



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO  
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS  
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

**JOSÉ RENATO GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR CO-CULTIVO DE FUNGOS**

**SUMÉ – PB**

**2016**

**JOSÉ RENATO GUIMARÃES**

**PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR CO-CULTIVO DE FUNGOS**

Monografia apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Jean Cesar Farias de Queiroz

**SUMÉ – PB**

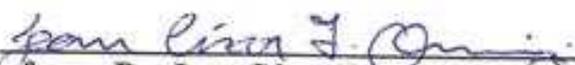
**2016**

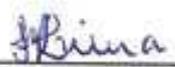
**JOSÉ RENATO GUIMARÃES**

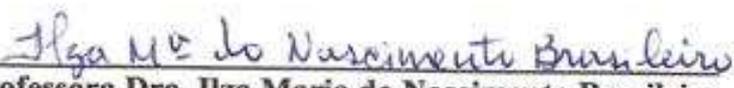
**PRODUÇÃO DE BIOETANOL POR CO-CULTIVO DE FUNGOS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz**  
**Orientador – UAEB/CDSA/UFCG**

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Dra. Lenilde Mérgia Ribeiro Lima**  
**Examinadora I – UAEB/CDSA/UFCG**

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Dra. Ilza Maria do Nascimento Brasileiro**  
**Examinadora II – UATEC/CDSA/UFCG**

**Trabalho aprovado em 01 de Junho de 2016.**

**SUMÉ - PB**

G963p    Guimarães, José Renato.  
          Produção de bioetanol por co-cultivo de fungos. / José Renato  
          Guimarães. Sumé - PB: [s.n], 2016.

57 f.

Orientadora: Professor Dr. Jean Cesar Farias de Queiroz

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro  
de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia  
de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Cultivo de fungos. 3. Bioetanol. I. Título.

CDU: 60(043.1)

Dedico este trabalho aos meus pais, Eduardo Guimarães e Maria Auxiliadora, as minhas irmãs, Márcia e Mércia Guimarães, aos meus sobrinhos, Lívia, Camila, Laís e Adriano Guimarães, a todos meus familiares.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, força superior que rege o destino de todos os seres vivos, mesmo aqueles que o considera como uma energia que transcende do inexplicável.

Aos meus pais Eduardo Guimarães e Maria Auxiliadora por terem me ensinado os princípios fundamentais para vida, respeito ao próximo, integridade, generosidade... Mas, além disso, por em momentos muitos difíceis terem buscado recursos e estratégias que pudessem suprir a necessidade do momento e de projeções que levaram às realizações do presente, uma delas a conclusão de um curso superior.

Às minhas irmãs, Márcia e Mércia Guimarães, e aos sobrinhos, Lívia, Camila, Laís e Adriano Guimarães, por terem me aturado até então, já que é uma tarefa árdua e difícil.

À minha família paterna e materna por ter confiado em meu potencial.

À família Biotec 2011.1 pelos momentos especiais que vivemos durante o tempo de convívio, mas em especial a Rosilândia Almeida, Izabela Campos, Luana Braz e Débora Tavares que nunca me deixaram desamparado quando não tinha como voltar para casa, serei grato eternamente.

A Carla Araújo pela ajuda durante a execução deste trabalho e pela amizade e momentos de felicidade que vivemos durante o tempo de convívio.

Aos professores do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, em especial aos meus orientadores de monitoria professores Aldinete Barreto, Tatiana Simões, Fabiana Pimentel e Hugo Morais, ao orientador de iniciação científica professor Ranoel Gonçalves e ao orientador do presente trabalho de conclusão de curso professor Jean Queiroz.

A todas as pessoas bondosas que me ajudaram a chegar na cidade de Prata e/ou de Sumé por meio de caronas.

Finalmente, a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de conclusão de curso, os meus agradecimentos.

“Quem vende sem riscos triunfa sem glorias”

**Augusto Cury**

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

**Cora Coralina**

## RESUMO

O grande desafio para a produção de etanol de segunda geração consiste em buscar estratégias que possibilitem a bioconversão dos polissacarídeos presentes nos materiais lignocelulósicos em carboidratos simples. Neste sentido, os conhecimentos da área biotecnológica vêm atuando no desenvolvimento de configurações de processo que atuam na eficiência do rendimento em açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol. Assim, o objetivo do presente estudo foi desenvolver um processo para produção de etanol de segunda geração, a partir da biomassa lignocelulósica, utilizando co-cultivo de fungos. Foram abordadas duas condições de cultivo para favorecer a utilização dos microrganismos envolvidos no processo. Na primeira etapa, em condição aeróbia, o fungo filamentosso CDSA12 foi induzido a sintetizar enzimas capazes de hidrolisar os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Na segunda etapa, em condição anaeróbia, a *Saccharomyces cerevisiae* JP1 metabolizou os carboidratos bioconvertidos pelas enzimas celulolíticas em etanol. O mosto foi constituído pelo bagaço *in natura* no Experimento 1 e pelo bagaço pré-tratado hidrotermicamente no Experimento 2. Os resultados mostram que o processo de produção de bioetanol por co-cultivo de fungos é eficiente para reduzir os custos vinculados à utilização de enzimas comerciais para a hidrólise da celulose. O fungo CDSA12 foi capaz de excretar a enzima carboximetilcelulase (CMCase) apresentando a mesma atividade enzimática de 0,465 e 0,54 U.mL<sup>-1</sup> para os Experimentos 1 e 2, respectivamente. Durante todo o processo, o pH permaneceu na faixa ótima para a produção de CMCase quando sintetizada a partir de fungo filamentosso. Os polissacarídeos hidrolisados (Açúcar Redutor - AR) apresentaram concentração máxima de 18,89 e 18,83 g.L<sup>-1</sup> nos Experimentos 1 e 2, respectivamente. Nos Experimentos 1 e 2 o rendimento referente a conversão de celulose em etanol foi de 0,341 e 0,182 g.g<sup>-1</sup>, enquanto a produtividade em etanol foi de 0,244 e 0,391 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectivamente. Portanto, a configuração do processo de produção de bioetanol por co-cultivo de fungos torna-se viável para reduzir os custos operacionais do sistema produtivo.

**Palavras-Chave:** Etanol de Segunda Geração. Fungos da Caatinga. Carboximetilcelulase; Bioprocesso.

## ABSTRACT

The great challenge for second generation ethanol is to find strategies that allow the bioconversion of polysaccharides in lignocellulosic materials in simple carbohydrates. In this regard, the knowledge of the biotechnology field has been acting on the development process configurations that operate on performance efficiency of fermentable sugars for bioethanol production. The aim of the present study was to develop a process for second generation ethanol production from lignocellulosic biomass using co-cultivation fungi. Two growing conditions were addressed to enhance the use of microorganisms involved in this process. The first step was in aerobic condition, driven the CDSA12 filamentous fungus to synthesize enzymes that hydrolyze polysaccharides to fermentable sugars. At the second stage, in anaerobic condition JP1 *Saccharomyces cerevisiae* metabolize carbohydrates converted by cellulolytic enzymes producing ethanol. The broth was constituted by the in natura bagasse at Experiment 1 and by hydrothermally pretreated bagasse at Experiment 2. The results show that the ethanol production process by fungi co-culture is effective to reduce the costs connected to the use of commercial enzymes for the hydrolysis of cellulose. The CDSA 12 fungus was capable to secrete the enzyme carboxymethylcellulose (CMCase) producing the same enzymatic activity about 0.465 and 0.54 U.mL<sup>-1</sup> at Experiments 1 and 2, respectively. Throughout the entire process, the pH remained in the optimum range to produce CMCase when synthesized from filamentous fungi. The hydrolysates polysaccharide (Reducing Sugar - RS) presented a maximum concentration of 18.89 and 18.83 g.L<sup>-1</sup> at Experiments 1 and 2, respectively. At Experiments 1 and 2 the yield relating to conversion of cellulose to ethanol was 0.341 and 0.182 g.g<sup>-1</sup>, while ethanol productivity was 0.244 and 0.391 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, respectively. Therefore, the configuration of the bioethanol production process by fungi co-cultivation is feasible to reduce the operating costs of the production system.

**Keywords:** Second Generation Ethanol. Caatinga's Fungi. Carboxymethylcellulose. Bioprocess.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Modelo da estrutura dos principais constituintes de materiais lignocelulósicos. ....   | 20 |
| <b>Figura 2</b> - Modelo estrutural de microfibrila de celulose com os polímeros de glicose fortemente alinhados e ligados entre si por ligações não covalentes e interações hidrofóbicas.....   | 21 |
| <b>Figura 3</b> - Estrutura parcial da hemicelulose mostrando a conformação da cadeia linear e ramificada desse polissacarídeo.....  | 22 |
| <b>Figura 4</b> - Álcoois precursores para a formação da estrutura da lignina.....   | 23 |
| <b>Figura 5</b> - Esquema que mostra o efeito do pré-tratamento na estrutura espacial dos materiais lignocelulósicos com conseqüente dissociação do complexo lignina-celulose e redução da cristalização da celulose.....  | 24 |
| <b>Figura 6</b> - Representação esquemática da ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulasas composto por endoglicanases, exoglucanases e $\beta$ -glucosidase para proporcionar o rompimento das ligações da celulose nas regiões amorfas e cristalina. ....   | 27 |
| <b>Figura 7</b> - Fluxograma do processo de produção de bioetanol por co-cultivo de fungos. O processo iniciou-se com o preparo do material lignocelulósico: moagem e lavagem (1); pré-tratamento (2); preparo do mosto e co-fermentação dos fungos (3); co-cultivo do isolado fúngico CDSA12 e hidrólise enzimática (4); co-fermentação do hidrolisado enzimático por meio da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JP1 (5); clarificação do mosto fermentado e determinação dos Sólidos Solúveis Totais, Açúcares Redutores e Atividade celulolítica (6) e finalmente a destilação e quantificação de etanol (7). .... | 39 |
| <b>Figura 8</b> - Perfil da massa retida nas peneiras Tyler do bagaço da cana-de-açúcar <i>in natura</i> (MBIN).....   | 42 |
| <b>Figura 9</b> - Perfil cinético do processo de produção de Carboximetilcelulase (CMCase) por fermentação submersa utilizando o isolado CDSA12 para hidrólise do bagaço da cana visando a produção de bioetanol.....  | 43 |
| <b>Figura 10</b> - Perfil cinético dos Açúcares Redutores (AR) para os processos fermentativos utilizando o isolado fúngico CDSA12. ....   | 46 |
| <b>Figura 11</b> - Perfil cinético do teor de Sólidos Solúveis (SST) para o processo de co-cultivo de fungos visando à produção de bioetanol. ....   | 48 |
| <b>Figura 12</b> - Perfil do potencial hidrogeniônico (pH) para o co-cultivo de fungos visando a produção de bioetanol. ....   | 49 |

**Figura 13** - Perfil cinético da concentração de etanol produzido pela *Saccharomyces cerevisiae* JP1 a partir dos açúcares fermentescíveis biodisponibilizados durante o co-cultivo dos fungos. Esse perfil tem início após o décimo dia da fermentação com o isolado fúngico CDSA12. .... 50

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1 - Composição do meio de cultivo utilizado na ativação do isolado fúngico CDSA12.....            | 35 |
| Tabela 2 - Composição química da amostra do bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i> .....              | 40 |
| Tabela 3 - Parâmetros cinéticos envolvidos na produção de bioetanol por meio do co-cultivo de fungo..... | 51 |

## ABREVIATURA E SIGLAS

|             |  |
|-------------|--|
| AR          | Açúcar Redutor                                 |
| BDA         | Batata, Dextrose e Ágar                        |
| CBH         | Celobiohidrolases                              |
| CBH I       | Celobiohidrolases redutoras                    |
| CBH II      | Celobiohidrolases não redutoras                |
| CBM         | Modulo de Ligação de Carboidratos              |
| CBMs        | Módulo de ligação a carboidratos               |
| CBP         | Bioprocessos Consolidado                       |
| CMCase      | Carboximetilcelulase                           |
| $D_i$       | Diâmetro da abertura da peneira                |
| $D_m$       | Diâmetro médio da partícula                    |
| DNS         | Ácido Dinitrosalicílico                        |
| $r_p$       | Velocidade instantânea de produção em etanol   |
| $r_s$       | Velocidade instantânea de consumo de substrato |
| FPase       | Atividade Papel Filtro                         |
| $\log(r_0)$ | Índice de severidade                           |
| MAS         | Massa da amostra seca                          |
| MAU         | Massa da amostra úmida                         |
| MBIN        | Massa do bagaço <i>in natura</i>               |
| MCAC        | Conjunto cadinho/amostra calcinada             |
| MRAS        | Conjunto recipiente/amostra seca               |
| MRAU        | Conjunto recipiente/amostra úmida              |
| MRS         | Funil de vidro sinterizado seco                |
| pH          | Potencial Hidrogeniônico                       |
| PM          | Peso Molecular                                 |

|          |   |
|----------|---|
| $P_p$    | Produtividade em etanol                   |
| SSCF     | Sacarificação e Co-fermentação Simultânea |
| SSF      | Sacarificação e Fermentação Simultânea    |
| SST      | Teor de Sólidos Solúveis                  |
| TA       | Teor de $\alpha$ -celulose                |
| TC       | Teor de cinzas                            |
| TE       | Teor de extrativos                        |
| TH       | Teor de holocelulose                      |
| TL       | Teor de lignina                           |
| TU       | Teor de umidade                           |
| U        | Unidade de Atividade Enzimática           |
| UFMG     | Universidade Federal de Campina Grande    |
| $V_f$    | Volume final da reação                    |
| $V_i$    | Volume da amostra                         |
| $Y_{ps}$ | Rendimento de substrato em produto        |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....  | 17 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....   | 18 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....   | 18 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 18 |
| <b>3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....   | 18 |
| 3.1 CANA-DE-AÇÚCAR .....   | 18 |
| 3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: FONTE DE BIOENERGIA .....                      | 19 |
| 3.2.1 Celulose .....   | 20 |
| 3.2.2 Hemicelulose .....   | 21 |
| 3.2.3 Lignina .....  | 22 |
| 3.2.4 Outras substâncias .....   | 23 |
| 3.3 PRÉ-TRATAMENTOS.....   | 24 |
| 3.4 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA .....                              | 25 |
| 3.4.1 Microrganismos produtores de celulases.....                            | 28 |
| 3.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS E ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL ..... | 29 |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 30 |
| 4.1 MATÉRIA PRIMA .....  | 30 |
| 4.1.1 Preparação do bagaço da cana-de-açúcar .....                           | 31 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR ..             | 31 |
| 4.2.1 Granulometria .....  | 31 |
| 4.2.2 Determinação do teor de Umidade .....                                  | 32 |
| 4.2.3 Determinação do teor de cinzas .....                                   | 32 |
| 4.2.4 Determinação de extrativos.....  | 33 |
| 4.2.5 Determinação de lignina .....  | 33 |
| 4.2.6 Determinação de Holocelulose .....                                     | 33 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.2.7 Determinação de <math>\alpha</math>-celulose.....</b>          | <b>34</b> |
| <b>4.3 MICRORGANISMOS .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>4.3.1 Meio de Cultura e preparo de pré-inóculo .....</b>             | <b>35</b> |
| <b>4.4 FERMENTAÇÃO.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS .....</b>                                     | <b>36</b> |
| <b>4.5.1 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (TSS) .....</b>       | <b>36</b> |
| <b>4.5.2 Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART) .....</b>      | <b>37</b> |
| <b>4.5.3 Atividade Celulolítica (Carboximetilcelulase, CMCase).....</b> | <b>37</b> |
| <b>4.5.4 Determinação de Etanol.....</b>                                | <b>38</b> |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                   | <b>39</b> |
| <b>5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR ..</b> | <b>40</b> |
| <b>5.1.1 Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar .....</b>            | <b>42</b> |
| <b>5.2 CO-CULTIVO DE FUNGOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA .....</b>            | <b>42</b> |
| <b>5.2.1 Co-fermentação dos hidrolisados enzimáticos .....</b>          | <b>45</b> |
| <b>5.3 ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....</b>                | <b>50</b> |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>53</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O setor de bioenergia encontra-se diante de um grande desafio: o de comprovar e garantir sua sustentabilidade. Alternativas energéticas, por meio de fontes renováveis de energia, têm sido objeto de pesquisa no mundo inteiro, seja por motivos econômicos, geopolíticos ou ambientais. Neste cenário, o potencial energético da cana-de-açúcar vem sendo largamente explorado com a finalidade de suprir a significativa demanda de combustíveis que o mercado brasileiro tem requerido. Estimativas estabelecem que a produção de etanol no Brasil possa ser duplicada, sem a necessidade de aumentar áreas de cultivo de cana-de-açúcar, apenas utilizando estratégias para extração de açúcares fermentescíveis a partir do material lignocelulósico da cana (BONOMI, 2006; PEREIRA, 2008; RABELO, 2010).

Para que o material lignocelulósico seja utilizado como matéria prima fermentescível, faz-se necessária a aplicação de processo de pré-tratamento, visando aumentar a área superficial da biomassa, dissociar o complexo lignina-celulose, maximizar os rendimentos em açúcares, reduzir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade dos materiais e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores para os microrganismos fermentadores, de maneira que torne a biomassa susceptível à hidrólise. Os processos empregados podem ser físicos, químicos, biológicos ou combinados (DIAS, 2011).

A hidrólise da celulose presente na biomassa é o principal processo para que os monômeros liberados sejam utilizados na produção de bioetanol. Este processo pode ser realizado por meio da hidrólise com ácidos minerais, enzimas ou água comprimida a alta pressão. Recentemente, a utilização de catalisadores enzimáticos tem sido investigada. Neste processo de catálise da celulose um grupo de enzimas denominadas celulases rompem as ligações glicosídicas das microfibrilas de celulose, liberando oligossacarídeos, celbiose e glicose. Uma das vantagens de utilizar a hidrólise enzimática é que as condições operacionais envolvidas no processo são conduzidas de maneira mais brandas e conseqüentemente uma menor quantidade de subprodutos é gerada, favorecendo alto rendimento dos açúcares fermentescíveis. Outra vantagem é a questão ambiental, pois os catalisadores, sintetizados por microrganismos encontrados em ambientes ricos em celulose, não causam nenhum impacto quando descartados no meio ambiente ao final do processo (DILLON, 2004; SILVA et al., 2012).

Desta forma, a indústria de biorrefinaria conta com a biotecnologia para encontrar novas alternativas para a produção de etanol de segunda geração utilizando processos eficientes, que sejam economicamente e sustentavelmente viáveis.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo para produção de etanol de segunda geração, a partir da biomassa lignocelulósica, utilizando co-cultivo de fungos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Neste trabalho, foram considerados como objetivos específicos:

- Desenvolver uma configuração para o processo de produção de bioetanol utilizando co-cultivo;
- Avaliar o desempenho da produção de bioetanol por meio do co-cultivo de duas espécies de microrganismos, o isolado fúngico CDSA12 e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1;
- Determinar o comportamento cinético da produção de carboximetilcelulase pelo isolado fúngico CDSA12;
- Determinar cinética dos açúcares fermentáveis durante o período de hidrólise enzimática;
- Desenvolver um processo para produção de etanol de segunda geração, que possibilite a eliminação do uso de enzimas purificadas, levando à redução dos custos de produção industrial.

## **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1 CANA-DE-AÇÚCAR**

A cana-de-açúcar, cujo nome científico é *Saccharum officinarum*, é uma planta da Família Poaceae, representada pelo milho, sorgo, arroz e muitas outras gramíneas. A cana é

composta por partes subterrâneas (raízes e rizomas) e aéreas (colmo, folhas e flores). Estruturalmente, consiste de vários tipos de tecidos tais como córtex, tecido parenquimatoso e hastes fibrovasculares. É composta, principalmente, por água, açúcares e fibras. A água e os açúcares se concentram nos colmos, sendo a sacarose o carboidrato predominante, enquanto, as fibras estão distribuídas por todo o vegetal. A composição química da cana é bastante variável quanto à proporção dos elementos, porém exibe regularidades em todas as variedades, seja quantitativa e/ou qualitativamente (SCHLITTLER, 2006).

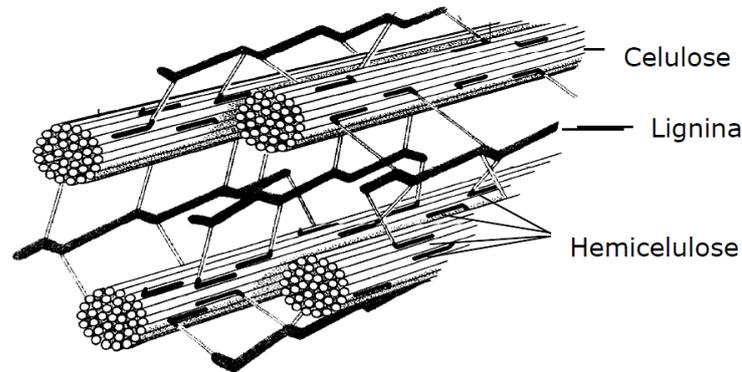
O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo cujo destino final é a utilização do caldo para produção de açúcar e álcool etílico. Após a extração do caldo, o resíduo lignocelulósico excedente pode ser queimado para a geração de energia térmica e subsequentemente, elétrica. No entanto, a composição química do bagaço, geralmente 36% de celulose, 32% de hemicelulose, 19% de lignina e 13% de ceras, proteínas e cinzas, vem fazendo com que o setor industrial busque estratégias para utilização do material lignocelulósico para a produção de açúcares fermentescíveis (rota química e biológica) ou para a gaseificação deste resíduo para síntese de combustíveis líquidos (rota térmica) (RABELO, 2010; SAAD, 2010).

### 3.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: FONTE DE BIOENERGIA

As biomassas lignocelulósicas constituem o material mais abundante em nosso planeta, podendo ser obtidas de vários processos agroindustriais, tais como na produção de açúcar e etanol nas usinas sucroalcooleiras. Estes resíduos agroindustriais tornam-se atrativos para a produção de etanol, assim como de outros biocombustíveis, tendo em vista os principais constituintes presentes na estrutura que a compõe (SILVA, 2011).

Os componentes da biomassa lignocelulósica são arranjados de modo que as cadeias de celulose e hemicelulose estão fixadas pela lignina. As cadeias de celulose se mantêm compactadas por meio de ligações de hidrogênio que promovem a rigidez da planta, enquanto a lignina circundante “gruda” os componentes e atua como agente protetor da estrutura celulósica proporcionando barreira física contra o ataque enzimático, microbiológico e da água. A hemicelulose proporciona a ligação entre a celulose e a lignina formando assim a rede fibrosa. Estes obstáculos impedem o processo de hidrólise da celulose de materiais lignocelulósicos (RABELO, 2010). A Figura 1 apresenta um modelo dos principais constituintes de materiais lignocelulósicos.

Figura 1 - Modelo da estrutura dos principais constituintes de materiais lignocelulósicos.



Fonte: LEE, 1997.

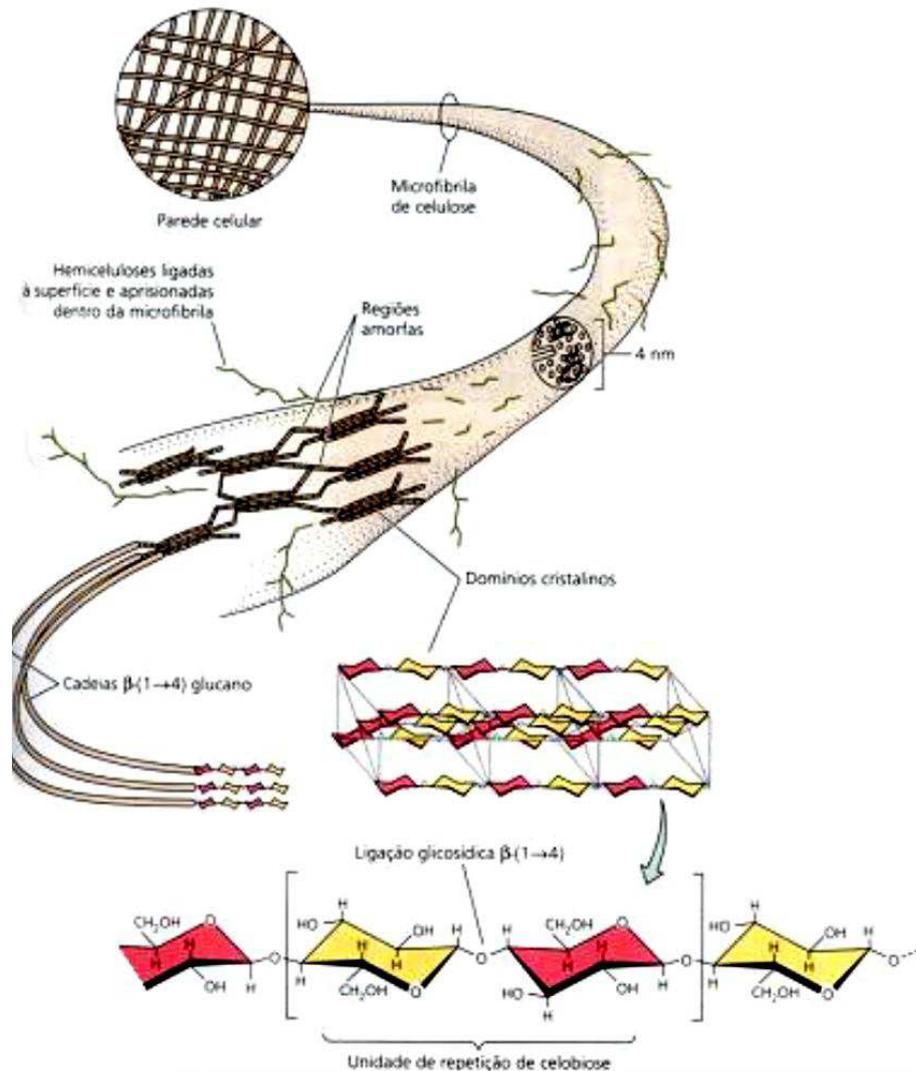
### 3.2.1 Celulose

A celulose é o principal constituinte dos materiais lignocelulósicos, presente na maior parte da parede celular dos vegetais. Este polímero, responsável por 23 a 50% da matéria seca da biomassa é um homopolissacarídeo linear formado por anéis de  $\beta$ -D-glicopiranosose unidas por ligações do tipo  $\beta$ -D (1,4) glicosídicas, de fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , cuja unidade repetitiva é a celobiose (LEMOS, 2001; RABELO, 2010).

Quimicamente, a celulose é formada por microfibrilas que são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular. Os glucanos (polímeros de glicose) que constituem a microfibrila da celulose estão fortemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (cristalina), que possui maior resistência à tração, ao alongamento e à solvatação e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado, a celulose é muito forte, muito estável e resistente à degradação, devido à configuração espacial alternante das ligações glicosídicas que unem resíduos de glicose adjacentes. Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por regiões amorfas menos organizadas, que possuem maior grau de flexibilidade. Dentro dos domínios cristalinos, os glucanos adjacentes estão altamente ordenados e unidos entre si por ligações não covalentes, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Quando a celulose é degradada, primeiramente são atacadas as regiões amorfas, liberando pequenas cristalitas, consideradas como correspondentes aos domínios cristalinos da microfibrila (KIMURA et al., 1999). Na Figura 2 pode ser observado o modelo estrutural de microfibrila de celulose.

Pela hidrólise da celulose são formados polímeros menores, oligossacarídeos com cadeias terminais e não redutoras que podem ser decompostos dando origem à celobiose (dissacarídeo redutor) e à glicose.

Figura 2 - Modelo estrutural de microfibrila de celulose com os polímeros de glicose fortemente alinhados e ligados entre si por ligações não covalentes e interações hidrofóbicas.



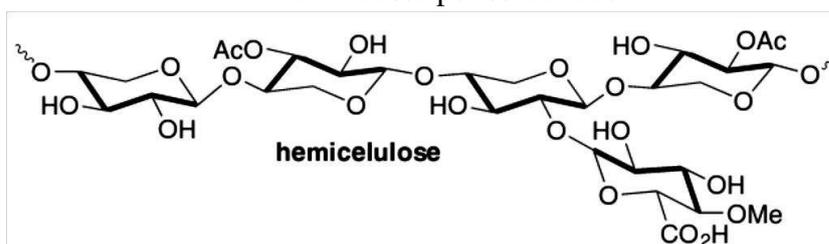
Fonte: GALLÃO, 2016.

### 3.2.2 Hemicelulose

As hemiceluloses ou polioses representam de 15 a 45% do material lignocelulósico seco e são polissacarídeos de cadeias lineares e ramificadas que estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas, mas concentram-se nas camadas primárias e

secundárias em que estão intimamente associadas à celulose e lignina (Figura 3). Elas são amorfas e possuem massa molecular relativamente baixa, depositadas de maneira intercalada nas microfibrilas de celulose, em um estágio anterior à lignificação, conferindo elasticidade e flexibilidade ao agregado de microfibrila e impossibilitando que as mesmas se toquem (AGUIAR, 2010).

Figura 3 - Estrutura parcial da hemicelulose mostrando a conformação da cadeia linear e ramificada desse polissacarídeo.



Fonte: FERREIRA et al., 2009.

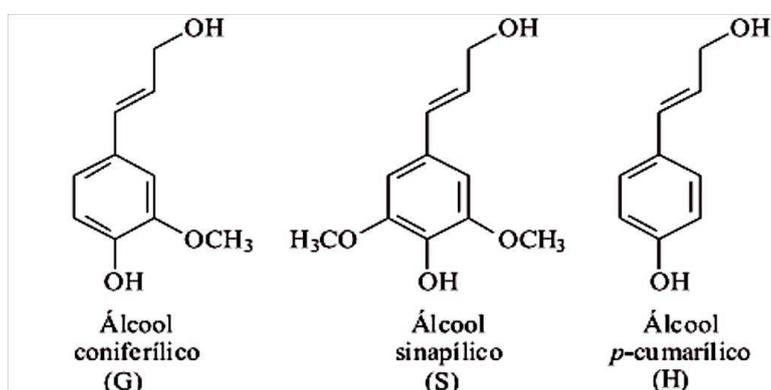
A hemicelulose é uma estrutura complexa de carboidratos, que consiste de diferentes polímeros, unidades de açúcares que podem ser subdivididas em grupos, polímeros de pentoses (xilose e arabinose) e polímeros de hexoses (manoses, glicose e galactose), além de ácidos hexurônicos e desoxiexoses, os quais apresentam maior suscetibilidade à hidrólise. Estas macromoléculas são solúveis em água e facilmente solubilizadas em solução alcalinas. Apresentam-se divididas em xilanas, mananas, galactanas e galacturonanas e suas unidades monoméricas são unidas por ligações do tipo 1,3; 1,4 e 1,6. A hidrólise da hemicelulose é mais fácil que a da celulose, porém a fermentação da xilose (açúcar de cinco carbonos) é um pouco mais difícil (CURVELO, 1992; SZENGYEL, 2000; HENDRIKS; ZEEMAN, 2008; TAVARES, 2009).

### 3.2.3 Lignina

A lignina, depois da celulose, é a macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos e representa de 20 a 30% da massa total desse material. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal e confere rigidez à parede das células, sendo composta basicamente de unidades de fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa (RABELO, 2007).

A estrutura da lignina é heterogênea, apresentando regiões amorfas e estruturas globulares. Diferentemente da celulose e hemicelulose, a estrutura da lignina não pode ser representada por uma combinação de unidades monoméricas ligadas pelo mesmo tipo de ligação química. Esta se processa pela polimerização dos álcoois cinâmicos precursores: álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico que geram unidades *p*-hidroxibenzílicas, guaiacílicas e siringílicas, respectivamente (Figura 4) (BIDLACK et al., 1992; RABELO, 2007).

Figura 4 - Álcoois precursores para a formação da estrutura da lignina.



Fonte: BARBOSA et al., 2008.

A presença e distribuição da lignina nos materiais lignocelulósicos constitui o fator responsável pela recalcitrância desse material. Esta molécula confere grande resistência ao ataque de microrganismos e limita a acessibilidade de enzimas hidrolíticas como a celulase e a xilanase entre outras, em atuarem nos sítios de ataque enzimático devido ao reduzido tamanho dos capilares da biomassa, restringindo o ataque à superfície externa nas fontes de carbono e impedindo a absorção de polissacarídeos por meio de micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para a formação de frutificação (DURRANT et al., 1991; RAJARATHNAM et al., 1992; VÁSQUEZ et al., 2007; CARDOSO et al., 2012).

### 3.2.4 Outras substâncias

Existem outras substâncias presentes na biomassa lignocelulósica que não são parte da parede celular, dentre as quais se destacam: terpenos, polímeros de isopreno; resinas, tais como óleos, ácidos graxos, álcoois, resinas ácidas e fitosterol; fenóis, representados pelos

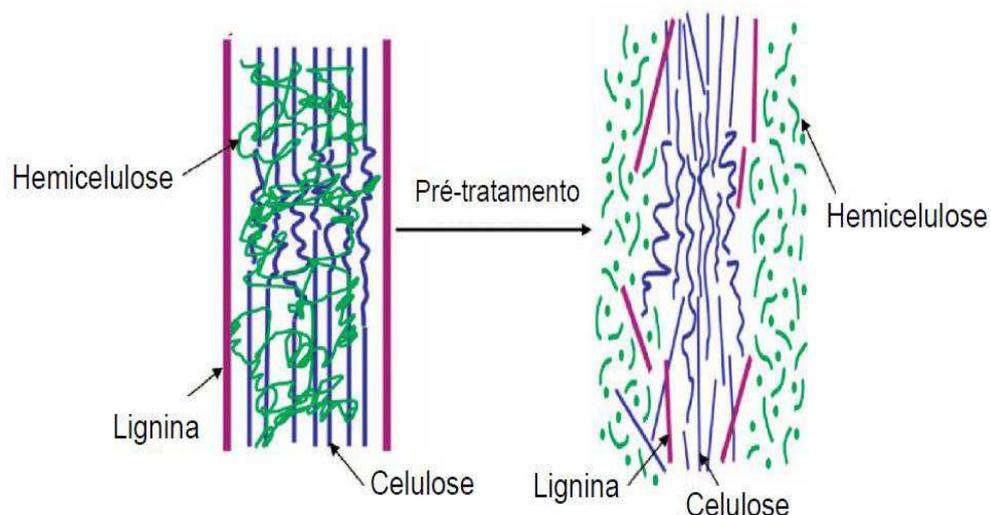
taninos; alcaloides e lignina solúvel, tais como, resíduos inorgânicos, representados por carbonatos alcalinos, alcalinos terrosos e oxalatos (KLASS, 1998; KLINKE et al., 2004).

### 3.3 PRÉ-TRATAMENTOS

O pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é uma etapa operacional do processo de produção de bioetanol que influencia consideravelmente os custos das etapas anteriores e posteriores do processo produtivo. O objetivo do pré-tratamento é aumentar a área superficial da biomassa, dissociar o complexo lignina-celulose, maximizar os rendimentos em açúcares, reduzir o grau de cristalinidade da celulose, aumentar a porosidade dos materiais e evitar ou minimizar a formação de compostos inibidores para os microrganismos fermentadores (HSU, 1996; SUN; CHENG, 2005).

O pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas, o qual seu esquema de transformação está representado na Figura 5, pode ser classificado em três grupos principais: físicos, químicos, biológicos, além de possível combinação entre eles. No entanto, verifica-se a crescente necessidade de desenvolver alternativas tecnológicas mais eficientes em termos de custo global e competitividade econômica (SUN; CHENG, 2002; MOISIER et al., 2005; BAUDEL, 2006).

Figura 5 - Esquema que mostra o efeito do pré-tratamento na estrutura espacial dos materiais lignocelulósicos com conseqüente dissociação do complexo lignina-celulose e redução da cristalização da celulose.



Fonte: ARRUDA, 2011.

No caso dos pré-tratamentos químicos as características de cada processo são variadas. No pré-tratamento ácido ocorre a solubilização do componente hemicelulósico da biomassa, provocando a desacetilação e despolimerização da fração hemicelulósica. Já no pré-tratamento alcalino, empregado após o pré-tratamento ácido, ocorre a remoção de hemicelulose e de lignina da biomassa, o que provoca o desenovelamento da estrutura lignocelulósica, separando as ligações entre lignina e carboidratos, reduzindo o grau de polimerização e cristalinidade, aumentando a porosidade do material (BAUDEL, 2006).

Os pré-tratamentos físico-químicos são utilizados para aumentar a suscetibilidade do material ao ataque enzimático e caracterizam-se por processos que submetem a biomassa a condições ambientais extremas de pressão e temperatura. Entre os pré-tratamentos deste tipo destacam-se: a explosão a vapor ou auto-hidrólise, processo com vapor de água saturado em alta pressão, seguido de uma despressurização quase instantânea, evento que permite a solubilização das frações hemicelulósicas, a transformação da lignina e o aumento da suscetibilidade da celulose à posterior hidrólise; e a explosão por amônia, processo que permite o aumento da taxa de sacarificação da celulose quando a biomassa é tratada com amônia.

Por fim, nos pré-tratamentos biológicos são utilizadas enzimas hidrolíticas ou microrganismos capazes de sintetizá-las para atuarem sob o sítio de ataque enzimático presente no material, quebrando assim as ligações que conferem a estrutura e conformação da matriz lignocelulósica (SUN; CHENG, 2002). Neste pré-tratamento os catalisadores utilizados no processo não causam impactos sob o meio ambiente e ainda podem ser recuperados para serem reutilizados, no caso das enzimas estarem ativas.

### 3.4 HIDRÓLISE DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Existem basicamente três técnicas que possibilitam a obtenção de carboidratos fermentescíveis a partir da biomassa lignocelulósica: hidrólise com ácido diluído, hidrólise com ácido concentrado e hidrólise enzimática (RABELO, 2010).

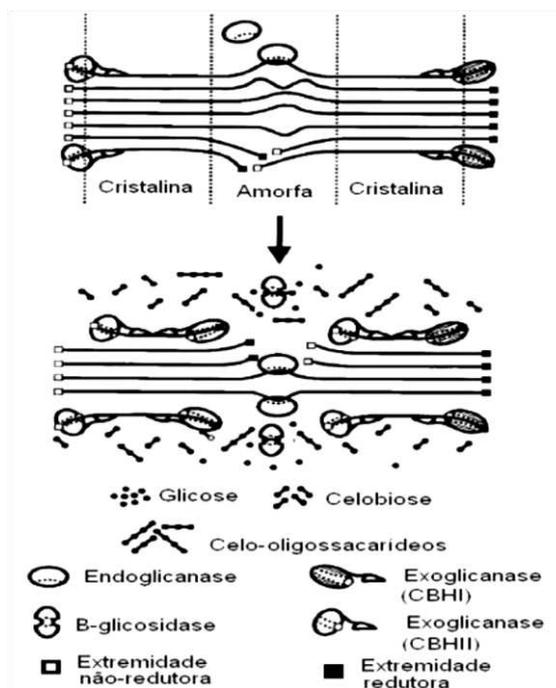
Na hidrólise com ácido concentrado, as porções da hemicelulose e da celulose presentes na biomassa lignocelulósica são quebradas por meio de soluções aquosas de ácidos minerais fortes (ácido sulfúrico, clorídrico ou fosfórico) em condições brandas de temperatura (inferiores a 100 °C). Em decorrência das frações de hemicelulose serem hidrolisadas mais rapidamente que as frações de celulose, os monossacarídeos liberados da hemicelulose são

expostos no meio reacional por muito tempo, o que leva à degradação e, conseqüentemente, perda desses açúcares. Por ser um processo que utiliza ácidos fortes, os equipamentos operacionais precisam possuir a característica de elevada resistência à corrosão (SZENGYEL, 2000).

No processo com ácido diluído, partes das frações da hemicelulose e da celulose são hidrolisadas separadamente. Após o primeiro passo da hidrólise, a hemicelulose hidrolisada pode ser removida do meio reacional, possibilitando a recuperação dos carboidratos liberados nesta etapa. No entanto, na segunda etapa o processo operacional requer condições drásticas de temperaturas, evento que leva à formação de produtos inibitórios devido à degradação de alguns açúcares e lignina solúveis, favorecendo assim à produção de ácidos orgânicos que levam à inibição do metabolismo do microrganismo envolvido na fermentação alcoólica. Uma desvantagem do processo é a utilização de altas concentrações de enzimas para atingir proporcional conversão de celulose, fator que aumenta os custos de produção (CLARK; MACKEL, 1984; LARSSON et al., 1998; WYMAN, 1994).

No processo enzimático, a catálise da celulose ocorre por meio de um grupo de enzimas denominadas celulasas, as quais rompem as ligações glicosídicas das microfibrilas de celulose, liberando oligossacarídeos, celobiose e glicose (Figura 6). Devido às condições operacionais envolvidas no processo serem conduzidas de maneira mais brandas, uma menor quantidade de subprodutos é gerada, favorecendo alto rendimento dos açúcares fermentescíveis. Várias características da biomassa lignocelulósica são importantes no processo de hidrólise enzimática, dentre as quais se destacam: cristalização da celulose, grau de polimerização, volume da área superficial, tamanho da partícula, quantidade de lignina e presença de grupos acetil (EKLUND et al., 1990; SEWALT et al., 1997; DILLON, 2004).

Figura 6 - Representação esquemática da ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases composto por endoglicanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidase para proporcionar o rompimento das ligações da celulose nas regiões amorfas e cristalina.



Fonte: MELO, 2010.

A ação sinérgica dos componentes individuais do sistema de celulases composto por endoglicanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidase proporciona melhor hidrólise da biomassa lignocelulósica. Segundo Martins (2005), as endoglicanases hidrolisam as cadeias de celulose de modo aleatório, clivando as ligações glicosídicas internas da celulose e liberando oligossacarídeos de vários comprimentos. Essas enzimas hidrolisam a celulose amorfa e celuloses solúveis. Oyekola et al. (2007) afirmam que as exoglucanases ou celobiohidrolases (CBH) atuam nas extremidades redutoras (CBH I) e nas extremidades não redutoras (CBH II) da cadeia de celulose, produzindo majoritariamente celobiose. Essas enzimas atuam sobre celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. As  $\beta$ -glucosidases, segundo Medve (1997), também denominadas celobiasas, possuem a função de desdobrar a celobiose gerada pelas endoglicanases e celobiohidrolases em glicose, fator importante para eficiência da hidrólise da celulose e remoção da celobiose do meio reacional.

### 3.4.1 Microrganismos produtores de celulases

No processo de produção de enzimas, um microrganismo é utilizado como agente metabolizador de fontes de carbono presentes no meio de cultivo, de forma que as enzimas são sintetizadas e excretadas. Algumas bactérias são capazes de degradar celulose, dentre as aeróbias produtoras de celulase, estão as dos gêneros *Cellulomonas*, espécies de *Bacillus*, como *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus cereus*. Entre as anaeróbias estão os gêneros *Acetovibrio*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, capazes de formar um complexo multienzimático que possui celulases que atuam de modo agrupado (LYND et al., 2001; DESVAUX, 2005; TAVARES, 2009).

Os fungos ocupam papel fundamental na degradação de biopolímeros de celulose e hemiceluloses sendo por isso, essenciais para a produção de complexos enzimáticos. Eles são os mais importantes microrganismos utilizados pela indústria na produção de enzimas. As espécies de fungos produtores de celulases mais estudadas são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Humicola insolens*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriense*, *Fusarium solani*, *Myrothecium cerrucaria*, *Sporothichum* sp., *Chaetomium*, *Aspergillus niger* e também os gêneros como *Schizophyllum* sp., *Chaetomium* sp. e *Humicola* sp. Tais fungos excretam celulases de alta atividade no meio reacional (NORDISK, 1996; MENEZES, 1997; AGUIAR; MENEZES, 2000; RABELO, 2007).

As celulases, normalmente, são produzidas por duas metodologias de cultivo: em estado sólido ou semissólido e em cultivo submerso. Muitas pesquisas são conduzidas utilizando cultivo submerso, o qual permite o controle dos níveis de aeração, pH e temperatura do meio, para o crescimento ótimo do microrganismo. Contudo, a fermentação em estado sólido tem sido escolhida para a produção de enzimas lignocelulolíticas, o que se explica pelo grande número de vantagens econômicas e de processo, nos quais se destaca a natureza dos substratos utilizados como suporte e/ou fonte indutora na produção da enzima (FERREIRA, 2010).

### 3.5 PROCESSOS FERMENTATIVOS E ESTRATÉGIAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Os materiais lignocelulósicos vêm sendo estudados com o propósito de ampliar o rendimento energético da produção de combustíveis oriundos de fonte renováveis. Essa alternativa de produção tem sido elencada em decorrência do desenvolvimento de processos biotecnológicos capazes de converter os constituintes do material lignocelulósico em carboidratos fermentescíveis que poderão ser utilizados para produção de etanol de segunda geração.

As estratégias para produção de bioetanol baseiam-se no desenvolvimento de diferentes configurações de processos, com base em eventos e de acordo com a integração de concepções modernas, que incluem a utilização de sistemas enzimáticos para a obtenção de glicose por meio da biomassa lignocelulósica, que, por sua vez, poderá ser fermentada a etanol. Essas estratégias estão correlacionadas aos quatro tipos de operações industriais: processo descontínuo, descontínuo alimentado, semicontínuo e contínuo, diferindo apenas do formato ao qual o processo fermentativo é conduzido.

Na fermentação em processo descontínuo, o substrato esterilizado no fermentador é inoculado com microrganismos e incubado, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbicos, antiespumante, e ácido ou base para controle do pH. A conformação do processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) e de Sacarificação e Co-fermentação Simultânea (SSCF) corroboram com a fermentação descontínua, pois é desenvolvida em apenas uma etapa, na qual a hidrólise enzimática das macromoléculas ocorre sinergicamente à fermentação alcoólica por meio dos microrganismos fermentadores (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

No processo descontínuo alimentado, o substrato é adicionado ao fermentador durante o cultivo e os produtos acumulam-se no meio e permanecem até o final da fermentação. No processo contínuo ocorre alimentação contínua de substrato a vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado. Enquanto no semicontínuo, esta retirada ocorre apenas ao término da fermentação, sendo parte removida e a outra parte subsequente diluída a mais substrato. O processo semicontínuo e descontínuo corroboram com a estratégia de Bioprocesso Consolidado (CBP), pois tanto a produção de enzimas quanto a de etanol, produzido a partir dos açúcares da hemicelulose e

celulose, são realizadas continuamente pelo mesmo microrganismo em um único reator (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Nesta proposta de trabalho, o co-cultivo de fungos utilizado para obtenção de etanol de segunda geração é considerado um processo semicontínuo, dividido em duas etapas. Na primeira etapa o fungo filamentososo é, em condição aeróbia, capaz de metabolizar os constituintes da biomassa lignocelulósica e sintetizar enzimas capazes de converter os polissacarídeos no meio em açúcares fermentescíveis, bem como excretar enzimas hidrolíticas que favorecem esta bioconversão. Na segunda etapa, as condições anaeróbicas são instaladas no meio e o fungo filamentososo sofre morte celular que conseqüentemente leva à liberação de açúcares que haviam sido metabolizados pelo mesmo. A liberação desses carboidratos juntamente aos convertidos pelas enzimas é utilizada pela *Saccharomyces cerevisiae* JP1 para produzir etanol. O co-cultivo é uma configuração de processo estrategicamente barata para produção de etanol de segunda geração.

As condições de cultivo para as diversas configurações adotadas para o processo de produção de bioetanol, como temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração enzimática e relação sólido-líquido, dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático e/ou do microrganismo utilizado, que devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Microbiologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Câmpus Sumé, e no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química, Câmpus Campina Grande, ambos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

### **4.1 MATÉRIA PRIMA**

A matéria prima utilizada neste trabalho foi o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo agroindustrial cedido por um comerciante de caldo de cana da cidade de Prata, Paraíba.

#### 4.1.1 Preparação do bagaço da cana-de-açúcar

O resíduo utilizado no presente estudo foi seco em estufa a 50 °C e, posteriormente, moído em moinho de facas (Micro moinho tipo Willye, Star FT 48). Em seguida, submetido ao processo de lavagem com água destilada até que todos os sólidos solúveis remanescentes do beneficiamento industrial da cana-de-açúcar fossem removidos, procedimento avaliado por meio da análise do Teor de Sólidos Solúveis (TSS) do lixiviado do processo de lavagem.

Foram utilizados nos experimentos o bagaço *in natura* e o bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em Mufla. Este pré-tratamento não seguiu o processo operacional usual descrito na literatura.

Para o tratamento hidrotérmico empregado no presente trabalho utilizou-se um forno Mufla, com sistema de controle de temperatura interna. Na reação hidrotérmica foi utilizada uma razão de massa de bagaço/volume de água destilada de 8:100 (g.mL<sup>-1</sup>), tempo de reação de 15 minutos e temperatura de 180 °C. Como foi empregado um sistema aberto, apesar da alta temperatura, a pressão no interior não chegou a níveis proporcionais ao obtido em um sistema fechado, como em reator de alta pressão.

Em todos os experimentos, seja com o bagaço *in natura* ou pré-tratado, o mosto utilizado durante a fermentação foi submetido ao processo de esterilização à temperatura de 120 °C, pressão de 1 atm, durante um período de 20 minutos.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Para a caracterização físico-química do bagaço *in natura* foi utilizado o procedimento descrito por Moraes et al. (2010) para análise de materiais lignocelulósicos, todos realizados em triplicatas.

### 4.2.1 Granulometria

O perfil granulométrico do bagaço de cana-de-açúcar foi determinado por meio de um conjunto de sete peneiras Tyler com malhas de 8 mesh (2,36 mm), 10 mesh (1,70 mm), 35 mesh (0,425 mm), 48 mesh (0,3 mm), 60 mesh (0,25 mm) e 115 mesh (0,125 mm) com agitação de 50 rpm em um agitador de peneiras PRODUTEST durante dez minutos. Os 50 g de bagaço inseridos no sistema após a distribuição nas peneiras foi quantificado por

gravimetria e os resultados expressos percentualmente em relação à massa da amostra analisada.

O cálculo do diâmetro médio da partícula ( $D_m$ ) foi obtido utilizando a equação de Sauter em que representa a fração mássica retida em cada peneira ( $\Delta x_i$ ) e o diâmetro médio de abertura das peneiras ( $D_i$ ), como mostra a Equação 1.

$$D_m = \left( \frac{\Delta x_i}{D_i} \right)^{-1} \quad (1)$$

#### 4.2.2 Determinação do teor de umidade

Para a determinação do teor de umidade foi quantificado 1 g da amostra úmida (MAU) em recipiente devidamente seco e de massa conhecida (conjunto recipiente/amostra úmida, MRAU). Posteriormente, o conjunto foi incubado a 105 °C durante 24 horas e verificada a massa final (conjunto recipiente/amostra seco, MRAS). O percentual de umidade das amostras foi determinado por meio da diferença gravimétrica existente entre o conjunto recipiente/amostra úmida (MRAU) e recipiente/amostra seca (MRAS). A Equação 2 determina o teor de umidade presente nas amostras.

$$TU (\%) = \frac{(MRAU - MRAS)}{MRA} \times 100 \quad (2)$$

#### 4.2.3 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação percentual do teor de cinzas foram quantificados 2 g da amostra seca (MAS) em cadinho devidamente seco e de massa conhecida (conjunto cadinho/amostra úmida, MRAS). Posteriormente, o conjunto foi inserido em forno mufla com rampa de aquecimento de aproximadamente 10 °C.min<sup>-1</sup> até obter a temperatura de trabalho (600 °C). As amostras permaneceram a 600 °C durante 3 horas e em seguida a temperatura foi reduzida para 200 °C continuando por 2 horas. Em seguida, a massa do conjunto cadinho/amostra calcinada (MRAC) foi quantificada em balança analítica. O percentual de cinzas das amostras foi determinado pela Equação 3 que relaciona a diferença gravimétrica existente entre o conjunto cadinho/amostra seca (MRAS) e cadinho/amostra calcinada (MRAC) em função da massa seca do material (MAS).

$$TC (\%) = \frac{(MRAS - MRAC)}{MAS} \times 100 \quad (3)$$

#### 4.2.4 Determinação de extrativos

Para a determinação de extrativos, uma amostra de 5 g (massa seca) do material lignocelulósico foi armazenada em sacos feitos com papel de filtro qualitativo e, posteriormente, inseridos em um extrator Soxhlet. A extração foi realizada por meio de refluxo contínuo da mistura de álcool etílico e hexano na proporção 1:1 durante 6 horas. Em seguida, os sacos foram incubados em estufa a 105 °C por 24 horas. Os teores de extrativos presentes na amostra foram determinados pela Equação 4 que relaciona a diferença entre massa do conjunto papel de filtro/amostra úmida (MRAU) e papel de filtro/amostra seca (MRAS) pela razão da massa seca do material.

$$TE (\%) = \frac{(MRAU - MRAS)}{MAU} \times 100 \quad (4)$$

#### 4.2.5 Determinação de lignina

Para determinação da lignina, uma amostra de 1 g do material sem extrativos juntamente com 17 mL de ácido sulfúrico a 72% (v.v<sup>-1</sup>) foi triturado durante 15 minutos com o auxílio do sistema almofariz/pistilo. Posteriormente, deixou-se o material em descanso por 24 horas. Após este período foram adicionados 306 mL de água destilada com a finalidade de diluir o ácido sulfúrico para 4% (v.v<sup>-1</sup>). O material foi transferido para um balão volumétrico conectado ao sistema Soxhlet/condensador, sendo mantido em aquecimento e refluxo por 4 horas. Em seguida, a solução de ácido sulfúrico contendo lignina foi filtrada e o precipitado retido no funil de vidro lavado com água destilada até atingir pH neutro. O conjunto funil/lignina permaneceu em estufa a 105 °C durante 24 horas. O teor de lignina presente na amostra foi determinado pela Equação 5 que relaciona a diferença entre a massa do conjunto funil/lignina seca (MRAS) e funil de vidro de vidro seco (MRS) pela razão da massa do material (MAS).

$$TL (\%) = \frac{(MRAS - MRS)}{MAS} \times 100 \quad (5)$$

#### 4.2.6 Determinação de holocelulose

Para a determinação de holocelulose utilizou-se Erlenmeyer de 500 mL, ao qual se adicionou 3 g do material sem extrativos, 2,5 g de clorito de sódio (NaClO<sub>2</sub>), 1 mL de ácido

acético glacial e 120 mL de água destilada. Em seguida, o Erlenmeyer foi mantido em banho Maria a 70 °C sob agitação constante durante 5 horas. O conjunto Erlenmeyer/reagentes foi tamponado com um Erlenmeyer de 25 mL. Após o início da reação durante 2 horas em intervalo de 60 min foi adicionado 1 mL de ácido acético glacial. Após o período de reação, o conteúdo foi filtrado em funil sinterizado e o precipitado retido lavado com água destilada até atingir pH neutro. O conjunto funil/holocelulose permaneceu em estufa a 105 °C durante 24 horas. O teor de holocelulose presente na amostra foi determinado pela Equação 6 que relaciona a diferença entre a massa do conjunto funil/ holocelulose seca (MRAS) e funil de vidro sinterizado seco (MRS) pela razão da massa do material (MAS).

$$TH (\%) = \frac{(MRAS - MAS)}{MAS} \times 100 \quad (6)$$

#### 4.2.7 Determinação de $\alpha$ -celulose

Para determinação da  $\alpha$ -celulose, uma amostra de 1 g do material da holocelulose permaneceu durante 2 minutos em contato com 15 mL de hidróxido de sódio a 17,5% (m.v<sup>-1</sup>) e, posteriormente, foi triturado durante 8 minutos com o auxílio do sistema almofariz/pistilo. Após este período foram adicionados 40 mL de água destilada e o material foi filtrado em filtro sinterizado, o precipitado retido no funil foi lavado com água destilada até atingir pH neutro. O conjunto funil/ $\alpha$ -celulose permaneceu em estufa a 105 °C durante 24 horas. O teor de  $\alpha$ -celulose presente na amostra foi determinado pela Equação 7 que relaciona a diferença entre a massa do conjunto funil/ $\alpha$ -celulose seca (MRAS) e funil de vidro sinterizado seco (MRS) pela razão da massa do material (MAS).

$$TA (\%) = \frac{(MRAS - MRS)}{MAS} \times 100 \quad (7)$$

#### 4.3 MICRORGANISMOS

Foi utilizado neste trabalho o isolado fúngico CDSA12 selecionado entre as cepas da coleção de fungos filamentosos pertencente ao Laboratório de Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA). Esta linhagem foi selecionada por apresentar melhor desempenho para a produção de celulase pelo Método de Difusão de Gel em Ágar (SOUSA, 2014). Também foi utilizada a espécie de *Saccharomyces cerevisiae* JP1

cedida pela Japungu Agroindustrial S/A (Santa Rita - PB), selecionada devido à sua robustez, resistência a altas concentrações de substrato e produto e redução do risco de contaminação.

#### 4.3.1 Meio de Cultura e preparo de pré-inóculo

Para o procedimento de conservação e ativação do isolado CDSA12 foi utilizado o meio de cultivo sólido básico BDA, cuja composição está demonstrada na Tabela 1. O armazenamento da linhagem foi em câmara climatizada BOD a 3 °C com repique periódico. A ativação desta ocorreu em placas de Petri utilizando o meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) com posterior incubação em câmara climatizada BOD ou estufa a 28 °C durante 7 dias. A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* JP1 foi mantida em glicerol a 30%, em freezer a -20 °C. Para o processo de ativação foi utilizado caldo de cana suplementado com extrato de levedura (3 g.L<sup>-1</sup>) e 1,0 mL da solução de glicerol contendo a levedura, posteriormente, submetido a 37 °C sob agitação de 150 rpm durante 3 dias.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo utilizado na ativação do isolado fúngico CDSA12.

| Composição     | BDA        |
|----------------|------------|
| Batata (g)     | 200        |
| Dextrose (g)   | 18         |
| Ágar (g)       | 15         |
| Água destilada | q.s.p. 1 L |

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

O mosto utilizado para o processo fermentativo foi constituído pelo bagaço *in natura* para o Experimento 1 e pelo bagaço submetido ao pré-tratamento hidrotérmico em Mufla para o Experimento 2. Em ambos os experimentos, a concentração de bagaço foi de 80 g.L<sup>-1</sup>. Esta concentração foi adotada porque em experimentos preliminares verificou-se que a fluidez do meio reacional nesta proporção de massa/volume favorecia a agitação e, conseqüentemente, a homogeneização e difusão dos sólidos, dos microrganismos e das enzimas no interior do reator.

O inóculo do CDSA12 para os Experimentos 1 e 2 foi realizado no próprio biorreator com volume de trabalho de 400 mL de mosto, ao qual foi inoculada uma suspensão de esporos na concentração de 10<sup>6</sup> esporos do isolado fúngico CDSA12 por grama de bagaço (os esporos da placa de Petri foram suspensos em solução salina a 0,9% e, então, quantificados

pela técnica de contagem em câmara de Neubauer). A propagação do fungo foi conduzida em condições aeróbicas com alimentação de oxigênio de  $0,5 \text{ L.h}^{-1}$  sob agitação de 150 rpm, temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 48 horas.

#### 4.4 FERMENTAÇÃO

O processo fermentativo foi conduzido em biorreator de bancada (Biorreator Tecnal, Biotec-C) e dividido em duas etapas, cuja operação baseou-se nas configurações do processo semicontínuo. Durante a primeira etapa ocorreu a indução do crescimento celular do isolado fúngico CDSA12, bem como a produção das enzimas necessárias para desempenhar as funções bioquímicas capazes de converter os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. A batelada foi constituída pelo pré-inóculo, que corresponde a um terço (400 mL) do volume de trabalho do equipamento, e pela alimentação do sistema com mosto suficiente para atingir o volume máximo de trabalho do biorreator (1200 mL). A fermentação foi conduzida em condições aeróbicas com alimentação de oxigênio de  $0,5 \text{ L.h}^{-1}$  sob agitação de 150 rpm, temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e tempo de cultivo e hidrólise enzimática de 9 dias. Posteriormente, na segunda etapa, a alimentação de oxigênio foi interrompida com a finalidade do fungo CDSA12, que é um microrganismo aeróbio, sofrer morte celular e favorecer o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* JP1. Nesta etapa foram adicionados ao biorreator 10% (m.m<sup>-1</sup>) de *S. cerevisiae* JP1 em fase exponencial de crescimento. Esta segunda etapa foi conduzida em condição anaeróbica sob os mesmos valores de temperatura e agitação utilizados na primeira etapa, com tempo de fermentação alcoólica de 10 dias.

#### 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

##### 4.5.1 Determinação do Teor de Sólidos Solúveis (TSS)

Para se estimar a concentração de substrato no mosto, inicialmente foi determinado o Teor de Sólidos Solúveis (TSS), expresso em °Brix, utilizando-se refratômetro de bancada. A partir dos resultados do TSS, a concentração de substrato, expressa em  $\text{g.L}^{-1}$ , foi estimada, segundo Fontan et al. (2011), utilizando-se a Equação 8.

$$\text{TSS (g.L}^{-1}\text{)} = 10,685 \times \text{°Brix} + 1,8493 \quad (8)$$

#### 4.5.2 Concentração de Açúcares Redutores (AR)

O método para a obtenção de AR foi baseada na redução do ácido 3,5-dinitro salicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitro salicílico, concomitantemente com a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. Os açúcares redutores foram determinados por serem muito utilizados como indicadores da eficiência de processos fermentativos nos quais o substrato empregado é rico em açúcares (FERNANDES, 2003).

A quantificação dos Açúcares Redutores (AR) foi realizada adicionando 1 mL da solução reagente DNS (1% de 3,5-dinitrossalicílico; 1,6% de hidróxido de sódio; 30% de tartarato de sódio e potássio) e 1 mL da amostra do meio fermentado. A mistura foi aquecida em banho Maria a 50 °C por 5 minutos e resfriada para a temperatura ambiente. Após aquecimento, a solução tornou-se alaranjada, sendo lida, em espectrofotômetro, a 540 nm. Após resfriada, 8 mL de água destilada foram adicionados à mistura. O espectrofotômetro foi previamente zerado com uma amostra em branco contendo: 1 mL da solução reagente DNS e 1 mL de água destilada. A curva padrão foi constituída com o intervalo de diluição da glicose de 0,1 g.L<sup>-1</sup> com limites inferior e superior de 0 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, com R<sup>2</sup> = 0,9938 (MILLER, 1959). A Equação 9 corresponde à representatividade da curva padrão e através dela os resultados de açúcares redutores foram determinados, sendo expressos em gramas de açúcares redutores por litro de amostra analisada.

$$ABS_{540nm} = (0,3896 \times AR) + 0,0178 \quad (9)$$

#### 4.5.3 Atividade Celulolítica (Carboximetilcelulase, CMCase)

A atividade celulolítica analisada neste trabalho foi de endoglicanases, também chamadas de carboximetilcelulases (CMCase), que se baseou na capacidade do extrato enzimático em liberar açúcares redutores na presença de carboximetilcelulose devido à hidrólise da fonte de celulose em glicose.

Para a análise CMCásica, 1 mL do extrato enzimático foi incubado com 1 mL de uma solução de carboximetilcelulose a 1% (m.v<sup>-1</sup>), preparada em tampão acetato de sódio a 0,1 M e pH 5,0. A reação foi realizada em triplicata durante 0, 5, 10 e 15 minutos a uma temperatura de 50 °C. Após cada tempo, foi retirado 1 mL da mistura e incubada em 1 mL de DNS para determinar a concentração de açúcares redutores (MILLER, 1959) e interromper a reação. A

amostra relacionada ao tempo de 0 minuto foi utilizada como o branco para zerar a absorvância do espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose, por minuto, a 50 °C e, neste trabalho, a atividade enzimática foi expressa  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ , a qual foi calculada seguindo a Equação 10, em que  $t$  significa tempo de incubação,  $V_i \Rightarrow$  volume da amostra (mL),  $V_f \Rightarrow$  volume final da reação (mL),  $a \Rightarrow$  inclinação da reta padrão e  $\text{PM} \Rightarrow$  peso molecular da glicose ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

$$\text{CMCase (U}\cdot\text{mL}^{-1}) = \text{Abs}_{540\text{nm}} \frac{10^3 \times V_f}{a \times \text{PM} \times t \times V_i} \quad (10)$$

#### 4.5.4 Determinação de Etanol

Para determinação do volume de etanol, o mosto foi clarificado por meio de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos seguido de filtração em filtro micrósporo com o auxílio do sistema de filtração a vácuo. Após o processo de clarificação, alíquotas de 10 mL foram pesadas para determinação da densidade específica do meio. Posteriormente, o volume foi determinado por meio da relação densidade específica versus volume de etanol representado pela equação da curva padrão. A curva padrão foi constituída pelo intervalo de diluição de etanol em mosto não fermentado (clarificado assim como descrito anteriormente), com limites inferior e superior de 5% e 40% de etanol, respectivamente. Todas as amostras foram processadas em balão volumétrico com capacidade de 10 mL.

#### 4.6 EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO

Foram obtidos os dados experimentais para determinar os parâmetros cinéticos da fermentação com o co-cultivo dos fungos para a produção de bioetanol. Foi determinado o rendimento de produto com base no consumo de substrato, em que  $S$  é o somatório da concentração de substrato e  $P$  é a formação do produto, conforme a Equação 11.

$$Y_{P/S} = \frac{dP}{dS} \quad (11)$$

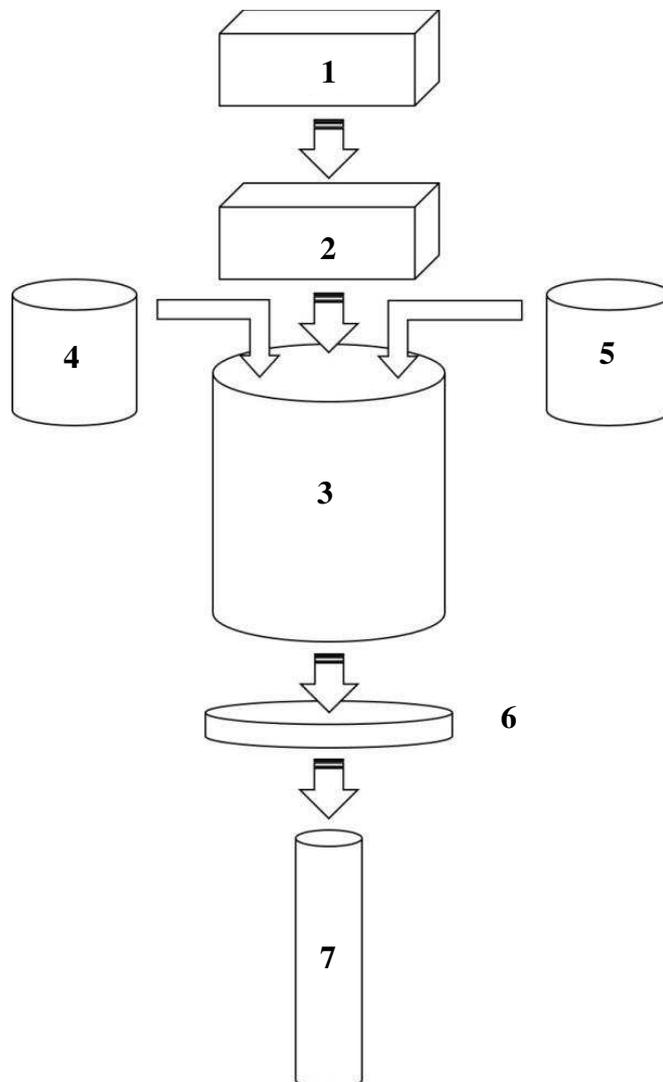
A produtividade em etanol ( $P_P$ ) e a velocidade instantânea de consumo do substrato ( $r_s$ ) foram calculados pela Equação 12 e 13, respectivamente.

$$P_P = \frac{dP}{dt} \quad (12)$$

$$r_s = \frac{dS}{dt} \quad (13)$$

A Figura 7 apresenta o fluxograma que resume o processo de produção de bioetanol por meio do co-cultivo de fungos.

Figura 7 - Fluxograma do processo de produção de bioetanol por co-cultivo de fungos. O processo iniciou-se com o preparo do material lignocelulósico: moagem e lavagem (1); pré-tratamento (2); preparo do mosto e co-fermentação dos fungos (3); co-cultivo do isolado fúngico CDSA12 e hidrólise enzimática (4); co-fermentação do hidrolisado enzimático por meio da *Saccharomyces cerevisiae* JP1 (5); clarificação do mosto fermentado e determinação dos Sólidos Solúveis Totais, Açúcares Redutores e Atividade celulolítica (6) e finalmente a destilação e quantificação de etanol (7).



Fonte: Ilustração elaborada pelo pesquisador.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

A caracterização físico-química do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* visou conhecer a composição dos constituintes da biomassa, que são fatores importantes para a produção de etanol de segunda geração. Estes fatores incluem: percentual de celulose, hemicelulose e lignina, bem como, parâmetros que afetam o comportamento cinético dos microrganismos e do complexo enzimático envolvidos no processo fermentativo (a umidade, a granulometria e a atividade de água).

O resíduo do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* apresentou umidade de  $10,61 \pm 0,18\%$ , valor superior ao mensurado por Nunes et al. (2014), que em estudos com pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana utilizando a vermiculita ativada com ácido como catalisador, encontrou umidade de  $7,68 \pm 0,16\%$  para o bagaço *in natura*.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores dos constituintes analisados para o bagaço da cana-de-açúcar, após secagem e moagem.

Tabela 2 - Composição química da amostra do bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

| <b>Composição Química</b> | <b>Bagaço <i>in natura</i></b> |
|---------------------------|--------------------------------|
| Cinzas (%)                | $1,34 \pm 0,12$                |
| Extrativos (%)            | $3,65 \pm 0,13$                |
| Lignina (%)               | $11,52 \pm 0,42$               |
| Hemicelulose (%)          | $33,67 \pm 0,19$               |
| Celulose (%)              | $39,45 \pm 0,24$               |

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2 verificou-se que os teores de cinzas, que representa basicamente os minerais presentes na amostra foram inferiores aos encontrados por Silva e Cruz (2014) em seu trabalho utilizando hidrólise e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente, que obteve valor de  $5,4 \pm 1,1\%$  de cinzas do material *in natura*. Sabendo que a fermentação de açúcares pode ser influenciada pela composição do meio reacional, a presença desses minerais na biomassa pode ter suplementado o meio, aumentando os nutrientes disponíveis para a síntese dos metabólitos envolvidos na bioconversão da biomassa em açúcares fermentescíveis.

O teor de extrativo presente no balanço de massa da Tabela 2 apresentou valor inferior ao disposto no trabalho de Nascimento (2011) que avaliou o pré-tratamento alcalino (NaOH) do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilo-oligômeros e observou a presença de  $5,10 \pm 0,40\%$  de extrativos no material lignocelulósico *in natura*. Esse valor mássico dos extrativos encontrados na amostra do presente trabalho pode ter favorecido as etapas de fermentação pelo co-cultivo de fungos, tendo em vista que vários desses compostos de baixa ou de média massa molecular (sais, açúcares e polissacarídeos, ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas, esteroides e compostos fenólicos e glicosídeos) poderiam ter atuado como inibidores ou induzido o metabolismo dos microrganismos a sintetizarem metabólitos que não estavam relacionados ao processo de produção de bioetanol.

Como mostra a Tabela 2 o teor de hemicelulose do bagaço *in natura* apresenta-se superior aos valores médios obtidos por Rabelo (2010) e Silva e Cruz (2014), que obtiveram resultados de  $24,5 \pm 0,8\%$  e  $22,7 \pm 0,3\%$  de hemicelulose. Segundo Siqueira (2015), variações nos teores de hemicelulose, celulose e lignina presentes no bagaço da cana-de-açúcar podem ser consequência das características genótípicas e fenotípicas disponível para cada linhagem dessa gramínea.

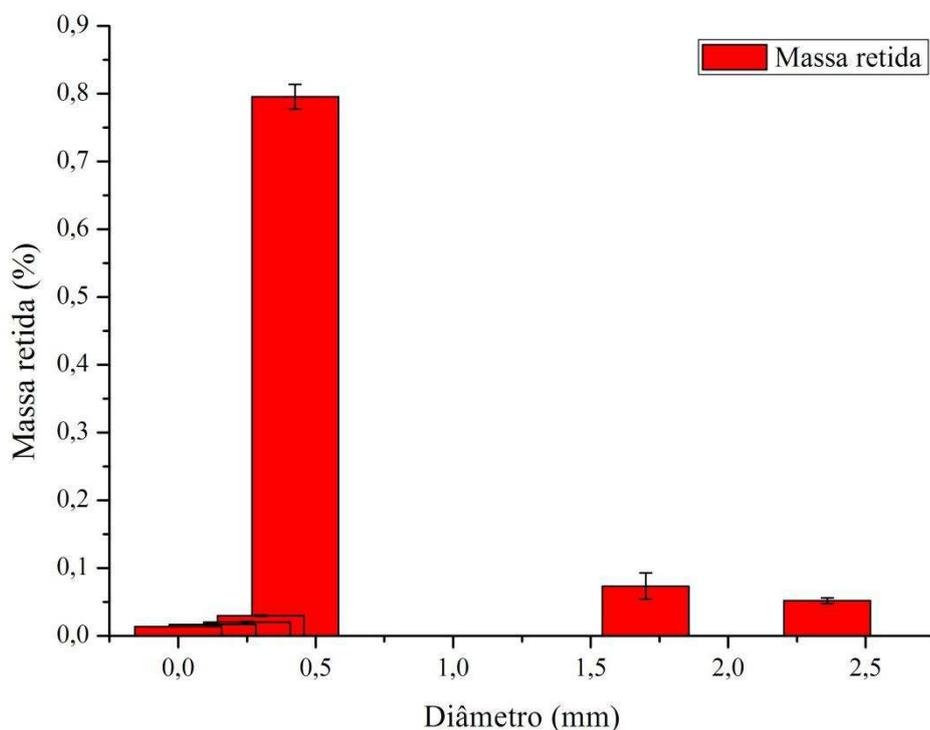
No balanço de massa do material lignocelulósico (Tabela 2) os valores mássicos de lignina corroboram com Souza (2014) que obteve valor de  $11,84 \pm 1,5\%$  de lignina no bagaço de cana *in natura*, quando trabalhou com produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar utilizando leveduras isoladas do bioma amazônico. De acordo com Cortez et al. (2014) existem discussões acerca de qual fração lignocelulósica, hemicelulose e/ou lignina, representa maior obstáculo para a hidrólise enzimática da celulose. No entanto, Siqueira et al. (2013) por meio de análise comparativa de trabalhos que avaliaram a remoção destes componentes, concluíram que a solubilização da lignina apresenta um impacto direto no rendimento global de conversão de celulose em glicose.

Como se verifica na Tabela 2, o teor mássico de celulose no balanço de massa foi de  $39,45 \pm 0,24\%$ , valor  $7,66\%$  superior ao obtido por Nunes et al. (2014). Implicação positiva, pois o balanço mássico celulósico apresentou valores satisfatórios e com isso o complexo enzimático das endoglucanases e celobiohidrolases por meio de um segundo domínio catalítico, chamado de módulo de ligação a carboidratos (CBMs), podem ser adsorvidos de maneira eficiente nas moléculas de celulose, aumentando a concentração de enzimas na superfície desse polissacarídeo e elevando o rendimento da conversão celulósica em glicose.

### 5.1.1 Granulometria do Bagaço de Cana-de-Açúcar

Na Figura 8 encontra-se a distribuição granulométrica do resíduo da cana-de-açúcar *in natura*. Observa-se que 79,55% do bagaço *in natura* ficaram retidos na peneira de 35 mesh, o que corresponde ao tamanho de 0,425 mm. Enquanto, 20,44% do bagaço apresentaram teor mássico retido nas peneiras de 8, 10, 48, 60 e 115 mesh, o que corresponde aos tamanhos de 2,36, 1,7, 0,3, 0,25 e 0,125 mm, respectivamente. Estes tamanhos de partículas demonstram que a área superficial da biomassa apresenta perfil relativamente baixo, parâmetro que atua na hidrólise enzimática de maneira inversamente proporcional à maximização dos rendimentos em açúcares. No entanto, o diâmetro médio ( $d_m$ ) das distribuições nas peneiras foi de  $0,441 \pm 0,0053\%$ , tamanho da partícula que possibilita o aumento do contato da área superficial, bem como a redução do grau de cristalinidade da celulose e a possível elevação da reatividade do material lignocelulósico frente às enzimas hidrolíticas.

Figura 8 - Perfil da massa retida nas peneiras Tyler do bagaço da cana-de-açúcar *in natura* (MBIN).



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

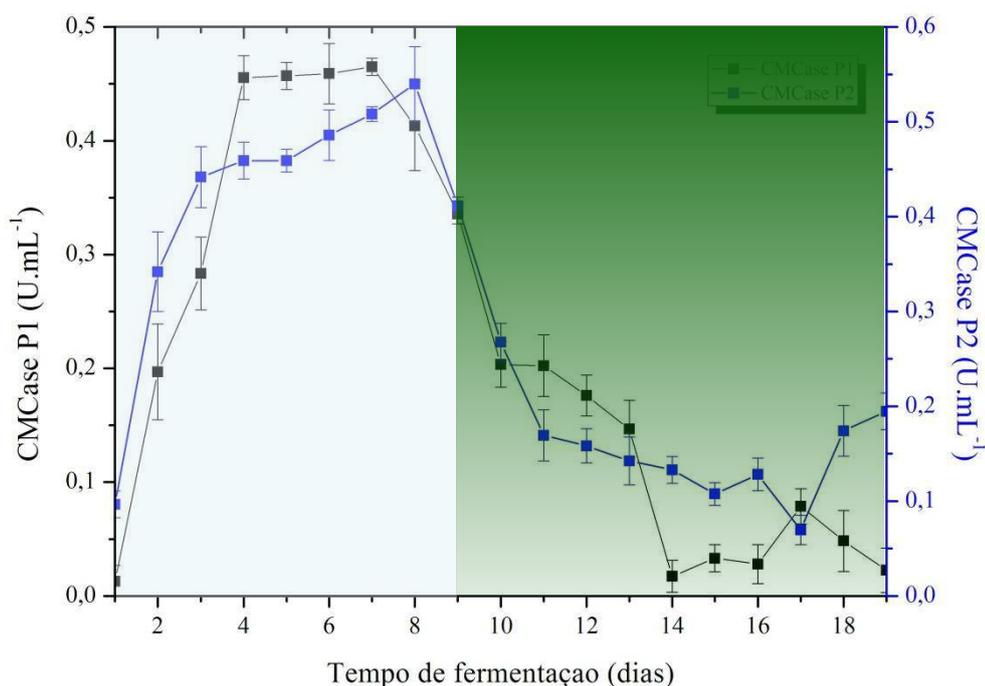
As peneiras com 8, 10, 35, 48, 60, 115 mesh representam os diâmetros, respectivamente, 2,36; 1,7; 0,425; 0,3; 0,25 e 0,125.

## 5.2 CO-CULTIVO DE FUNGOS E HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

O processo para produção de bioetanol por meio de co-cultivo de fungo apresenta-se como um sistema de produção semicontínuo que visou inicialmente induzir o metabolismo do isolado fúngico CDSA12 a produzir os complexos enzimáticos necessários para catalisar as reações capazes de transformar os constituintes do meio em açúcares fermentescíveis.

Como foi visto anteriormente a ação sinérgica da elevada concentração mássica de celulose e hemicelulose da biomassa do meio reacional e a presente configuração do processo de produção de bioetanol, foram fatores favoráveis para a bioconversão desses polissacarídeos em açúcares fermentescíveis. Apesar do bagaço não ter sido submetido a nenhum processo de solubilização da lignina percebe-se na Figura 9 que os dois experimentos apresentam perfil cinético para uma endoglicanase do complexo enzimático das celulases.

Figura 9 - Perfil cinético do processo de produção de Carboximetilcelulase (CMCase) por fermentação submersa utilizando o isolado CDSA12 para hidrólise do bagaço da cana visando a produção de bioetanol.



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

As siglas P1 e P2 corresponde ao Experimento 1 e Experimento 2, respectivamente. A tonalidade azul e verde no gráfico corresponde ao período (até 9 dias) em que ocorreu o cultivo do isolado fúngico CDSA12 e o co-cultivo dos fungos, respectivamente.

Como podem ser analisados na Figura 9, os dois processos fermentativos (Experimento 1 e 2) apresentaram perfil cinético para a endoglicanase carboximetilcelulase (CMCase), enzima capaz de hidrolisar a celulose amorfa e solúvel presente no bagaço da cana. Em ambos os processos, observa-se a ocorrência de atividade enzimática nas primeiras 24 horas de cultivo. No Experimento 1 (P1), a máxima atividade da enzima CMCase ocorreu no 7º dia (168 horas) de fermentação, atingindo  $0,465 \pm 0,0076 \text{ U.mL}^{-1}$ . Enquanto, no Experimento 2 (P2), a máxima atividade ocorreu no 8º dia (192 horas) de fermentação, atingindo  $0,54 \pm 0,0089 \text{ U.mL}^{-1}$ . Oliveira Júnior (2014) ao trabalhar com produção de celulases por fermentação semissólida em bagaço de coco e pedúnculo do caju utilizando *Penicillium chrysogenum* obteve atividade máxima de  $0,233 \text{ U.mL}^{-1}$  e  $0,305 \text{ U.mL}^{-1}$ , respectivamente, após 120 horas de fermentação, valores 43,51 e 56,85% inferiores ao encontrado no experimento 2 do presente estudo.

O perfil cinético do Experimento 2 para a CMCase apresentou atividade 13,89% superior ao observado no Experimento 1, isso demonstra que o pré-tratamento hidrotérmico pode ter fracionado a biomassa lignocelulósica em seus constituintes, por meio da clivagem do complexo lignina-carboidrato, e rompido as ligações glicosídicas dos polissacarídeos, fatores que podem ter favorecido a metabolização da celulose pelo fungo CDSA12 e corroborado com o aumento na síntese da CMCase. Vale salientar que em ambos os Experimentos, o mosto foi submetido à temperatura de 120 °C e 1 atm para esterilização do meio, estas condições podem ter atuado sinergicamente como descrito anteriormente reduzindo a polimerização da celulose e aumentando a síntese enzimática.

Verifica-se na Figura 9 que durante os 9 dias (216 horas) iniciais da fermentação, período que ocorreu apenas o cultivo do isolado fúngico CDSA12, a atividade CMCase permaneceu em nível relativamente alto. No entanto, durante o período subsequente, a atividade enzimática reduziu 95,14%, demonstrando que após a remoção da alimentação de oxigênio do reator, o fungo não suportou a condição anaeróbica do ambiente e sofreu morte celular, conseqüentemente não ocorreu nova síntese de enzimas hidrolíticas. Essa estratégia de interromper a oxigenação do reator, com conseqüente morte celular, proporcionou a liberação de novas moléculas de açúcares fermentescíveis que haviam sido metabolizadas pelo microrganismo durante a primeira etapa do processo de produção de bioetanol por meio da configuração do processo adotado neste trabalho.

Nos trabalhos disponíveis na literatura referente à produção de etanol de segunda geração utilizando as diversas configurações para hidrólise enzimática e fermentação

alcoólica percebe-se que os autores utilizam para determinar atividade celulásica a correspondente a atividade papel de filtro (FPase) expressa em FPU por mililitro da mistura. A atividade FPase é, diferente da CMCase, comumente utilizada por quantificar a atividade de enzimas celulasas totais.

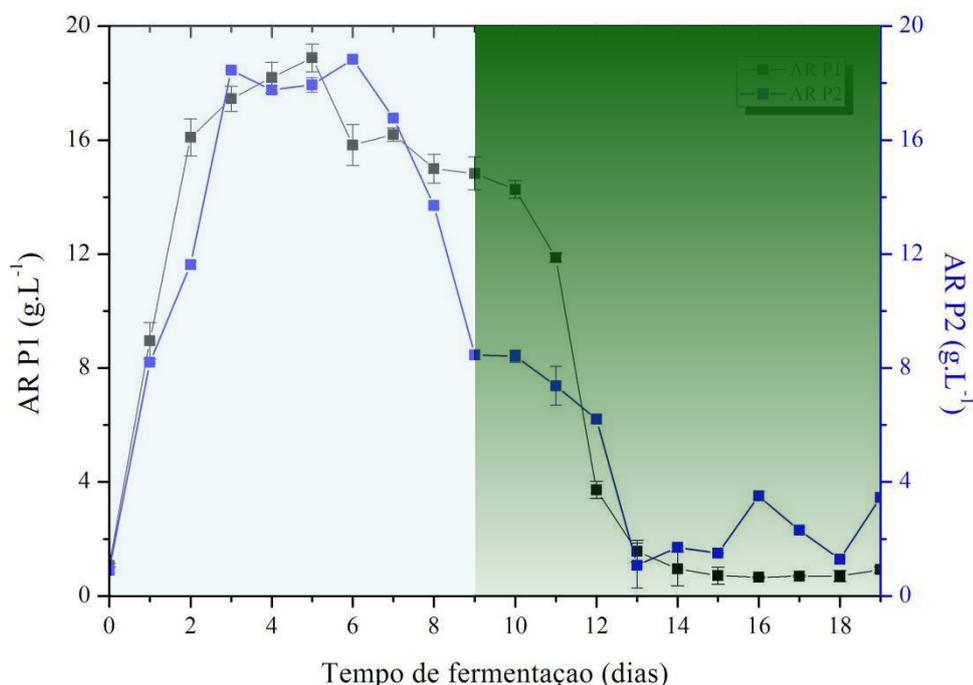
No trabalho de Souza (2014) de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico, pode-se concluir que, em relação à hidrólise enzimática, a carga de enzima de celulasas totais responsável por uma melhor eficiência de conversão de celulose em glicose é de 10 FPU.g<sup>-1</sup> de bagaço, valor que está correlacionado à concentração de biomassa disponível no meio reacional, que neste caso não deve ultrapassar 13% (m.v<sup>-1</sup>) do volume de trabalho. Enquanto, Santos (2012) quando estudou a produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante empregando biomassa lignocelulósica concluiu que as melhores condições para o processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF) é de 25 FPU.g<sup>-1</sup> de bagaço com utilização de 30% do resíduo lignocelulósico da cana.

Apesar de o presente estudo ter analisado apenas atividade CMCase, por influência da configuração do processo ao qual foi conduzida a fermentação, percebe-se que os microrganismos envolvidos, na presença de um ambiente rico em lignina e hemicelulose, podem ter metabolizado estes componentes e conseqüentemente sintetizado diversas enzimas que favoreceram a produção de etanol. Enzimas ligninolíticas podem ter atuado como pré-tratamento biológico para a deslignificação do bagaço, desestruturação da matriz lignocelulósica e redução da recalcitrância desse material. Enzimas hemicelulásicas podem ter hidrolisado as frações de hemicelulose liberando xilose, que, por sua vez, pode ter sido convertida a xilulose, pentose que pode ser metabolizada em etanol. Estudos acerca dos possíveis complexos enzimáticos envolvidos diretamente na produção de bioetanol por meio do co-cultivo de fungos devem ser analisados detalhadamente posteriormente.

### **5.2.1 Co-fermentação dos hidrolisados enzimáticos**

Após a indução dos possíveis complexos enzimáticos envolvidos na hidrólise dos componentes da biomassa lignocelulósica por meio do isolado fúngico CDSA12, pode-se verificar a presença do perfil cinético de Açúcares Redutores (AR) presente no meio reacional, como demonstra a Figura 10.

Figura 10 - Perfil cinético dos Açúcares Redutores (AR) para os processos fermentativos utilizando o isolado fúngico CDSA12.



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

A tonalidade azul e verde no gráfico corresponde ao período (até 9 dias) em que ocorreu o cultivo do isolado fúngico CDSA12 e o co-cultivo dos fungos, respectivamente.

Analisando as Figuras 9 e 10, pode-se verificar que na primeira etapa da configuração do processo adotado no presente estudo, a concentração de Açúcar Redutor (AR) apresentou perfil crescente durante os 6 dias (144 horas) iniciais da fermentação corroborando com os valores crescentes da atividade para CMCase. No entanto, durante os três dias subsequentes a concentração de AR sofreu redução, fator que está relacionado à utilização desses açúcares como excelente fonte de carbono para o crescimento celular, embora consequentemente decorra a repressão da síntese enzimática, tendo em vista que a grande quantidade de glicose é reportada na literatura como repressora do metabolismo de certos microrganismos. Observa-se também que os elevados valores iniciais de AR são decorrentes da eficiência do pré-inóculo realizado durante a fermentação com o isolado fúngico CDSA12.

A realização de processo de deslignificação na biomassa lignocelulósica pode ter levado ao melhor rendimento do processo de produção de bioetanol por meio de co-cultivo de fungo, tendo em vista que a presença de lignina limita a difusão das enzimas e, consequentemente, a formação de glicose. Santos et al., (2010) analisou a comparação entre

processos em Hidrólise e Fermentação Separado (SHF) e em Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF) de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* e verificou que a quantidade de glicose formada quando se utilizou o bagaço deslignificado foi cerca de duas vezes maior que a quantidade de glicose formada com o bagaço não deslignificado, o que refletiu na conversão enzimática da hidrólise. Vale ressaltar que neste caso foi necessário utilizar uma carga enzimática praticamente o dobro daquela utilizada no bagaço deslignificado, em relação ao teor de celulose presente em cada matriz.

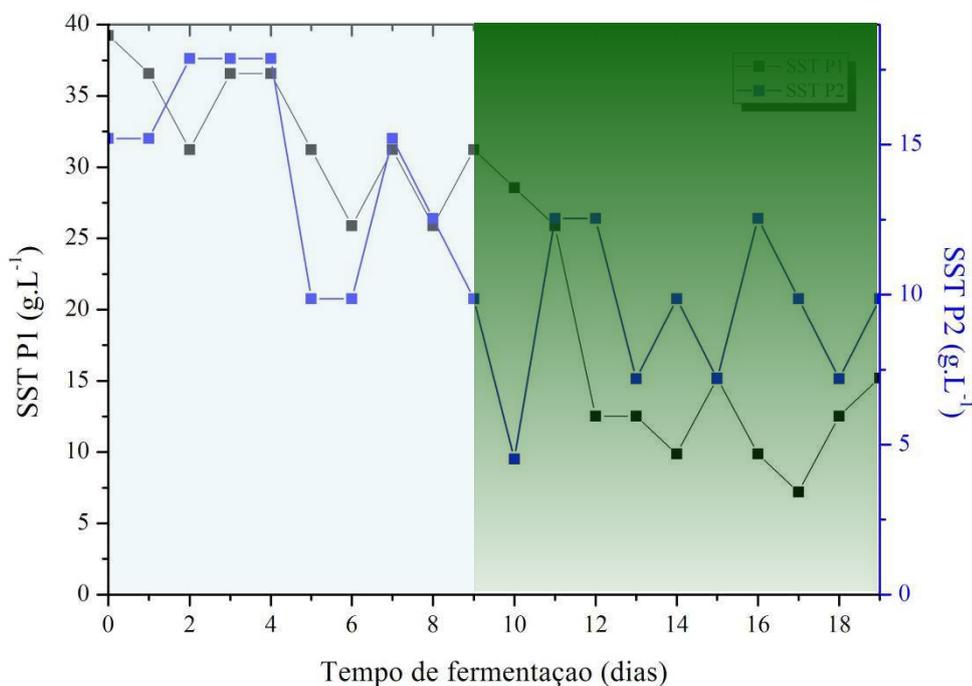
Na segunda etapa da configuração do processo adotado no presente estudo, a concentração de AR apresenta perfil decrescente durante os períodos subsequentes. Este nível decrescente é consequência da utilização desses açúcares por meio da *Saccharomyces cerevisiae* JP1 para bioconversão em etanol. Além do AR disponível no meio reacional, como mencionado anteriormente, moléculas de açúcares fermentescíveis que haviam sido metabolizadas pelo microrganismo durante a primeira etapa do processo foram liberadas à medida que a condição anaeróbica se instalou no interior do reator. Provavelmente, algumas frações de açúcares fermentescíveis não foram mensuradas no perfil cinético da Figura 10, em virtude destes serem metabolizados instantaneamente após o processo de liberação.

Até então, no presente trabalho, só foi abordada a produção de bioetanol por meio de açúcares fermentescíveis derivados dos polissacarídeos relacionados à celulose. Entretanto, estudos demonstram a elevada eficiência da produção de bioetanol a partir da fração hemicelulósica. Por influência da configuração do processo ao qual foi conduzida a fermentação, percebe-se que os microrganismos envolvidos, podem ter convertido hemicelulose em xilose, que, por sua vez pode ter sido convertido em xilulose, frações de açúcares simples que podem ter favorecido a produção alcoólica no processo. Silva (2013) trabalhou com produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço da cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae* e observou a produção de etanol e xilitol equivalentes aos obtidos no processo conduzido com xilose pura.

Na Figura 11 está apresentado o perfil cinético do teor de Sólidos Solúveis (SST) presente no processo de co-cultivo de fungos visando à produção de bioetanol. Percebe-se que os SST, que corresponde basicamente a açúcares, sais, proteínas solúveis e ácidos, apresentaram variação ao longo das duas etapas da fermentação, sendo que na primeira etapa as concentrações foram superiores com relação à segunda etapa, demonstrando, que nos 9 dias

iniciais da fermentação as enzimas disponíveis no meio catalisaram reações que favoreceram os resultados apresentado na Figura 10.

Figura 11 - Perfil cinético do teor de Sólidos Solúveis (SST) para o processo de co-cultivo de fungos visando à produção de bioetanol.

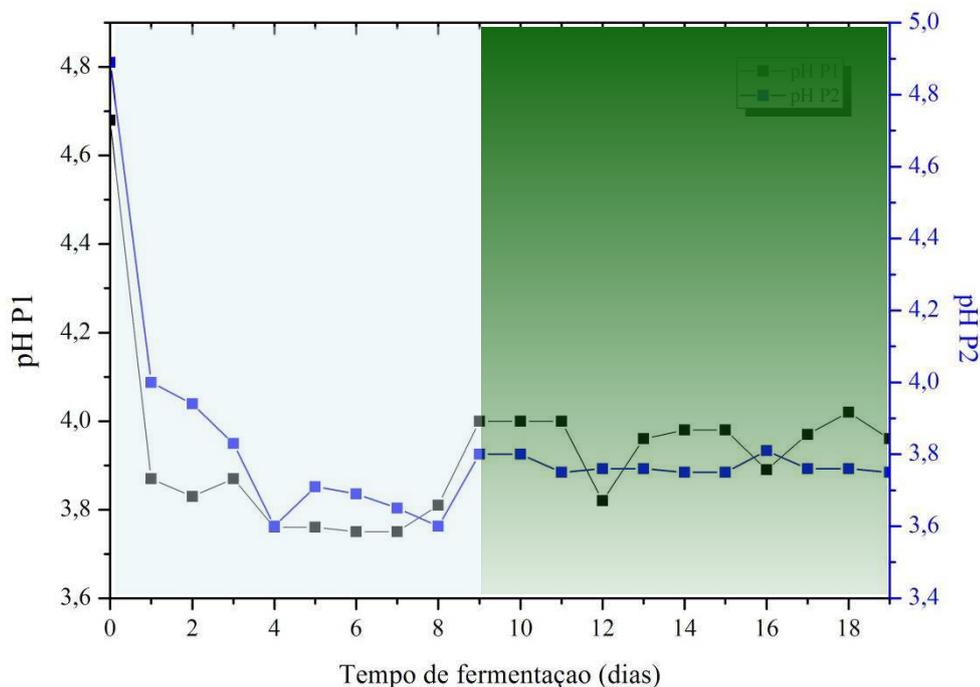


Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

A tonalidade azul e verde no gráfico corresponde ao período (até 9 dias) em que ocorreu o cultivo do isolado fúngico CDSA12 e o co-cultivo dos fungos, respectivamente.

Os dois processos fermentativos apresentaram redução do pH durante as primeiras 96 horas, havendo uma queda de 19,66 e 26,38% do valor inicial (Figura 12). Após esse período o mesmo apresenta-se constante durante a primeira etapa da configuração do processo adotado neste estudo. Essa redução do pH possivelmente está relacionada à produção de ácidos por meio do isolado fúngico CDSA12 e o comportamento constante do pH no valor entre 3,6 e 3,8 é característico da produção de celulases produzidas por fungos filamentosos. Segundo Ferreira (2010), os valores ótimos de pH para produção de celulases utilizando fungo é na faixa ácida (3,6 - 5,0). Percebe-se que mesmo na segunda etapa da configuração no processo estudado, o pH permanece na faixa indicada por Ferreira (2010), demonstrando que no meio encontram-se ainda enzimas ativas durante a fermentação alcoólica do bagaço hidrolisado.

Figura 12 - Perfil do potencial hidrogeniônico (pH) para o co-cultivo de fungos visando a produção de bioetanol.



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

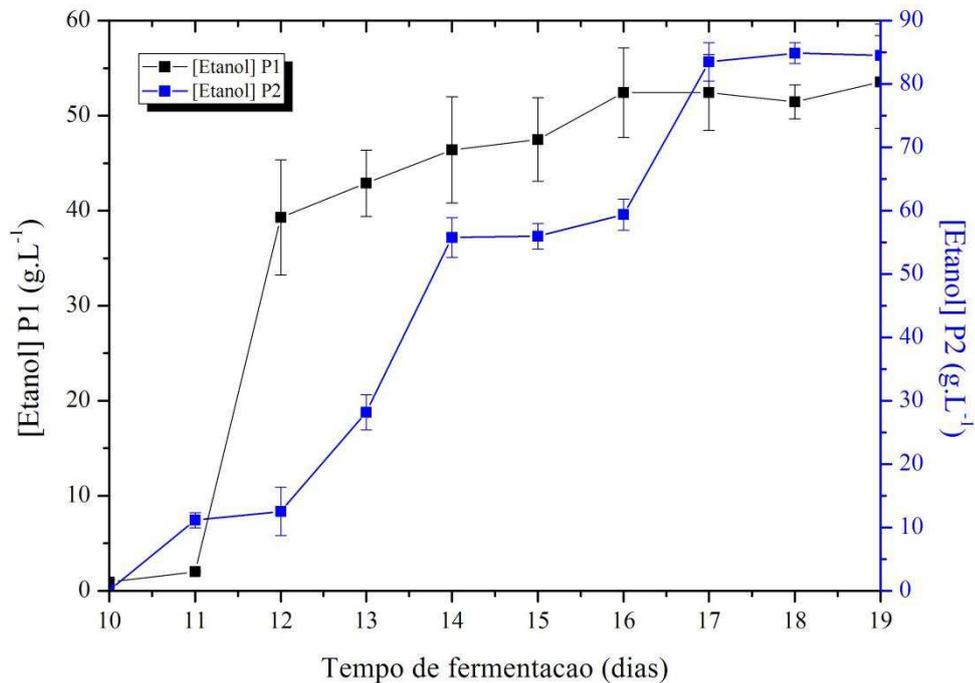
A tonalidade azul e verde no gráfico corresponde ao período (até 9 dias) em que ocorreu o cultivo do isolado fúngico CDSA12 e o co-cultivo dos fungos, respectivamente.

A produção de etanol apresentou perfil crescente para os experimentos 1 e 2 durante as primeiras 24 horas de fermentação (Figura 13). Nas últimas 72 horas a concentração de etanol no Experimento 1 permaneceu constante como resultado da baixa disponibilidade de glicose presente no meio, por consequência da baixa concentração de enzimas ativas que possam promover a sacarificação dos polissacarídeos. No Experimento 2 a concentração de etanol apresenta linearidade crescente ao longo da fermentação apresentando perfil constante apenas nas últimas 48 horas. Provavelmente, em virtude da inativação térmica das enzimas, as quais apresentaram perfil decrescente após a primeira etapa do processo fermentativo.

Comparando as Figuras 10 e 13, pode-se verificar que após os 9 dias de fermentação a concentração de AR apresenta perfil decrescente corroborando com os valores crescentes da concentração de etanol em ambos os experimentos. Percebe-se também que a concentração de etanol atinge valores próximos aos reportados na literatura, embora a metodologia de detecção e o tempo de fermentação sejam diferentes aos que foram utilizados neste trabalho. Silva e

Cruz (2014) obtiveram concentração de etanol de aproximadamente  $20 \text{ g.L}^{-1}$  em 48 horas de fermentação, utilizando 15% de carga de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ( $195 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 10 min; 0,021% de NaOH) e carga enzimática de  $20 \text{ FPU.g}^{-1}$  de bagaço.

Figura 13 - Perfil cinético da concentração de etanol produzido pela *Saccharomyces cerevisiae* JP1 a partir dos açúcares fermentescíveis biodisponibilizados durante o co-cultivo dos fungos. Esse perfil tem início após o décimo dia da fermentação com o isolado fúngico CDSA12.



Fonte: Construído com os dados da pesquisa.

### 5.3 ESTUDO CINÉTICO DO PROCESSO FERMENTATIVO

A Tabela 3 mostra os parâmetros cinéticos envolvidos na produção de bioetanol utilizando a configuração do co-cultivo de fungo. Os resultados expressam a velocidade instantânea de consumo do substrato ( $r_s$ ), a velocidade instantânea de produção de etanol ( $r_p$ ), o rendimento de substrato em produto ( $Y_{ps}$ ) e a produtividade em etanol ( $P_p$ ) dos Experimentos 1 e 2.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos envolvidos na produção de bioetanol por meio do co-cultivo de fungo.

| Parâmetros cinéticos                        | Experimento 1 | Experimento 2 |
|---|---------------|---------------|
| $r_s$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | 0,0394        | 0,0338        |
| $r_p$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | 0,115         | 0,185         |
| $Y_{ps}$ (g.g <sup>-1</sup> )               | 0,341         | 0,182         |
| $P_p$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> ) | 0,244         | 0,391         |

Fonte: Construída com os dados da pesquisa.

O Experimento 1 apresentou velocidade de consumo do substrato ( $r_s$ ) 14,21% maior que o Experimento 2, corroborando com os resultados de rendimento de substrato em produto que se mostrou 43,63% superior. Estes fatos podem estar relacionados ao processo de inibição inicial do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* JP1 condicionado pela concentração de substrato presente no meio, como mostra na Figura 10. A velocidade instantânea de produção de etanol no Experimento 2 foi 60,67% maior que o evidenciado no Experimento 1, corroborando com a produtividade em etanol que apresentou diferença entre os experimentos de 37,6%.

No processo de Sacarificação e Fermentação Simultânea conduzida por Santos et al. (2010) a conversão enzimática após 24 horas de fermentação foi de 60%, no entanto, no presente estudo a conversão chegou a 121 e 116% para os Experimentos 1 e 2, respectivamente. Essa produtividade pode ser consequência do método de quantificação de etanol, tendo em vista que o mesmo é baseado na densidade específica do fermentado, solução composta por inúmeras substâncias derivadas do metabolismo dos fungos envolvidos no processo. Como o presente estudo trata-se de um processo inovativo, um método mais preciso como o de quantificação de etanol por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC) deve ser utilizado em experimentos posteriores para elucidar o que foi observado por meio do método densimétrico, no entanto é evidente que durante a fermentação alcoólica ocorreu conversão dos ARs em etanol como demonstra a Figura 13.

## 6 CONCLUSÕES

- O bagaço utilizado possui características favoráveis para a produção de bioetanol;
- O fungo filamentoso CDSA12 foi capaz de utilizar o bagaço como fonte de nutrientes no processo fermentativo submerso;
- As enzimas produzidas pelo fungo promoveram a biodisponibilização dos Açúcares Redutores;
- O pré-tratamento hidrotérmico proporcionou aumento 13,89% na atividade de CMCase;
- A levedura *Saccharomyces cerevisiae* JP1 foi capaz de converter os carboidratos disponibilizados pelo CDSA12 em etanol;
- O co-cultivo, entre o isolado fúngico CDSA12 e a *Saccharomyces cerevisiae* JP1, é uma estratégia promissora para a produção de etanol de 2ª geração.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulasas e xilanasas por *Aspergillus niger* IZ9 usando fermentação submersa sobre o bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70. 2000.
- AGUIAR, C. M. **Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulolíticos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger***. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 106 p. 2010.
- ARRUDA, P. V. de **Avaliação do Processo Biotecnológico de Obtenção de Xilitol em Diferentes Escalas a partir do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar**, Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Lorena - SP, 2011.
- BARBOSA, L. C. A.; MALTHAE, C. R. A.; SILVA, V. L.; COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI-CG/EM). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.
- BAUDEL, H. M. **Pré-tratamento e hidrólise**. III Eorkshop Tecnológico sobre Hidrólise – Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, Dezembro, 2006.
- BIDLACK, J.; MALONE, M; BENSON, R. Molecular structure and camponent integrantion of secondary cell wall in plants. **Proc. Okla. Acad. Sci.** v. 72, p. 51-52, 1992.
- BONOMI, A. Termo de referência do “**III Worshop Tecnológico sobre Hidrólise**” – Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas – Etanol. São Paulo, Dezembro, 2006.
- CARDOSO, W. S.; SANTOS, F. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, F. D.; RESENDE, S. T.. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, n. 56, p. 64-76, 2012.
- CLARK, T. A.; MACKEI, K. L. Fermentation inhibitors in Wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiate*. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 34, p. 101-110, 1984.
- CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Optimization of D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* cells permeabilized with trioton X-100. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, p. 34-38, 2014.
- CURVELLO, A. A. S. **Processos de deslignificação organossolve**. Tese de Doutorado. Instituto de Química de São Carlos, Universidade São Paulo, 110p. 1992.
- DESVAUX, M. The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 37, p. 373-385, 2005.
- DIAS, M. O. S. **Desenvolvimento e otimização de processos de produção de etanol de primeira e segunda geração e eletricidade a partir da cana-de-açúcar**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2011.
- DILLON, A. Celulasas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. **Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 243-270. 2004.

DURRANT, A. J.; WOOD, D. A.; CAIN, R. B. Lignocellulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid substrate fermentation. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

EKLUND, R.; GALBE, M. ZACCHI, G. Optimization of temperature and enzyme concentration in the enzymatic saccharification of steam-pretreated willow. **Enzyme Microbiol. Technol.** V. 12, p. 225-228, 1990.

FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar**. 2ª ed. Piracicaba: Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil, 2003.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, 2009.

FERREIRA, V. **Produção de B-glucosidase em *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e avaliação de seu emprego no processo de hidrólise enzimática simultânea à fermentação para a produção de etanol de segunda geração**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 123 p. 2010.

FONTAN, R. C. I.; VERRÍSIMO, L. A. A.; SILVA, W. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. **B.CEPPA**. v. 29, n. 2, p. 203-210, 2011

GALLÃO, M. I. Parede celular vegetal, 2012. Disponível em: <[www.biologia.ufc.br/backup/docentes](http://www.biologia.ufc.br/backup/docentes)>. Acesso em: 25 fev. 2012.

HENDRIKS, A. T. W.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 10-18, 2008.

HSU, T. Pretreatment of biomass. In: Handbook on bioethanol production and utilization. Wyman C. F. TAYLOR & FRANCIS, Bristol, p. 179-195, 1996.

KIMURA, S.; LAOSINCHAI, W.; ITOH, T.; CUI, X. J.; LINDER, C. R.; BROWN, R. M. Jr. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. **The Plant Cell**, v. 11, p. 2075-2085, 1999.

KLASS, D. L. Biomass for renewable energy, fuels, and chemicals. Academic Press, San Diego. 1998.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 66, p. 10-26, 2004.

LARSSON, S.; PALQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 24, p. 151-159, 1998.

LEE, J. Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24. 1997.

LEMOES, J.L.S. **Estudo da Produção de Xilanases por *Aspergillus awamori* em Bagaço de Cana**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S.. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2001.

LYND, L.R.; ZYL, W.H.V.; McBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16. n. 5, p. 577-583. 2005.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 121 p. 2005.

MEDVE, J. **Cellulose hydrolysis by *Trichoderma reesei* cellulases: studies on adsorption, sugar production and synergism of cellobiohydrolase I, II and endoglucanases II**. Thesis (Doctor In Biochemistry) - Lund University. Lund, 49 p. 1997.

MELO, G. R. **Produção de celulases e xilanases pelo fungo termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 67. 2010.

MENEZES, T. J. B. Os fungos na indústria. **Boletim da SBCTA**, v. 31, n. 2, p. 116-120. 1997.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. de F.; MARCONCINI, J. M.; Procedimentos para Análise Lignocelulósica, Embrapa – Documentos – 236, Embrapa algodão, Campina Grande – PB, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B; ELLANDER, R.; HOLTZAPPLE, M; LADISCH, M. Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.

NASCIMENTO, V. M. **Pré-tratamento Alcalino (NaOH) do Bagaço de Cana-de-açúcar para a Produção de Etanol e Obtenção de Xilooligômeros**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2011.

NORDISK, N. **Celluclast 1,5 L: Ficha Técnica**. Curitiba, p. 3. 1996.

NUNES, B. R. P; CONRADO, L. S; MORAIS, C. R. S. Estudo do Pré-tratamento e da Hidrólise do Bagaço de Cana Utilizando a Vermiculita Ativada com Ácido como Catalisador. **XX Congresso brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis, 2014.

OYEKOLA, O. O.; NGESI, N.; WHITELEY, C. G. Isolation, purification and characterization of an endoglucanase and b-glucosidade from an anaerobic sulphidogenic bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 40, p. 873-878, 2007.

PEREIRA, N. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. In. series on biotechnology. Ed. Nei Pereira Jr. Amiga Digital. Escola de Química/UFRJ. v. 3, n. 4. 2008.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação

de Mestrado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 180 p. 2007.

RABELO, S. C. **Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração.** Tese de Doutorado. Campinas: Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 447 p. 2010.

RAHIKAINEN, J. Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 12, p. 2823-2834, 2011.

RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M. N.; BANO, Z. Biopotentialites of the basidiomycetes. **Advences in Applied Microbiology**, v. 37, p. 223-361, 1992.

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

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica.** Tese de Doutorado, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

SANTOS, J. R. A.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R. Comparação entre processos em SHF e em SSF de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 904-908, 2010.

SCHLITTLER, L. A. F. S. **Engenharia de um bioprocesso para a produção de etanol de cana-de-açúcar.** Dissertação de Mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SEWALT, V; GLASSER, W. BEAUCHEMIN, K. Lignin impact on fiber degradation III: reversal of inhibition of enzymatic hydrolysis by chemical modification of lignin and by additives. **J. Agri. Food Chem**, v. 45, p. 1823-1828, 1997.

SILVA, G. M. **Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, 104 p. 2011.

SILVA, A. S.; Silva, F. L. H.; CARVALHO, M. W. N. C.; PEREIRA, K. R. O. Hidrólise de Celulose por Catalisadores Mesoestruturados NiO-MCM-41 E MoO<sub>3</sub>-MCM-41, **Química Nova**, Vol. 35, n. 4, p. 683-688, 2012.

SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae*.** Tese de doutorado, Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2013.

SILVA, G. M.; CRUZ, A. J. G. **Hidrólise e fermentação simultânea do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotermicamente.** XX Congresso brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, 2014.

SIQUEIRA, G. A. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. **Applied Energy**, v. 102, p. 399-402, 2013.

SOUSA, J. P. **Prospecção de enzimas de interesse industrial (celulase e amilase) a partir de fungos isolados da Caatinga, Semiárido paraibano.** Universidade Federal de Campina Grande, Sumé/PB. 54 p. 2014.

SOUZA, R. F. R. Produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático do bagaço da cana-de-açúcar por leveduras isoladas do bioma amazônico. Dissertação de Mestrado, Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresour. Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresour. Technology**, v. 96, p. 1599-1606. 2005.

SZENGYEL, Z. **Ethanol from wood: Cellulase enzyme production.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química, Lund University, Suécia, 2000.

TAHERZADEH, M. J. & KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TAVARES, M. B. R. **Estudo da produção de enzima celulase a partir da matéria lignocelulósica do caju por fermentação semi-sólida utilizando *Aspergillus niger*.** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 108 p. 2009.

VÁSQUEZ, M. P.; SILVA, J. N. C.; SOUZA, M. B.; PEREIRA, N. Enzymatic hydrolysis optimization to ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, p. 141-153, 2007.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics and opportunities. **Bioresour. Technol.**, v. 50, p. 3-16, 1994.