

Tabela 4.2 - Composições de extrativos em % de biomassa.

	Extrativos (%)	Fonte
Casca do arroz	3,10	Hickert <i>et al.</i> , (2010)
Bagaço da cana-de-açúcar	16,80	Costa (2016)
Palha do milho	11,60	Santos (2014)
Espiga do milho	18,00	Santos (2014)
Palha do milho	17,22	Romão (2015)
Casca do Café	38,05	Freitas (2016)
Casca de café	47,38	Veiga (2016)

Fonte: o Autor

A quantificação de celulose se torna fator chave na caracterização, pois é a partir destes dados que se pode ter noção da viabilidade da biomassa no processo da produção do E2G (ABRAHAM *et al.*, 2016). Quanto maior for a quantidade presente de celulose, mais provável que este se torne um bom substrato para aplicação na produção do bioetanol (CAI *et al.*, 2017).

Observando a Tabela 4.3 e comparando os resultados, pode-se notar que tanto o farelo de palha de arroz quanto o bagaço de cana-de-açúcar apresentaram valores de celulose e lignina próximos ao da literatura. O farelo da casca do milho apresentou o teor de celulose acima daqueles encontrados por outros pesquisadores, porém estes resultados foram comparados com a palha e sabugo. Na literatura não foram encontrados estudos da casca do milho, sendo esse resíduo proveniente da produção de amido o qual era usado apenas para ração animal. Os resultados apresentados na Tabela 4.3, mostram o quanto pode ser satisfatório a aplicação destes resíduos como substrato para a produção de E2G, devido a sua alta presença de celulose e hemicelulose nas três biomassas.

Tabela 4.3 - Celulose, hemicelulose e composição de lignina em % de biomassa

	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Fonte
Palha do arroz	29,20 - 34,70	23,00 - 25,90	17,00 – 19,00	CAI <i>et al.</i> , (2017)
Palha do arroz	44,00	20,10	19,00	RASTOGI; SONI; KAUR (2016)
Palha do arroz	42,54	24,51	9,16	AKHTAR <i>et al.</i> , (2017)
Casca do arroz	35,00	30,00	18,00	Islam <i>et al.</i> , (2017)
Bagaço da cana-de-açúcar	38,80	29,40	21,70	Wolf (2011)
Bagaço da cana-de-açúcar	46,86	27,50	26,70	Canilha <i>et al.</i> , (2007)
Bagaço da cana-de-açúcar	25,00 – 45,00	28 - 32	15,00 – 25,00	CAI <i>et al.</i> , (2017)
Palha do milho	36,70	34,20	14,00	Hicker (2010)
Espiga do milho	35,40	26,90	18,00	Hicker (2010)
Palha do milho	41,18	16,31	14,14	Salazar <i>et al.</i> , (2005)
Palha do milho	47,22	22,15	12,77	Romão (2015)
Polpa de café	20,62	15,50	11,17	Barreto; Menezes (2015)
Casca do café	24,53	19,86	13,68	Freitas (2016)

Fonte: o Autor

Biomassas com baixos teores de cinzas, podem oferecer numerosas vantagens para utilização em processos de bioconversão (FILHO; JULIANI, 2013). Quando comparado aos resultados obtidos na Tabela 4.1 com a Tabela 4.4, pode-se concluir que os resultados encontrados para as cinzas, das quatro biomassas, estão próximos. As cinzas quando estão em concentrações altas podem diminuir o poder calorífico do processo, o que possivelmente ocasiona perda de energia e dificuldade na transferência de calor (VIEIRA *et al.*, 2011). Assim, todas as três biomassas estudadas possuem pequena porção de cinzas, o que é uma característica positiva

para a utilização destas em processos de geração de energia ou conversão em bioetanol.

Tabela 4.4 - Composição de cinzas em % de biomassa.

	Cinzas (%)	Fonte
Palha do arroz	15,52	Vieira <i>et al.</i> , (2011)
Palha do arroz	17,00	Hickert et al., (2010)
Bagaço de cana-	5,10	Wolf (2011)
Bagaço de cana-	1,61	Canilha <i>et al.</i> , (2007)
Palha do milho	2,30	Salazar <i>et al.</i> , (2005)
Palha do milho	0,64	Romão (2015)
Café torrado	9,70	Muller et al., (2013)
Casca do café	0,36	Freitas (2016)

Fonte: o Autor

#### 4.2.1. Composição de carboidratos na biomassa

Os resultados da identificação dos carboidratos estão apresentados na Tabela 4.5. Quando se identifica glicose e xilose, pode-se ter uma confirmação que a celulose e hemicelulose foram retiradas durante a deslignificação (ISLAM *et al.*, 2017). A presença majoritária da glicose era esperada, devido haver maior quantidade de celulose, e a baixa concentração de xilose, quando comparada aos demais autores, é devido ao baixo índice de hemicelulose encontrado nas amostras estudadas (ISLAM *et al.*, 2017, LEE; VADLANI; FAUBION, 2017).

Tabela 4.5 - Concentração de monossacarídeos resultante da hidrólise

	Farelo do arroz (%)	Bagaço da cana-de- açúcar (%)	Farelo do milho (%)
Glicose	40,69±1,600	52,35±4,000	51,58±1,600
Frutose	5,35±0,700	6,84±0,200	8,59±0,700
Xilose	4,94±0,100	6,84±0,200	8,59±0,700
Arabinose	3,35±0,003	-	4,43±0,300
Sacarose	-	1,45±0,100	-
Celobiose	-	1,30±0,090	-

Fonte: o Autor.

Os resultados de carboidratos foram muito próximos aos de outros pesquisadores encontrado na literatura, conforme Tabela 4.6. Pela caracterização, estes resíduos se mostraram substratos interessantes para a produção de complexos enzimáticos e de biocombustíveis. A hemicelulose e celulose podem ser hidrolisadas a açúcares e fermentados a nível microbiológico a vários produtos como o etanol, ou serem convertidas quimicamente (OGEDA; PETRI, 2010).



Tabela 4.6 - Composição de carboidratos em% de monossacarídeos

	Glicose	Xilose	Arabinose	Manose	Celubiose	Fonte
Palha do arroz	32,83	12,50	7,35	-	-	Zheng <i>et al.</i> , (2017)
Palha do arroz	34,20	19,30	2,00	-	-	Sasaki <i>et al.</i> , (2016)
Bagaço da cana-de-açúcar	48,60	28,72	3,48	-	-	Panaro <i>et al.</i> , (2015)
Bagaço da cana-de-açúcar	36,74	20,30	1,80	-	-	Szczerbowski <i>et al.</i> , (2014)
Bagaço da cana-de-açúcar	42,30	20,90	-	-	-	Narron <i>et al.</i> , 2017
Milho livre de extrativos	42,60	25,80	13,70	-	-	Kim <i>et al.</i> , (2015)
Milho	45,40	22,70	2,30	-	-	Mourtzinis <i>et al.</i> , (2016)
Espiga do milho	37,90	29,00	2,80	-	-	Mourtzinis <i>et al.</i> , (2016)
Casca de café	12,42	31,35	-	-	-	Freitas (2016)

Fonte: o Autor.

#### 4.2.2. Composição de sólidos totais, umidade e atividade de água (Aw)

É importante conhecer a quantidade de matéria seca e úmida, e a atividade de água na biomassa, pois estes estão diretamente correlacionados com o desenvolvimento de microrganismos (ROMÃO, 2015). Sendo que cada tipo de microrganismo possui uma atividade específica para seu desenvolvimento, pode-se tomar como referência as faixas de crescimento entre 0 (zero) e 1 (um), como por exemplo os fungos que estão próximos de 0,70, as leveduras 0,80 e as bactérias 0,90; entre 0,20 e 0,50 dificilmente ocorrerá desenvolvimento microbiano (MORAIS *et al.*, 2010). Os resultados do percentual da umidade de sólidos e atividade de água estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Quantidade de Sólidos totais, Umidade e Atividade de Água (Aw) na biomassa.

	Sólidos totais (%)	Umidade (%)	Aw
Farelo do arroz	93,08±2,15	6,92±2,15	0,391±0,05
Bagaço da cana-de-açúcar	57,29±3,88	42,71±3,88	0,822±0,03
Farelo do Milho	90,91±1,43	9,09±1,43	0,437±0,03
Resíduo do café (Ávila, 2017)	-	0,45±0,03	0,456±0,016

Fonte: o Autor.

Historicamente, a atividade de água (Aw) é um conceito-chave na área de ciência dos alimentos. Entender sobre a Aw de um produto é fundamental para se ter um breve conhecimento de sua estabilidade química, física e microbiológica. Vieira *et al.*, (2011) estudaram a umidade para a casca do arroz encontrando valores entre 7,9% e 10%. Souza (2014) encontrou para o bagaço recém moído cerca de 50% de umidade. Vieira (2012), obteve 16,93% de umidade para a espiga de milho.

As partes utilizadas da planta, e o seu pré-tratamento pode ter grande influência em sua umidade final. Para todas as biomassas estudadas foram encontrados valores inferiores aos que foram pesquisados na literatura, o que torna atrativo a utilização destes como substrato, uma vez que a contaminação microbiológica pode ser dificultada em detrimento desta característica.

#### 4.2.3. Análise de extrato etéreo e proteínas

Os resultados encontrados referentes a gordura e proteína podem ser encontrados na Tabela 4.8. Silva *et al.*, (2010) estudou o farelo de arroz e encontrou para essa biomassa a quantidade de lipídeos equivalente a 16,96%. Chaud *et al.*, (2009) que estudaram farelo de arroz integral, encontraram como resultado de gordura equivalente de 15,3%. De Carvalho *et al.*, (2006) caracterizaram o bagaço de cana-de-açúcar e encontrando o resultado de gordura de 0,07%. Zambom *et al.*, (2008) estudaram a composição do milho moído, estimando o valor de extrato etéreo em

3,59%. Analisando a Tabela 4.8 pode-se observar que os resultados encontrados para as três biomassas foram próximos dos que foram encontrados na literatura.

Tabela 4.8 - Composição de Gordura e Proteína na biomassa		
	Gordura (%)	Proteína (%)
Farelo do arroz	17,45±3,43	0,68±0,04
Bagaço da cana-de-açúcar	0,586±0,14	-
Farelo do milho	3,32±0,13	7,31±0,03
Resíduo do café (Ávila, 2017)	6,88±0,15	15,98±0,89

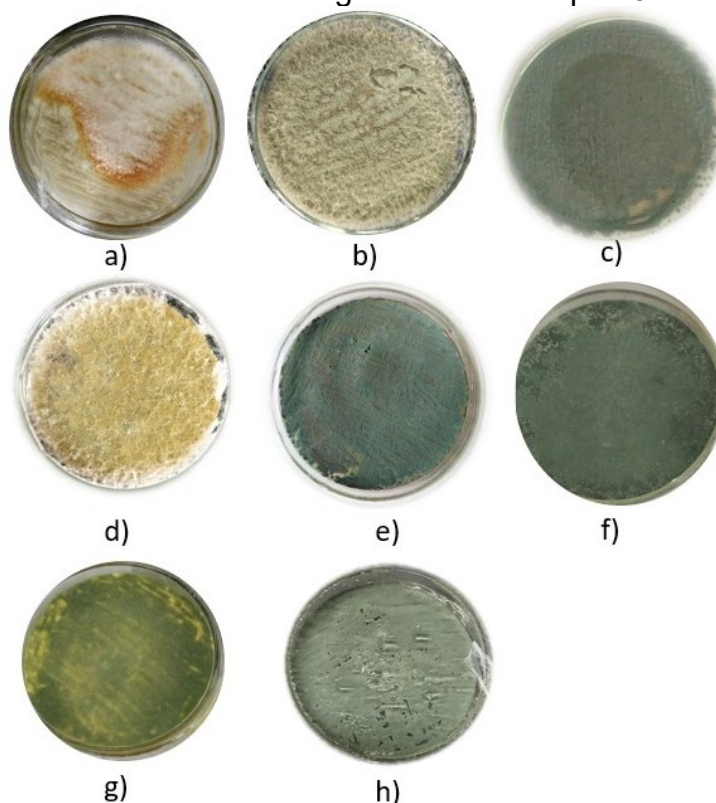
Fonte: o Autor.

Em relação as proteínas presentes nas biomassas, foram encontrados na literatura alguns resultados de alguns autores, como por exemplo: Chaud *et al.*, (2009) encontraram 1,54% de proteína bruta em seu estudo para o farelo de arroz. Silva *et al.*, (2010) encontraram 4,94% de proteína para o mesmo tipo de resíduo. Souza (2014) encontrou 0,66% de proteína para o bagaço de matérias sacarinas e De Carvalho *et al.*, (2006) caracterizaram a composição químico-bromatológica do bagaço de cana-de-açúcar, encontrando 2,32% de proteína bruta. Zambom *et al.*, (2008) estudaram a composição do milho moído, estimando o valor de proteína bruta em 8,38%. Na literatura para o café torrado e moído, encontraram um valor de 15,75% de proteína (SILVA; ASCHERI; PEREIRA, 2007). Em comparação com as biomassas utilizadas neste estudo, as análises do bagaço de cana-de-açúcar e do farelo da casca do milho estiveram muito próximas daquelas encontradas na literatura. Os valores obtidos para o farelo da palha do arroz esteve um pouco distante dos resultados encontrados. Isso pode se dar pelo tipo de casca do arroz estudado, condições climáticas e solo de onde estes foram cultivados. A diferença de valores que foram encontrados pode ter essa incidência devido a variabilidade das composições químicas das matérias-primas ou levar em consideração a época em que as mesmas foram colhidas, ou seja, o fato pode estar associado diretamente à origem da biomassa ou até mesmo ao método de análise utilizado por outros autores (AZEVEDO *et al.*, 2016).

### 4.3. Seleção dos microrganismos

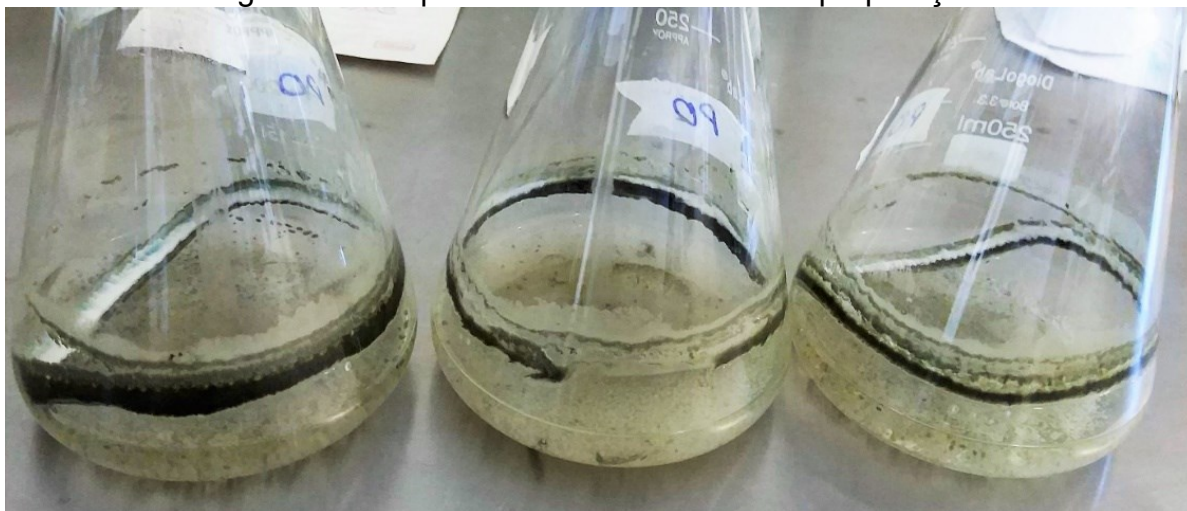
Seguindo as etapas do fluxograma (Figura 3.3), são apresentados os resultados obtidos de cada uma das etapas na produção do complexo enzimático para os oito fungos estudados. O preparo do inóculo a partir das cepas de cada microrganismo, em placa de Petri, com meio PDA e o inóculo ao final do processo são apresentados na Figura 4.3 e Figura 4.4 respectivamente.

Figura 4.3 – Placas de Petri dos oitos fungos estudados após 3 dias de cultivo.



a) *Aspergillus ochraceus*; b) *Fusarium* sp; c) *Monilia sitophila*; d) *Mucor racemosus* Fresenius; e) *Penicillium oxalicum*; f) *Trichoderma asperellum*; g) *Trichoderma harzianum*; h) *Trichoderma reesei*. Fonte: o Autor.

Figura 4.4 - Aspecto do inóculo ao final da preparação.



Fonte: o Autor.

Após o preparo do inóculo, cada amostra foi submetida à FES (Figura 4.5), para se obter o complexo enzimático bruto conforme apresentado na Figura 4.6.

Figura 4.5 - Fermentação em estado sólido com o inóculo e substrato.



Fonte: o Autor.

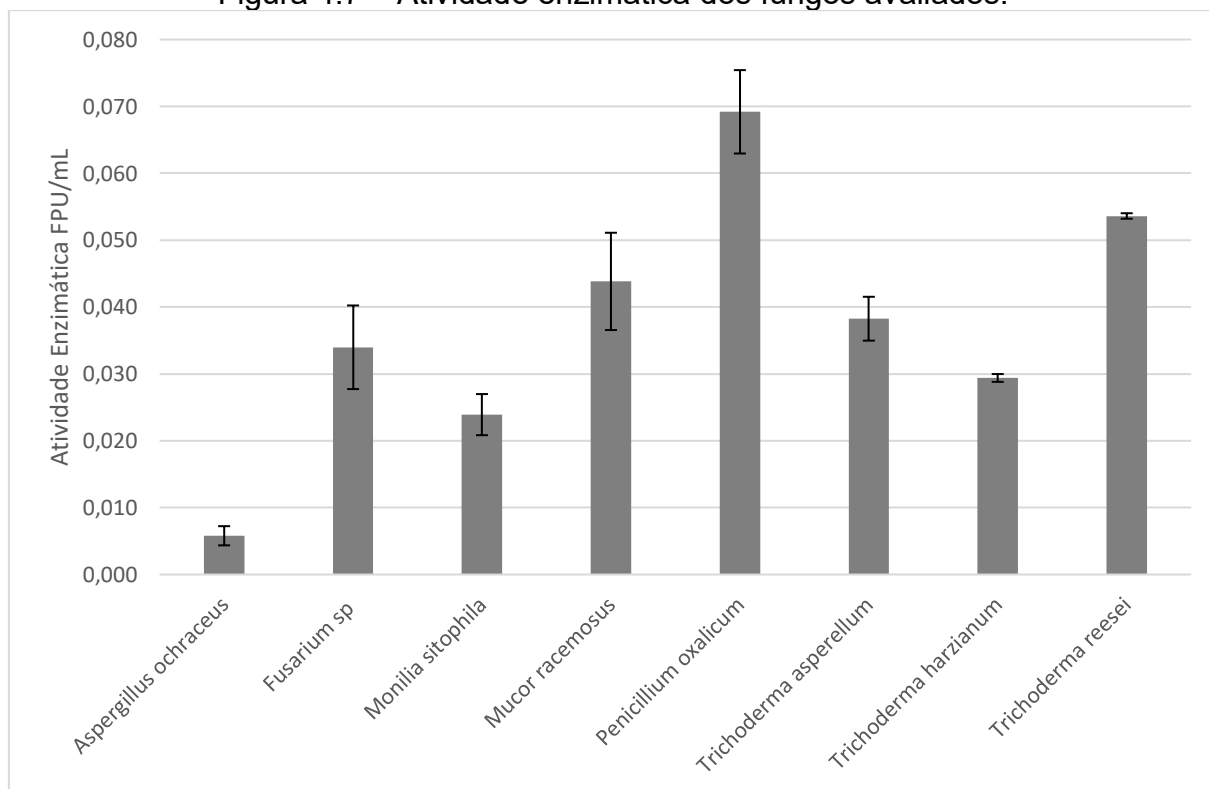
Figura 4.6 – Aspecto do complexo enzimático.



Fonte: o Autor.

As oitos cepas dos fungos foram avaliadas em termos da produção de celulase e os resultados da atividade enzimática são apresentadas na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Atividade enzimática dos fungos avaliados.



Pode ser observado que os fungos *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei* apresentaram as maiores atividades enzimáticas nas condições empregadas nos

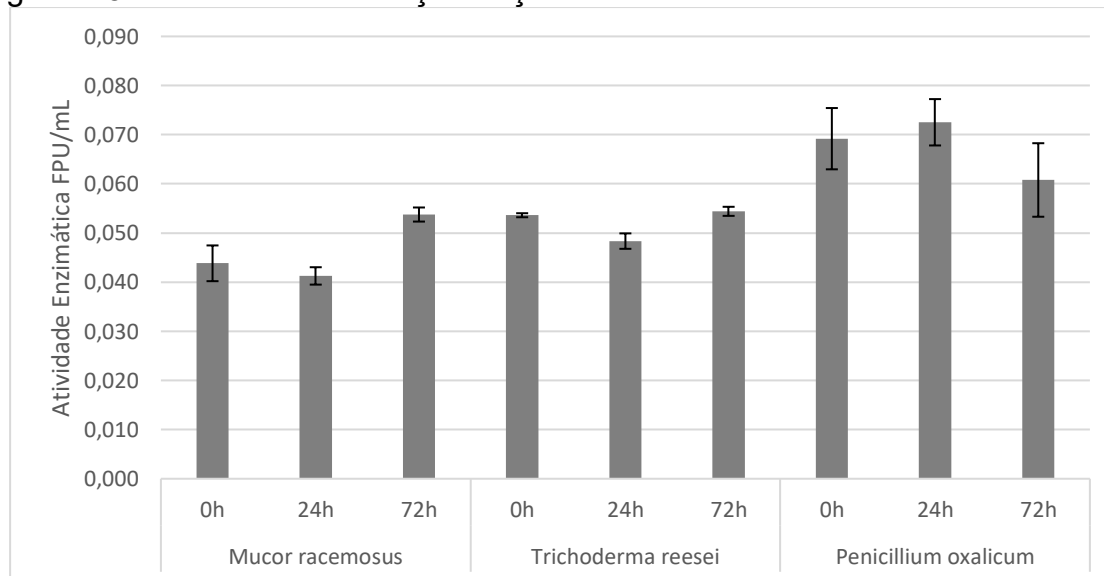
testes,  $0,069 \pm 0,006$  FPU/mL e  $0,054 \pm 0,004$  FPU/mL, respectivamente. O resultado obtido foi semelhante ao encontrado na literatura por SANTOS et al., (2017) empregando bagaço de laranja obtiveram 0,08 FPU/mL com *Trichoderma reesei* CCT2768 e para o *Trichoderma reesei* QM9414 isolado comumente empregado na produção de complexo enzimático obtiveram 0,15 FPU/mL.

*Penicillium oxalicum*, *Trichoderma reesei* e o *Mucor racemosus* foram os fungos escolhidos, por apresentarem maior atividade enzimática, para dar continuidade ao trabalho subsequente.

#### 4.4. Avaliação da fermentação em estado sólido com aeração forçada

Após selecionar as três melhores cepas em termos de produção de celulase, foi avaliada a influência do processo de aeração na produção do complexo enzimático. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 4.8, comparando o uso do processo de aeração forçada em seus respectivos tempos, 24, e 72h, sendo o tempo 0 h para o sistema sem a aeração no processo. Sendo que todas as fermentações aconteceram durante 72h.

Figura 4.8 – Influência da aeração forçada durante a FES na atividade enzimática.



Para as três cepas avaliadas, foi possível perceber diferenças no desempenho do processo ao ser empregado o sistema de aeração forçada. Para o

*Mucor racemosus*, a aeração durante toda a FES contribuiu para uma maior produção enzimática. Para a cepa de *Trichoderma reesei*, não ocorreu uma influência expressiva ao processo nos tempos avaliados, semelhante à cepa de *Penicillium oxalicum*. Porém em tempo de 72h de aeração apresentou a redução na atividade enzimática. Ao passo que a aeração favorece o crescimento do fungo durante a FES devido a sua característica aeróbica, produz dióxido de carbono pelo seu metabolismo, sendo possível ocorrer a inibição parcial de crescimento (SILVA et al., 2014).

Afonso (2012) avaliou o uso de aeração forçada utilizando *Myceliophthora sp.* M77 e obteve um aumento de 30% na concentração de celulase em relação ao processo fermentativo em frasco Erlenmeyer. PIROTA (2014) obteve um aumento de 14% da atividade enzimática de *FPase* quando utilizou aeração forçada utilizando *A. oryzae*.

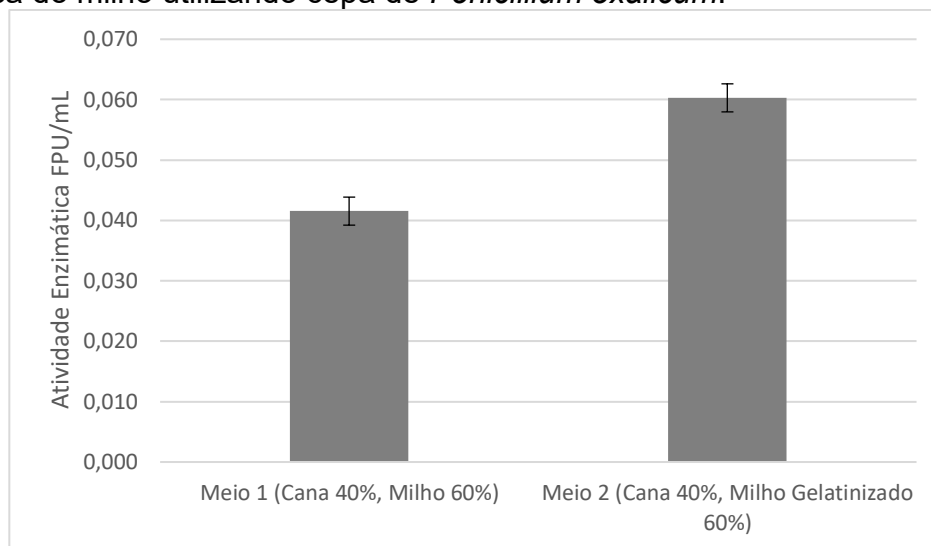
Os resultados mostraram que o processo de aeração nas condições estudadas não obteve resultados relevantes que justificaria a utilização, já que apresenta um alto custo de implementação ao processo em escala comercial.

#### **4.5. Avaliação da composição do meio de fermentação**

A Figura 4.9 apresenta o resultado da avaliação do uso do farelo da casca do milho gelatinizado. Utilizando o processo de gelatinização, observou-se uma maior atividade enzimática. Com este resultado, foi adotado o processo de gelatinização do farelo da casca do milho quando este material foi utilizado como substrato nos demais experimentos.

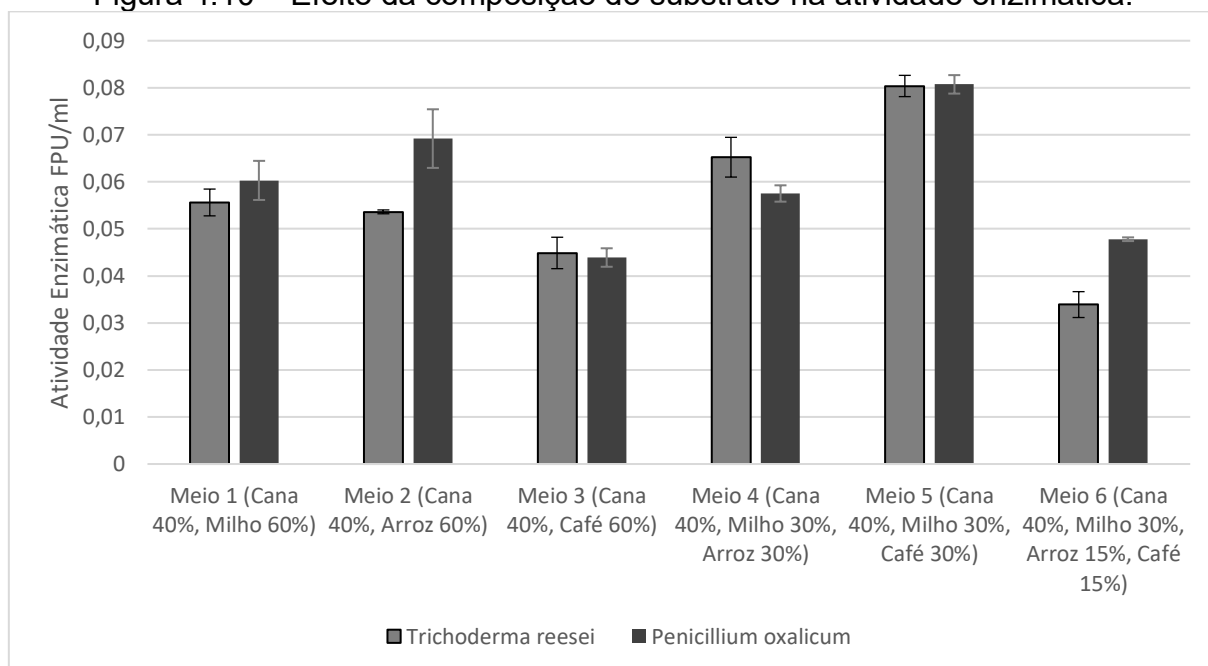


Figura 4.9 - Atividade enzimática da avaliação do processo de gelatinização do farelo da casca do milho utilizando cepa de *Penicillium oxalicum*.



A composição do substrato utilizado na FES foi avaliada utilizando os dois melhores fungos da seleção dos microrganismos *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei* conforme apresentado os resultados na Figura 4.10.

Figura 4.10 – Efeito da composição do substrato na atividade enzimática.



O meio 5 de composição de 40% de bagaço de cana-de-açúcar, 30% farelo da casca do milho e 30% do resíduo da torra e trituração do café, apresentou a melhor

condição para a FES para os dois fungos avaliados,  $0,081 \pm 0,002$  FPU/mL *Penicillium oxalicum* e  $0,080 \pm 0,002$  FPU/mL *Trichoderma reesei*, para a produção do complexo enzimático. Para o meio 6 (Cana 40%, Milho 30%, Arroz 15%, Café 15%) foi obtido as menores atividades enzimáticas,  $0,047 \pm 0,002$  FPU/mL para o *Penicillium oxalicum* e  $0,034 \pm 0,001$  FPU/mL para o *Trichoderma reesei*,

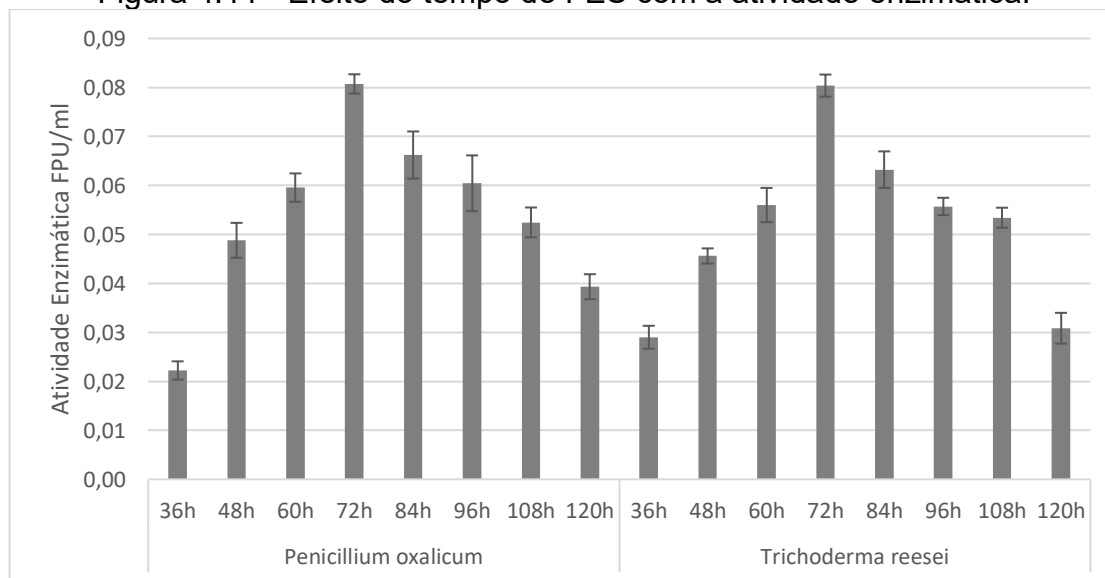
OLIVEIRA JÚNIOR (2014), estudou a utilização do *Penicillium chrysogenum* e obteve 0,031 FPU/mL utilizando apenas o bagaço do coco como substrato. RODRIGUEZ-ZUNIGA (2010) empregou o substrato com 65% bagaço-de-cana e 35% de farelo de soja e obteve 0,045 FPU/mL utilizando *Aspergillus niger* em FES. Porém as condições empregadas precisam ser otimizadas para que maximizem a produção do complexo enzimático, pois quando comparado com sistemas otimizados na literatura os valores da atividade enzimática se torna discrepantes. Em um sistema utilizando casca de soja Daronch et al., (2015) obteve 1,19 U/g de substrato, utilizando *Penicillium* sp e verificou que o teor de umidade é uma variável importante na produção do complexo enzimático.

O resultado encontrado para o meio 5 pode ser explicado, relacionando a caracterização das biomassas, em condições de maiores nutrientes e fonte de carbono durante a FES. Esse fatores, possivelmente favoreceram o crescimento celular e consequentemente maior atividade enzimática, como resultado da proporção de celulose e hemicelulose do farelo da casca do milho,  $55,75\% \pm 2,4$ ,  $12,93\% \pm 2,4$  FPU/mL respectivamente, que possuem maior concentração comparado com o farelo da palha de arroz,  $38,33\% \pm 0,96$  e  $19,73\% \pm 0,96$  FPU/mL.

#### 4.6. Avaliação do tempo de FES com atividade enzimática

A Figura 4.11 mostra o efeito do tempo de FES na atividade enzimática. Os resultados para os dois fungos avaliados mostram que o melhor tempo de FES foi de 72 horas.

Figura 4.11 - Efeito do tempo de FES com a atividade enzimática.



Este resultado pode estar relacionado com a umidade que ao passar do tempo, após as 72h a manutenção desta umidade do meio pode se reduzir e comprometer a formação de metabólitos e a escassez de nutrientes necessários ao metabolismo do microrganismo. E antes das 72h o microrganismo está adaptando ao meio e iniciando o metabolismo (GASPAROTTO et al., 2014).

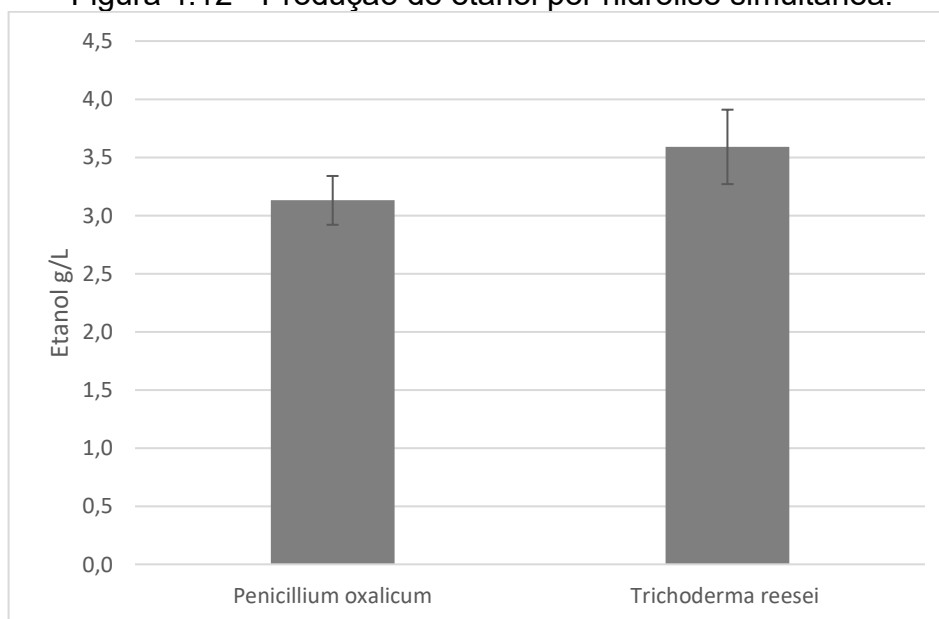
Rodriguez-Zúniga et. al (2011) avaliaram a produção de celulases por *Aspergillus niger* em FES nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas e obtiveram o melhor tempo para a FES em 72 h. GASPAROTTO et al., (2014) avaliando o uso de *Trichoderma reesei* por FES, encontraram que o tempo de 96 h maximizou a produção da atividade enzimática.

#### 4.7. Avaliação da produção de Etanol

A Figura 4.12 apresenta a produção de etanol após 48h de fermentação alcoólica para os dois fungos avaliados. Neste experimento, a utilização dos

complexos enzimáticos de *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei* resultaram na produção de  $3,13 \pm 0,21$  g/L e  $3,59 \pm 0,32$  g/L de etanol, respectivamente.

Figura 4.12 - Produção de etanol por hidrólise simultânea.



Rocha et al. (2013) obtiveram o melhor resultado para a fermentação alcoólica de 11,7 g/L de etanol, após 12 h com hidrólise simultânea, utilizando como substrato 86% de subprodutos do arroz, 12% de soro de queijo e 2% de  $\text{CaCl}_2$ , nas condições de pH 4,5 e 35°C.

GROSSI (2015) utilizando como substrato filtro de cigarro com hidrólise ácida e concentrações iniciais de 17,7-18,2 g/L de glicose obteve 8,65-9,08 g/L de etanol com 25 horas de fermentação.

Fischer et al. (2014) obteve 20,6 g/L de etanol celulósico utilizando *Aspergillus niger* utilizando em hidrólise simultânea com substrato de bagaço de cana-de-açúcar tratado a explosão a vapor na condição baixa severidade com uma única fermentação alcoólica. Em avaliações iniciais alcançaram 6,5 g/L de etanol, evidenciando que as otimizações do processo são fundamentais na maximização da produção de etanol celulósico.

Comparando os resultados obtidos com a literatura pode-se notar que os valores encontrados estão abaixo do esperado. Esses valores baixos podem ser

explicados por não ter sido realizado uma otimização das condições ambientais e de composição do substrato.

## 5. CONCLUSÕES

A caracterização é um passo muito importante para avaliar e conhecer a composição química das biomassas oriundas de resíduos agroindustriais, antes de realizar qualquer aplicação destas. As frações de celulose, hemicelulose e lignina encontrados, apresentaram valores bem próximos daqueles encontrados em trabalhos que estudaram o mesmo tipo de vegetal, podendo divergir apenas a parte do resíduo da planta pesquisada.

Os teores de açúcares se fizeram compatíveis com o resultado encontrado de celulose e hemicelulose, mostrando que após a hidrólise ácida das amostras haverá uma quantidade significativa de açúcares redutores passíveis de serem aplicados na produção do E2G.

Entre os oito fungos avaliados o *Penicillium oxalicum* e *Trichoderma reesei* apresentaram-se mais promissores na produção do complexo enzimático em termos da enzima celulase (*Fpase*) para produção de E2G.

O sistema de aeração forçada durante a FES mostrou ser pouco vantajoso para produção do complexo enzimático.

A composição do meio para produção do complexo enzimático com proporção de 40% de bagaço de cana, 30% de farelo da casca do milho e 30% de resíduo da torra e trituração do café mostrou-se mais adequado para a produção do complexo enzimático com o tempo de 72h de FES.

Com a utilização do complexo enzimático obteve uma produção de etanol celulósico para *Penicillium oxalicum* de  $3,13 \pm 0,21$  g/L e *Trichoderma reesei* de  $3,59 \pm 0,32$  g/L, em fermentação batelada com *Saccharomyces cerevisiae* em 48 horas a 35°C.

Os resultados em geral encontrados neste trabalho se mostraram bastante promissores para a produção de E2G devido a presença de celulose e hemicelulose nos resíduos agroindustriais, disponíveis para serem hidrolisados em açúcares fermentescíveis. O Brasil é um grande produtor na área agrícola o que torna esses resíduos de grande interesse econômico para a produção de diversos produtos como o E2G.

O E2G tem uma grande perspectiva a médio longo prazo, devido a possibilidade do reaproveitamento de diversos resíduos agroindustriais. No entanto, a sua aplicação industrialmente tem um cenário a ser aprimorado devido aos custos elevados na obtenção dos complexos enzimáticos, além da otimização das operações envolvidas.

## **6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Avaliar as condições ambientais (temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes) na fermentação em estado sólido para a produção do complexo enzimático;
- Testar diferentes composições do meio e condições ambientais para a produção de etanol utilizando o complexo enzimático gerado.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. **Potential of rice straw for bio-refining: An overview**. Bioresource Technology. p. 29-36. Índia, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.011>
- AFONSO, L. C. **Produção de celulase por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- AKHTAR, N.; GOYAL, D.; GOYAL, A.; **Characterization of microwave-alkali-acid pre-treated rice straw for optimization of ethanol production via simultaneous saccharification and fermentation (SSF)**. Energy Conversion and Management. p. 133-144. Índia, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.06.081>
- AOAC international. (1995). **Official methods of analysis of AOAC International (16th ed.)**. Arlington, VA: AOAC International.
- ÁVILA, S.X.G. **Caracterização do resíduo da torrefação e trituração do café**. Trabalho de conclusão de curso. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas-MG, 2017.
- AZEVEDO, V. Q.; LEMONS E SILVA, C. F.; LEMÕES, J. S.; FARIAS, S. P. **Caracterização de biomassa visando à produção de etanol de segunda geração**. Revista Brasileira de Engenharia e Sustentabilidade. v. 2, n. 2, p.61-65. Pelotas – RS, 2016.
- BARRETO, A. R.; MENEZES, C. R. **Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, v. 19, n. 2, p. 1365–1391, mai./ago. 2015.
- BISWAS, R.; UELLEND AHL, H.; AHRING B. K. **Wet explosion pretreatment of sugarcane bagasse for enhanced enzymatic hydrolysis**. Biomass and Bioenerg., v. 61, p. 104-113, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.11.027>
- BIZZO, W. A.; LENÇO, P.C.; CARVALHO, D.J.; VEIGA, J. P. S. **The generation of residual biomass during the production of bio-ethanol from sugarcane, its characterization and its use in energy production**. Faculty of Mechanical Engineering, University of Campinas. Campinas, SP, Brazi, 2014.
- CAI, J.; HE, Y.; YU, X.; BANKS, S. W.; YANG, Y.; ZHANG, X.; YU, Y.; LIU, R.; BRIDGWATER, A. V. **Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass**. Renewable and Sustainable Energy Reviews. p. 309-322. China, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.03.072>

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ROCHA, G. J. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M. **Caracterização do bagaço de cana-de-açúcar in natura, extraído com etanol ou ciclohexano/etanol**. Bioquímica e Biotecnologia. Brasil-RN, 2007.

CARMO, J. R. **Produção de etanol e pectinase por *Kluyveromyces marxianus* CCT 4086 utilizando resíduos do processamento do café**. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. **Potencial do Farelo de arroz para utilização em bioprocessos**. Brasil, 2009. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.268>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: café**. SAFRA 2018, v. 5, n. 3, 2018a.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de açúcar**. SAFRA 2017/18, v. 4, n. 4, 2018b.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Conjuntura do milho**. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/anos-anteriores/conjuntura-de-milho-25\\_10\\_2016.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/anos-anteriores/conjuntura-de-milho-25_10_2016.pdf)>. Acesso em: 11 de out. 2017a.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: grãos**. SAFRA 2016/17, v. 4, n. 9, 2017b.

da COSTA, C. K. **Caracterização da biomassa residual gerada na produção de etanol de segunda geração a partir de *Arundo donax* L.** UFPEL/RS. Trabalho de conclusão de curso. Brasil – RS, 2016.

DARONCH, N. A.; ZENI, J.; SALAZAR, L. N.; TONIAZZO, G.; CANSIAN, R.L.; NYARI, N. L. D.; SILVEIRA, M. M. **Produção de celulase por *penicillium* sp. utilizando resíduo agroindustrial em fermentação em estado sólido**. In: Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, v. 1, n.3 p. 1215-1220. São Paulo, 2015. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeqic2015-177-32680-248803>

de CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; da SILVA, F. F.; SILVA, R. R.; de CARVALHO, B. M. A. **Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia**. Pesquisa Agropecuária Brasileira. v. 41, n.1, p.125-132. Brasília – DF, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000100017>

DELLA, Viviana Possamai; KUHN, Ingeborg; HOTZA, Dachamir. **Caracterização de cinza de casca de arroz para uso como matéria-prima na fabricação de refratários de sílica**. Química Nova, São Paulo, v. 24, n. 6, p. 778-782, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000600013>

EVANGELISTA, I. V. **Caracterização de resíduos agroindustriais para a produção de etanol de segunda geração**. Trabalho de conclusão de curso. Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas-MG, 2017.

FARIAS, D. **Produção de etanol de segunda geração por *Scheffersomyces stipitis* a partir de pentoses em processo extrativo à vácuo**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2014.

FILHO, S. R.; JULIANI, A. J. **Sustentabilidade da produção de etanol de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo**. Scielo. V. 27, n. 78, p 195-212. São Paulo – SP, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000200013>

FISCHER, J; LOPES, Verônica dos Santos ; Emanoela Fernanda Queiroz Santos ; Ubirajara Coutinho Filho ; CARDOSO, V. L. . **Second Generation Ethanol Production Using Crude Enzyme Complex Produced by Fungi Collected in Brazilian Cerrado (Brazilian Savanna)**. Chemical Engineering transactions, v. 38, p. 487-492, 2014.

FREITAS, W. L. C. **Estudo da casca de café como matéria prima em processos fermentativos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2016.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI, M. A.; MAZUTTI, M. A; JAHN, S. L. **Produção de enzimas celulíticas de *Trichoderma reesei* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na hidrólise enzimática de biomassa**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), Florianópolis – SC, 2014. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-1744-17777-169682>

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

GOMIDE, R. **Operações unitárias**. São Paulo: R. Gomide, 1997. SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of extractives in biomass. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42619, 2008.

GONÇALVES, F. A.; RUIZ, H. A.; SANTOS, E.V.; TEIXEIRA, J.A.; MACEDO, G.R. **Bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis* from delignified coconut fibre mature and lignina extraction according to biorefinery concept**. Renewable Energy, v. 94, p. 353-365, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.03.045>

GROSSI, E. C. **Produção de etanol de segunda geração a partir de um derivado de celulose**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Químicas e Biológicas do Instituto de Química da Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

GUPTA, V. K. **Review The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next?** Trends in Biotechnology. v. 34, n. 12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.003>

HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A. **Determination of protein contente in biomass.** National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42625, 2008.

HICKERT, L. R.; SOUZA-CRUZ, P. B.; AYUB, M. A. Z. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras.** UFRGS/RS. Dissertação de mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente. Brasil-RS, 2010.

ISLAM, M. S.; KAO, N.; BHATTACHARYAM S. N.; GUPTA, R.; BHATTACHARJEE, P. K. **Effect of low pressure alkaline delignification process on the production of nanocrystalline cellulose from rice husk.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. p. 820-834. Austrália, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.06.042>

KIM, D.; ORREGO, D.; XIMENES, E. A.; LADISCH, M. R. **Cellulose conversion of corn pericarp without pretreatment.** Bioresource Technology. p. 511-517. Estados Unidos, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.156>

KOTARSKA, K.; SWIERCZYNSKA, A.; DZIEMIANOWICZ, W. **Study on the decomposition of lignocellulosic biomass and subjecting it to alcoholic fermentation Study on the decomposition of lignocellulosic biomass.** Renewable Energy v. 75, p. 389 -394, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.10.018>

LEE, H.; LEE, Y. M.; HEO, Y. M.; LEE, J.; KIM, J. S.; KANGD, K. Y.; KIM, J. J. **Utilization of agricultural residues for enhancement of cellulolytic enzyme production and enzymatic saccharification by *Trichoderma harzianum* KUC1716.** Industrial Crops & Products, v. 109, p. 185 -191, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.08.042>

LEE, J.; VADLANI, P. V.; FAUBION, J. **Corn bran bioprocessing: Development of na integrated process for microbial lipids production.** p. 196-203. Manhattan – USA, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.065>

LEITE, R. C. C.; LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil. Novos estud.** CEBRAP, São Paulo, n. 78, p. 15-21, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-33002007000200003>

LUCARINI, A. C.; DELQUIARO, A. C. T.; VIDOCA, L. C. P. T.; BRAZ, R.; MARTINS, R. M.; ALVES, T. P. **Estudo da hidrólise enzimática da palha da cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração.** The Journal of Engineering and Exact Sciences – JCEC. v. 3, n. 2, p. 242-253, 2017. <https://doi.org/10.18540/2446941603022017242>

MANOCHIO, C.; ANDRADE, B.R.; RODRIGUEZ, R.P.; MORAES, B.S. **Ethanol from biomass: A comparative overview**. *Renew. Sustain. Energy*, v. 80, p. 743-755, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.063>

MARQUES, S.J.P.; CUNHA, M.E.T. **Produção de Álcool Combustível Utilizando Milho**. *UNOPAR Cient. Exatas Tecnol.*, Londrina, v. 7, p. 45-51, novembro, 2008.

MENDES, F. B.; ATALA, D. I. P.; THOMÉO, J. C. **Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production?**. *Renewable Energy* 114, p. 525-533, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.07.062>

MME. Ministério de Minas e Energia. **Inventário Energético de Resíduos Rurais**. Rio de Janeiro, outubro de 2014.

MOURTZINIS, S.; CANTRELL, K. B.; ARRIAGA, F. J.; BALKCOM, K. S.; NOVAK, J. M.; FREDERICK, J. R.; KARLEN, D. L. **Carbohydrate and nutrient composition of corn stover from three southeastern USA locations**. *Biomass and Bioenergy*. p. 153-158. Estados Unidos, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.11.031>

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Campina Grande – PB, 2010.

MULLER, A.J.; HUEBNER, L.; SOUZA, C.F.V. **Avaliação da Qualidade Físico-Química de Diferentes Marcas de Café Torrado Solúvel e em Pó Comercializadas na Região do Vale do Taquari/RS**. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Campus Ponta Grossa – Paraná. 2013. <https://doi.org/10.3895/S1981-36862013000100012>

NARRON, R. H.; HAN, Q.; PARK, S.; CHANG, H.; JAMEEL, H. **Lignocentric analysis of a carbohydrate-producing lignocellulosic biorefinery process**. *Bioresource Technology*. p.857-867. Estados unidos, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.207>

NOZAKI, M.H., CAMARGO, M. BARRETO, M. **Caracterização de Diaporthe citri em meios de cultura e diferentes condições de temperatura e luminosidade**. *Fitopatologia Brasileira*, v. 29, p. 429-432, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000400012>

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. **Hidrólise Enzimática de Biomassa**. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, São Paulo – SP, Brasil, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D. **Produção de enzimas por fungos em fermentação semi-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos**.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Natal, 2014.

PANARO, M. S.; de BARROS, R. R. O.; TEIXEIRA, R. S. S.; BON, E. P. S. **Pré tratamento de biomassa de cana-de-açúcar por moinho de bolas em meios seco, úmido e na presença de aditivos**. XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Campinas – SP, 2015. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeqic2015-053-31999-263833>

PEIXOTO, C. de M. **Sementes e Mudas**. Jornal Dia de Campo. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=24396&secao=Sementes%20e%20Mudas>>. Acesso em: 23 de dez. 2018.

PHITSUWAN, P.; PERMSRIBURASUK, C.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAIKON, C.; RATANAKHANOKCHAI, K. **Evaluation of fuel ethanol production from aqueous ammonia-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation**. Biomass and Bioenergy, v. 93, 150-157, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.012>

PIROTA, R. D. P. B. **Simplificação do processo de conversão de biomassa a etanol usando enzimas do meio fermentado integral de fungos filamentosos cultivados por fermentação em estado sólido**. Tese (Doutorado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. UNICAMP/SP. Dissertação de mestrado em Engenharia Química. Piracicaba, SP, 2007.

RASTOGI, M.; SHRIVASTAVA, S. **Recent advances in second generation bioethanol production: An insight to pretreatment, saccharification and fermentation processes**. Renewable and Sustainable Energy Reviews v.80, p. 330–340, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.225>

RASTOGI, S.; SONI, R.; KAUR, J.; SONI, S. K. **Unravelling the capability of *Pyrenophora phaeocomes* S-1 for the production of ligno-hemicellulolytic enzyme cocktail and simultaneous bio-delignification of rice straw for enhanced enzymatic saccharification**. Bioresource Technology. p. 458-469. Chandigarh – India, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.012>

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2010.

ROCHA, N.R.A.F.; BARROS, M.A.; FISCHER, J.; FILHO, U.C.; CARDOSO, V. L. **Ethanol production from agroindustrial biomass using a crude enzyme complex**

**produced by *Aspergillus niger***. Renewable Energy, v. 57, p. 432–435, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.01.053>

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; FARINAS, C. S.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S.; CRESTANA, S. **Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800018>

RODRIGUEZ-ZUNIGA, U.F. **Desenvolvimento de um bioprocesso para produção de celulases específicas na cadeia produtiva do etanol de segunda geração**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, 2010.

ROMÃO, D. R. **Potencial de Fibras de resíduo agrícola: palha de milho (*Zea mays* L.) para a produção de celulose**. UnB/DF. Trabalho de Conclusão de Curso. 46 p. Brasília, DF, 2015.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. **Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos**. VI Congresso brasileiro de Engenharia Química em iniciação científica. Brasília, 2005.

SALES, M. R.; RIBEIRO, MOURA, R. B. DE.; PORTO, T. S.; MACEDO, G. R. DE.; PORTO, A. L. F. **Variáveis que influenciam a produção de celulases e xilanase por espécies de *Aspergillus***. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, Nov. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001100009>

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, 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**. Quím. Nova, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500025>

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J.H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. **Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico**. Quim. Nova, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100011>

SANTOS, M. S. R. **Estudo de pré - tratamentos de palha e sabugo de milho visando a produção de etanol 2G**. UFAL. Dissertação de mestrado. Brasil - AL, 2014. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0527-25091-165929>

SANTOS, R. C.; SILVA, D. F.; RODRIGUES, C. N.; OLIVANETO, P. **Produção de enzimas celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma reesei* CCT2768 e *Aspergillus fumigatus* isolado**. Universidade Estadual Paulista UNESP – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Depto. Ciências Biológicas, 2017.

## Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

---

SANTOS, T.C.; Amorim, G. M.; Bonomo, R. C. F.; Franco, M. **Determinação da atividade de CMCase e FPase do estipe fúngica *Rhizopus sp.* através da bioconversão do resíduo de seriguela (*Spondias purpúrea L.*)**. Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde, v.13, p.145-149, 2011.

SANTOS-ROCHA, M. S. R.; SOUZA, R. B. A.; SILVA, G. M.; CRUZ, A. J. G.; ALMEIDA, R. M. R. G. **Pré-tratamento hidrotérmico de resíduos do milho visando à produção de etanol de segunda geração**. Scientia Plena, v13, n.3, 2017.  
<https://doi.org/10.14808/sci.plena.2017.034202>

SASAKI, K.; OKAMOTO, M.; SHIRAI, T.; TSUGE, Y.; FUJINO, A.; SASAKI, D.; MORITA, M.; MATSUDA, F.; KIKUCHI, J.; KONDO, A. **Toward the complete utilization of rice straw: Methane fermentation and lignina recovery by a combinational process involving mechanical milling, supporting material and nanofiltration**. Bioresource Technology. p.830-837. Japão, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.029>

SEAPA. Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Milho**. Disponível em:  
<[http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq\\_Relatorios/Agricultura/2017/Nov/perfil\\_milho\\_nov\\_2017](http://www.agricultura.mg.gov.br/images/Arq_Relatorios/Agricultura/2017/Nov/perfil_milho_nov_2017)>. Acesso em: 15 de ago. 2018.

SHIRKAVAND, E.; BAROUTIAN, B.; GAPES, D. J.; YOUNG, B. R. **Combination of fungal and physicochemical processes for lignocellulosic biomass pretreatment – A review**. Renew and Sustainable Energy Reviews, v. 54 p. 217–234, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.10.003>

SILVA, C. C. F.; CALIARI, M.; SOARES, M. S. **Caracterização química de farelo de arroz *in natura* e extrusado**. 2010.

SILVA, D. P.; GELLEN, L. F. A.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SCHEIDT, G. N. **Potencial de produção de lipases e fosfolipases por *Trichoderma harzianum* para a indústria de alimentos**. Evidência, Joaçaba v. 14 n. 1, p. 69-78, 2014.

SILVA, M. D. **Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays L.*)**. Dissertação. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2018.

SILVA, R. F.; ASCHERI, J. L. R.; R. G. F. A. PEREIRA; **Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e pó de café**. Alim. Nutr., Araraquara. v.18, n.3, p. 325-330, jul./set. 2007.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignina in biomass**. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42618, 2012.



SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of ash in biomass**. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42622, 2008a.

SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. **Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples**. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-510-42621, 2008b.

SOUZA, G. Q. **Caracterização química do *Arundo donax* para a obtenção de etanol 2G**. Trabalho de Conclusão de Curso. Brasília – DF, 2014.

SZCZERBOWSKI, D.; PITARELO, A. P.; FILHO, A. Z.; RAMOS, L. P. **Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate components of bagasse and straw**. Carbohydrate Polymers. p.95-101. Brasil, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.052>

UDOP. **União dos produtores de bioenergia**. Disponível em:<<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1164183>>. Acesso em: 18 de jan. 2019.

UNICA. **União da Indústria da Cana-de-açúcar**. Disponível em:<<http://www.unica.com.br>>. Acesso em: 13 de out. 2017.

VEIGA, T. R. L. A. **Síntese e caracterização de biocarvões de biomassa de casca de café e de madeira de eucalipto**. 2016. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

VIEIRA, A. C. **Caracterização da biomassa proveniente de resíduos agrícolas**. PPG/EA – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Dissertação. Cascavel – PR, 2012.

VIEIRA, A. C.; de SOUZA, S. N. M.; BARICCATTI, R. A.; SIQUEIRA, J. A. C.; NOGUEIRA, C. E. C. **Caracterização da casca de arroz para a geração de energia**. Revista Varia Scientia Agrárias. v. 03, n. 01, p. 51-57. Brasil-SP, 2011.

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. UFSCar/SP. Dissertação de mestrado. 48 p. São Carlos, SP, 2011.

ZABED, H.; SAHU, J.N.; SUELY, A.; BOYCE, A.N. FARUQ, G. **Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.71, p. 475-501, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.076>

ZAMBOM, M. A.; ALCALDE, C. R.; da SILVA, K. T.; de MACEDO, F. de A. F.; RAMOS, C. E. C. O.; PASSIANOTO, G. de O. **Desempenho e digestibilidade**

**dos nutrientes de rações com casca do grão de soja em substituição ao milho para cabras Saanen em lactação e no pré-parto.** Revista brasileira de Zootecnia. Maringá-PR, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008000700024>

ZHENG, W.; ZHENG, Q.; XUE, Y.; HU, J. GAO, M. T. **Influence of rice straw polyphenols on cellulase production by *Trichoderma reesei*.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 123, n. 6, p. 731-738, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.01.009>

## 8. APÊNDICE

Apêndice (A1) descrição do cálculo para a atividade enzimática.

Atividade enzimática FPU/mL

$$\frac{FPU}{mL} = \frac{(Absorbancia-Branco) \times (C_{DNS}) \times V_T}{T_R \times 0,18 \times V_E}$$

Sendo:

$C_{DNS}$  = Coeficiente da Curva padrão DNS

$T_R$  = Tempo de reação de hidrólise = 60 min

$V_T$  = Volume total (enzima + tampão) = 0,5 enzima + 1 mL de tampão = 1,5 mL

0,18 = 1  $\mu$ mol de glicose

$V_E$  = Volume da amostra de enzima (ml) = 0,5 mL